

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**  
Programa de Pós-Graduação em Química

ANDRÉA TEDESCO FACCIO

**Estudo do efeito de estatinas e antiplaquetários na  
evolução do infarto agudo do miocárdio: uma  
abordagem metabólica multiplataforma**

**Versão da Tese Corrigida**

São Paulo

Data do Depósito na SPG:  
**12/01/2021**

ANDRÉA TEDESCO FACCIÓ

**Estudo do efeito de estatinas e antiplaquetários na evolução do infarto agudo do miocárdio: uma abordagem metabolômica multiplataforma**

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

*Orientadora: Profa. Dra. Marina Franco Maggi Tavares*

São Paulo  
2021

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:  
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

F138e Faccio, Andréa Tedesco  
Estudo do efeito de estatinas e antiplaquetários na evolução do infarto agudo do miocárdio: uma abordagem metabolômica multiplataforma / Andréa Tedesco Faccio. - São Paulo, 2021.  
199 p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Química Fundamental.

Orientador: Tavares, Marina Franco Maggi

1. Metabolômica. 2. Cardiovascular. 3. Espectrometria de Massas. 4. Cromatografia. 5. Eletroforese capilar. I. T. II. Tavares, Marina Franco Maggi, orientador.

*Dedico esta tese aos meus pais,  
Renato e Marita por sempre me apoiarem  
em todas as minhas decisões.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de expressar a minha profunda gratidão à minha família, em especial aos meus pais, Renato e Marita, que sempre demonstraram o valor da educação, da dedicação e do esforço. Ao meu irmão, Christian, que sempre consegue me acalmar e me divertir. A minha avó Lourdes (*In memoriam*) e aos meus queridos tios, quase avós, que já não estão entre nós, Suelly e Roberto (*In memoriam*), pelo carinho que sempre tiveram por mim.

À Profa. Dra. Marina F. M. Tavares pela orientação, pela confiança depositada em mim para realizar esse projeto e por todas as oportunidades de crescimento profissional que me proporcionou.

Ao Prof. Dr. João Pedro Simon Farah, por trazer muita alegria, conhecimento e diversão na hora do almoço e do café. Ao Prof Ivan (Robert Schumacher) pelas conversas sempre divertidas durante os memoráveis almoços que tivemos no grupo.

Aos colegas e ex-colegas de laboratório Ana, Carol, Lucas, Jéssica, Rose, Adriana (agora professora), Rosinha (agora professora), Gisele (agora professora), Aline Klassen (agora professora), pelo ambiente de trabalho agradável, repleto de amizade, conversas e discussões sobre metabolômica, estatística, cromatografia, e outras coisas da vida, e pelas viagens sempre muito divertidas. Aos alunos e ex-alunos de iniciação científica, em especial à Ana (agora aluna de mestrado), que me traz muito orgulho por sua constante evolução profissional. Ao especialista de laboratório Daniel, por toda ajuda para esse e outros trabalhos.

Ao grupo de pesquisa CEMBIO da Profa. Coral Barbas, que me acolheu e me ensinou muito sobre metabolômica no início do meu doutorado. Ao professor Francisco Javier Rupérez, meu supervisor na Espanha, por todo o conhecimento passado e pela consideração e carinho durante o meu período de estadia. A todos os colegas de CEMBIO por tornarem minha estadia na Espanha muito incrível e acolhedora.

À Carolina Carranza Ruiz que me recebeu em sua casa e me deu uma família espanhola no meu período de estadia em Madri. Aos amigos que moraram comigo durante minha estadia em Madri, Mário, Danuta, Nayeli, Tea e Vinicius, obrigada pelas discussões científicas, conversas, passeios, viagens, refeições, momentos inesquecíveis e por tornarem minha experiência única e cheia de amizade.

Ao grupo de pesquisa do Prof. Dr. Massuo Jorge Kato e Dra. Lydia Fumiko Yamaguchi, pela disponibilização do equipamento de LC-MS para as análises

metabolômicas e de outros projetos de colaboração.

Ao professor Marcone A. L. de Oliveira da UFJF pela disponibilização do equipamento e por me receber muito bem em Juiz de Fora.

Aos funcionários do Instituto de Química, em especial aos da seção de pós-graduação.

Aos colegas do Instituto de Química que de alguma forma colaboraram para a concretização deste trabalho.

Aos meus amigos por me alegrarem nesse período. Em especial aos amigos Nildro, Renato, Filipe, Pedro, Anderson, Carlos. Fernando, Alisson e Alan pela companhia e risadas. Ao meu namorado Tom, que sempre me incentivou no final dessa jornada.

Aos meus supervisores e colegas do grupo Fleury, Karina, Valdemir, Adriana, Luciana, Rodrigo e Guilherme pela troca de conhecimento e pelos momentos divertidos durante os almoços.

Ao CNPq pela bolsa de doutorado concedida. À Airbus Military e EADS Casa pela concessão da bolsa no período de estágio no exterior (Madri). Às agências FAPESP e CAPES pelo auxílio financeiro.

Ao Instituto de Química pela estrutura para realização deste projeto.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização dessa tese.

*“The most courageous act is still to think for  
yourself. Aloud.”*

***Coco Chanel***

## RESUMO

Faccio, A. T. **Estudo do efeito de estatinas e antiplaquetários na evolução do infarto agudo do miocárdio: uma abordagem metabolômica multiplataforma.** 2021. (199p). Tese – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O infarto agudo do miocárdio (IAM) é a maior causa de mortalidade no mundo. A oclusão coronária determina a necrose completa de cardiomiócitos (células musculares cardíacas) durante as primeiras horas do IAM. Porém, mesmo após a perda de massa de miocárdio viável cessar, a região infartada pode se expandir ou contrair no decorrer das primeiras semanas, afetando o prognóstico dos pacientes. Alguns tratamentos podem auxiliar na recuperação e melhoria do prognóstico desses pacientes, como o uso de estatinas e antiplaquetários, que quando utilizados em conjunto, proporcionam efeitos sinérgicos.

O presente estudo investigou e comparou, através da óptica da metabolômica global multiplataforma, tratamentos concomitantes de estatinas (sinvastatina ou rosuvastatina) e antiplaquetários bloqueadores do receptor de ADP (clopidogrel ou ticagrelor), em pacientes que sofreram IAM. Foram coletadas amostras de plasma e urina de cerca 40 pacientes tratados com clopidogrel e sinvastatina ou ticagrelor e rosuvastatina no Hospital São Paulo em diferentes períodos (basal, 1 mês e 6 meses após IAM). Amostras de plasma (basal e 1 mês) foram analisadas por RPLC-MS nos modos de ionização positivo e negativo, GC-MS e CE-MS. Amostras de urina (basal, 1 mês e 6 meses) foram analisadas por RPLC-MS no modo de ionização positivo e HILIC-MS nos modos de ionização positivo e negativo.

A abordagem metabolômica global multiplataforma evidenciou alterações no metabolismo de diferentes vias pelos dois tratamentos. Os dois tratamentos proporcionaram um efeito pronunciado no metabolismo de diferentes lipídios, como glicerolipídios, esfingolipídios, glicerofosfolipídios e ácidos graxos, sendo que a combinação rosuvastatina e ticagrelor resultou num efeito mais acentuado. Já o tratamento com clopidogrel e sinvastatina alterou de maneira mais pronunciada o metabolismo de aminoácidos ramificados e de acilcarnitinas de cadeia curta.

Observou-se ainda a alteração de possíveis biomarcadores relatados na literatura como associados a problemas cardiovasculares, como hipoxantina, ácido 2-hidroxi-butírico, algumas espécies de ceramidas, fosfatidilcolinas e acilcarnitinas de cadeia curta.

**Palavras-chave:** metabolômica, cardiovascular, estatina, anti-plaquetário, RPLC-MS, HILIC-MS, GC-MS, CE-MS

## ABSTRACT

Faccio, A. T. **Effect of statins and antiplatelets in the evolution of acute myocardium infarction: a multiplatform metabolomics approach.** 2021. (199p). Doctorate Thesis - Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Acute myocardium infarction (AMI) is the main mortality cause in the world. The coronary occlusion determines the complete necrosis of cardiomyocytes (cardiac muscle cells) during the first hours of AMI. However, even after the loss of viable myocardial mass ceases, the infarcted area may still expand or contract during the first weeks after AMI, affecting the patient prognosis. Some treatments may assist patient recovery and improve prognostic, such as statins and antiplatelets which, when combined, provide synergic effects.

This study investigated and compared, by untargeted multiplatform metabolomics, simultaneous treatments of statins (simvastatin or rosuvastatin) and ADP receptor antagonist antiplatelets (clopidogrel or ticagrelor) in patients that suffered AMI. Plasma and urine samples from around 40 patients treated with clopidogrel and simvastatin or ticagrelor and rosuvastatin were collected in Hospital Sao Paulo at different time points (basal, 1 month, 6 months after AMI). Plasma samples (basal and 1 month) were analyzed by RPLC-MS in positive and negative ionization modes, GC-MS and CE-MS. Urine samples (basal, 1 month, 6 months) were analyzed by RPLC-MS in positive ionization mode and by HILIC-MS in positive and negative ionization modes.

The untargeted multiplatform metabolomics approach has shown that different metabolic pathways have been altered by the two treatments. Both treatments had a profound impact on the metabolism of different lipids, such as glycerolipids, sphingolipids, glycerophospholipids, and fatty acids. However, the combined treatment using rosuvastatin and ticagrelor impacted the most the lipid pathways. On the other hand, clopidogrel and simvastatin treatment affected more intensily the branched chain amino acids and short chain acylcarnitines metabolisms.

Reported biomarkers in the literature related to cardiovascular diseases were also observed in this study, such as hypoxanthine, 2-hydroxybutyric acid, some species of ceramides, phosphatidylcholines and short chain acylcarnitines.

**Key-words:** metabolomics, cardiovascular, statin, antiplatelet, RPLC-MS, HILIC-MS, GC-MS, CE-MS.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1D <sup>1</sup> H NMR	Experimento 1D com núcleo de próton de NMR
<sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C HSQC	Um tipo de experimento 2D NMR de correlação entre um núcleo de próton e um de <sup>13</sup> C (do inglês <i>heteronuclear single-quantum correlation</i> )
<sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H COSY	Um tipo de experimento 2D NMR de correlação de núcleos de próton (do inglês <i>correlated spectroscopy</i> )
<sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H TOCSY	Um tipo de experimento 2D NMR de correlação de núcleos de próton (do inglês <i>total correlation spectroscopy</i> )
ADP	Adenosina difosfato (do inglês <i>adenosine diphosphate</i> )
AG	Ácido graxo
AMP	Adenosina monofosfato (do inglês <i>adenosine monophosphate</i> )
ANOVA	Análise de variância (do inglês <i>analysis of variance</i> )
Apo	Apolipoproteínas
ATP	Adenosina trifosfato (do inglês <i>adenosine triphosphate</i> )
BPC	Cromatogramas de pico de base (do inglês <i>base peak chromatogram</i> )
BSTFA	N,O-bis-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida
CACT	Carnitina-acilcarnitina translocase
CDP-DG	Citidina-difosfato-diacilglicerol
CE	Éster de colesterol (do inglês <i>cholesteryl ester</i> )
CE-MS	Eletroforese capilar acoplada a espectrometria de massas (do inglês <i>capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry</i> )
Cer	Ceramida
CerP	Ceramidas fosfatadas
CI	ionização química (do inglês <i>chemical ionization</i> )
CK-MB	Fração MB da creatinofosfoquinase (do inglês <i>MB fraction of creatine kinase</i> )
CL	Cardiolipinas
CoA	Coenzima A
COX-1	Ciclo-oxigenase 1
CPT1	Carnitina palmitoil transferase 1
CS	Grupo de pacientes sob tratamento de clopidogrel e sinvastatina
CV	Coefficiente de variação
CV-ANOVA	Análise de variância de resíduos preditivos da validação cruzada (do inglês <i>analysis of variance of cross-validated predictive residuals</i> )
DBS	Pontos de sangue seco (do inglês <i>Dried blood spot</i> )
DDA	Modo de aquisição dependente de dados (do inglês <i>data dependent acquisition</i> )
DG	Diacilglicerol
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês <i>Deoxyribonucleic acid</i> )
ECG	Eletrocardiograma (do inglês <i>electrocardiogram</i> )
EI	Ionização por elétrons (do inglês <i>electron ionization</i> )
ESC	Sociedade europeia de cardiologia (do inglês <i>European Society of Cardiology</i> )

FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (Agência governamental norte-americana)
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (do inglês <i>gas chromatography coupled to mass spectrometry</i> )
GL	Glicerolípidios
HDL	Lipoproteínas de densidade alta (do inglês <i>high-density lipoproteins</i> )
Hex-Cer	Ceramidas monoglicosiladas
HILIC-MS	Cromatografia líquida de interação hidrofílica acoplada a espectrometria de massas (do inglês <i>hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to mass spectrometry</i> )
HMG-CoA redutase	3-Hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase
IAM	Infarto agudo do miocárdio
IDL	Lipoproteínas de densidade intermediária (do inglês <i>intermediate-density lipoproteins</i> )
IP	Intervenção percutânea
KNN	K-vizinhos mais próximos (do inglês <i>k-nearest neighbors</i> )
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (do inglês <i>liquid chromatography coupled to mass spectrometry</i> )
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em tandem
LDL	Lipoproteínas de densidade baixa (do inglês <i>low-density lipoproteins</i> )
LOESS	Suavização gráfica de dispersão local estimada (do inglês <i>locally estimated scatterplot smoothing</i> )
Lp(a)	Lipoproteína(a)
LPA	Ácido lisofosfatídico (do inglês <i>lysophosphatidic acid</i> )
LPC	Lisofosfatidilcolina (do inglês <i>lysophosphatidylcholine</i> )
LPE	Lisofosfatidiletanolamina (do inglês <i>lysophosphatidylethanolamine</i> )
m/z	Razão massa carga
mf	Do inglês <i>molecular feature</i>
MG	Monoacilglicerol
mRNAs	Ácidos ribonucleicos mensageiros (do inglês <i>messenger ribonucleic acids</i> )
MS	Espectrometria de massas (do inglês <i>mass spectrometry</i> )
MS/MS	Espectrometria de massas em tandem
NMR	Ressonância magnética nuclear (do inglês <i>nuclear magnetic resonance</i> )
OMS	Organização mundial da saúde
OPLS-DA	Análise discriminante por projeção em estruturas latentes ortogonais (do inglês <i>orthogonal projection latent structure-discriminant analysis</i> )
PA	Ácido fosfatídico (do inglês <i>phosphatidic acid</i> )
PC	Fosfatidilcolina (do inglês <i>phosphatidylcholine</i> )
PCA	Análise de componentes principais (do inglês <i>principal component analysis</i> )
PE	Fosfatidiletanolamina (do inglês <i>phosphatidylethanolamine</i> )
PG	Fosfatidilglicerol (do inglês <i>phosphatidylglycerol</i> )
PI	Fosfatidilinositol (do inglês <i>phosphatidylinositol</i> )

PL	Glicerofosfolipídios (do inglês <i>phosphatidyl lipids</i> )
PLA <sub>2</sub>	Fosfolipase A <sub>2</sub> (do inglês <i>phospholypase A<sub>2</sub></i> )
PLS-DA	Análise discriminante por projeção em estruturas latentes (do inglês <i>projection latent structure-discriminant analysis</i> )
PS	Fosfatidilserina (do inglês <i>phosphatidylserine</i> )
QC	Amostras de controle de qualidade (do inglês <i>quality control</i> )
Q-TOF	Analisador de massas do tipo quadrupolo-tempo-de-vôo (do inglês <i>quadrupole-time-of-flight</i> )
RPLC-MS	Cromatografia líquida de fase reversa acoplada a espectrometria de massas (do inglês <i>reversed-phase liquid chromarography couple to mass spectrometry</i> )
SCA	Síndrome coroniana aguda
SM	Esfingomielina (do inglês <i>sphingomyelin</i> )
SREBP	Proteínas de ligação ao elemento regulador do estero (do inglês <i>sterol-regulatory element-binding proteins</i> )
TFANH <sub>4</sub>	Trifluoroacetato de amônio
TG	Triacilglicerol
TIC	Cromatograma de íons totais (do inglês <i>total ion chromatogram</i> )
TMCS	Trimetilclorosilano
TOF	Analisador de massas do tipo tempo-de-vôo (do inglês <i>time-of-flight</i> )
t <sub>R</sub>	Tempo de retenção
TR	Grupo de pacientes sob tratamento de ticagrelor e rosuvastatina
UHPLC	Cromatografia líquida de ultra eficiência (do inglês <i>ultra high-performance liquid chromatography</i> )
VLDL	Lipoproteínas de densidade muito baixa (do inglês <i>very low-density lipoproteins</i> )

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Representação de um coração com necrose de uma parte do músculo cardíaco e artérias coronárias obstruídas que causam o infarto agudo do miocárdio.	18
<b>Figura 2</b> - Estruturas de algumas estatinas.	19
<b>Figura 3</b> - Estruturas de fármacos bloqueadores de receptor de ADP.	21
<b>Figura 4</b> - Fluxo de trabalho de metabolômica <i>untarget</i> (roxo) e <i>target</i> (azul).	23
<b>Figura 5</b> - Representação do processamento de dados brutos de técnicas de separação acopladas a espectrometria de massas.	33
<b>Figura 6</b> - Desenho experimental para coleta de amostras de plasma e urina ( $d_i$ = dose inicial, $d_m$ = dose de manutenção).	51
<b>Figura 7</b> - Cromatograma de íons totais (TIC) das análises de plasma por CE-MS (A), GC-MS(B) e RPLC-MS no modo positivo (C) e negativo (D).	67
<b>Figura 8</b> - Eletroferogramas dos íons extraídos de $m/z$ 148,0757, $m/z$ 166,0863, $m/z$ 188,0682, $m/z$ 167,0896 obtidos de análise de plasma por CE-MS.	68
<b>Figura 9</b> - Identificação de produtos de derivatização da valina com um (A) ou dois (B) grupos de trimetilsilício pelo software NIST MS Search, em que pode-se observar o espectro de massas obtido experimentalmente, a comparação do espectro de massas experimental com o espectro de massas da biblioteca e o espectro de massas da biblioteca.	71
<b>Figura 10</b> - Gráficos de escores dos modelos de PCA das análises de plasma por CE-MS (A), GC-MS (B), RPLC-MS modo positivo (C) e RPLC-MS modo negativo (D). As amostras em vermelho (■) representam os QC e as demais amostras do estudos estão representadas em cinza (▲).	73
<b>Figura 11</b> - Gráficos de escores dos modelos de PCA construídos com as amostras dos pazeitnes e sem amostras de QC das análises de plasma por CE-MS (A), GC-MS (B), LC-MS modo positivo (C) e LC-MS modo negativo (D).	74
<b>Figura 12</b> - Cromatogramas de íons extraídos de amostra de plasma com adição de padrão ou água de $m/z$ 130,0863 (A) e 161,1285 (B) analisadas por CE-MS para confirmação das identificações.	81
<b>Figura 13</b> - Exemplo de lipídios das classes identificadas e significativamente alteradas no presente trabalho nas análises de plasma por RPLC-MS.	83
<b>Figura 14</b> - Espectro de fragmentação do PE(18:2-18:0) em amostra de plasma analisada por RPLC-MS/MS no modo negativo.	85
<b>Figura 15</b> - Espectro de fragmentação em amostra de plasma analisada por RPLC-MS/MS no modo positivo e estrutura da SM(d18:1/16:0). Com fragmentos da cabeça polar referentes a TA: Trimetilamina, CD: Colina desidratada, P: Fragmento fosfatado e PC: fosfocolina e fragmento da base esfingóide com perda neutra de duas água (BE).	86
<b>Figura 16</b> - Espectro de fragmentação e estrutura da Cer(d18:1/24:1) com fragmentos referentes à base esfingóide (R e P) e à cadeia de amida (S, T, U e V) em amostra de plasma analisada por RPLC-MS/MS no modo negativo de ionização.	86
<b>Figura 17</b> - Espectro de fragmentação do TG(18:2-18:1-16:0) em amostra de plasma analisada por RPLC-MS/MS no modo positivo.	87
<b>Figura 18</b> - Cromatogramas de íon extraídos dos adutos de SM(d34:1) encontrados nas amostras de plasma analisadas por RPLC-MS nos modos positivo (A) e negativo (B) de ionização.	97
<b>Figura 19</b> - Cromatograma do íon extraído de $m/z$ 369,3515 (A) e espectro MS/MS desse íon no tempo de retenção de 13,6 min de amostras de plasma analisadas por RPLC-MS/MS no modo positivo.	98
<b>Figura 20</b> - Cromatograma do íon extraído de lípideos da classe SM identificados por MS/MS na análise de plasma por RPLC-MS no modo positivo com uma insaturação (A) e	99

da classe PC identificados por MS/MS nas amostras de plasma analisadas por RPLC-MS no modo negativo com 34 carbonos referentes aos resíduos de ácidos graxos (B).

**Figura 21-** Gráfico de barras das classes de compostos significativamente alterados pela análise univariada, identificados por adição de padrão (CE-MS) ou pelo padrão de fragmentação (GC-MS ou RPLC-MS/MS) em amostras de plasma de pacientes analisadas por GC-MS, CE-MS e RPLC-MS com a porcentagem de metabólitos polares e apolares identificados por cada plataforma analítica. 100

**Figura 22-** Diagrama de Venn dos metabólitos significativos pela análise univariada identificados por adição de padrão ou pelo padrão de fragmentação, provenientes da análise de plasma de pacientes por CE-MS, GC-MS e RPLC-MS no modo positivo e negativo. 101

**Figura 23-** Cromatogramas do pico base das análises de urina por RPLC-MS (A) e HILIC-MS no modo positivo (B) e negativo (C). 102

**Figura 24-** Cromatograma de íons extraídos da hipoxantina de  $m/z$  137,0458 (A), acetilcarnitina de  $m/z$  204,1230 (B) e ácido hipúrico de  $m/z$  180,0655 (C) de amostra de urina de paciente infartado, por cromatografia de fase reversa (RPLC-MS). 102

**Figura 25-** Cromatograma do pico base (A e B) e do íon extraído do padrão interno p-fluorofenilalanina (C e D) para amostras de urina preparadas utilizando acetonitrila (•), isopropanol (•) ou 1:1 isopropanol:acetonitrila (•) analisadas por HILIC-MS no modo negativo(-) e positivo(+) de ionização por electrospray (ESI). 105

**Figura 26-** Representação gráfica de amostras de urina precipitadas com acetonitrila (A), com isopropanol ou isopropanol:acetonitrila 1:1 (B). 105

**Figura 27 -** *Heatmap* da intensidade de molecular features ao longo da análise cromatográfica por HILIC-MS no modo negativo para as amostras de urina de pacientes infartados, extraídas com acetonitrila (ACN), isopropanol (ISO) e 1:1 isopropanol:acetonitrila (I+A). 107

Heatmap: máximo  mínimo.

**Figura 28 -** Cromatograma do íon extraído dos compostos p-cresil sulfato de  $m/z$  187,01 (A), ácido úrico de  $m/z$  167,02 (B), serina de  $m/z$  104,03 (C), metilhistidina de  $m/z$  168,08 (D), cistationina de  $m/z$  223,07 (E), hipoxantina de  $m/z$  137,04 (F), guanidinoacetato de  $m/z$  118,06 (G) e trimetilamina N-óxido (TMAO) de  $m/z$  76,07 (H) de amostras de urina preparadas com acetonitrila (•), isopropanol (•) e 1:1 isopropanol:acetonitrila (•) analisadas por HILIC-MS no modo negativo(-) e positivo(+) de ionização por electrospray (ESI). 109

**Figura 29 -** Gráfico de escores do modelo de PCA construídos com os dados obtidos pela análise de urina por RPLC-MS (A) e HILIC-MS no modo positivo (B) e negativo (C) na presença de *outliers* fortes indicados na figura pela identificação da amostra com os códigos TR-b-22, TR-b-6 e TR-b-2. (TR-b: indica o grupo de pacientes tratados com ticagrelor e rosuvastatina amostrados no tempo basal, o número após “-” é o código do paciente). 111

**Figura 30-** Box plot da soma total dos sinais das análises de urina por RPLC-MS (A) e HILIC-MS no modo positivo (B) e negativo (C). Os *outliers* estão indicados na figura pela identificação da amostra com os códigos TR-b-22, TR-b-16, TR-b-6, TR-t-20 e TR-b-2. (TR-b: indica o grupo de pacientes tratados com ticagrelor e rosuvastatina amostrados no tempo basal; TR-t: indica o grupo de pacientes tratados com ticagrelor e rosuvastatina após trinta dias de tratamento; o número após “-” é o código do paciente). 112

**Figura 31-** Gráfico de escores do modelo de PCA sem *outliers* fortes construídos com os dados obtidos pela análise de amostras de urina dos pacientes por RPLC-MS (A) e HILIC-MS no modo positivo (B) e negativo (C) com amostras de QC (■), e sem amostras de QC, com indicação dos grupos CS-b (▲), CS-t (■), CS-s (◆), TR-b (▲), TR-t (●) e TR-s (▼) dos dados de RPLC-MS (D) e HILIC-MS no modo positivo (E) e negativo (F). 113

**Figura 32-** Cromatogramas do íon extraído de  $m/z$  134,0611 e  $m/z$  135,0638 sobrepostos (A) e de  $m/z$  232,0733 (B) da análise de urina por HILIC-MS no modo negativo. Porcentagens de alteração calculadas para os *molecular features* de  $m/z$  134,0611 e  $m/z$  135,0638 com tempo de retenção ( $t_R$ ) de 5,8 min para diferentes comparações. 120

- Figura 33-** Classe de compostos identificados putativamente em bancos de dados, encontrados significativamente alterados por análise estatística univariada (ANOVA de medidas repetidas) da análise de amostras de urina de pacientes tratados com CS ou TR pelas técnicas de RPLC-MS (modo positivo) e HILIC-MS (modo positivo e negativo). 122
- Figura 34-** Metabolismo dos fosfolipídios, adaptado do *Reactome* para humanos<sup>38</sup>. As setas para cima representam o aumento da classe do lipídio no plasma dos pacientes após 30 dias de tratamento, enquanto as setas para baixo representam a diminuição. O círculo representa que alguns lipídios da classe aumentaram, enquanto que outros diminuíram. A cor roxa representa que a alteração foi observada com os dois tratamentos, a azul representa a alteração no tratamento com TR e a verde no tratamento com CS.\* Apenas identificação putativa por *m/z* para essa classe. CDP-DG: citidina- difosfato-diacilglicerol. CL: cardiolipina. DG: diacilglicerol. PA: ácido fosfatídico. PC: fosfatidilcolina. PE: fosfatidiletalamina. PG: fosfatidilglicerol. PI: fosfatidilinositol. PS: fosfatidilserina.. L: forma liso dos glicerofosfolipídios. 126
- Figura 35-** Metabolismo dos esfingolipídios. Adaptado de Falluel-Morel *et al.* e Merscher e Fornoni<sup>51,52</sup>. As setas em roxo representam a diminuição de lipídios da classe nos dois tratamentos e o círculo representa que alguns lipídios dessa classe aumentaram, enquanto outros diminuíram nos dois tratamentos. SPT: serina palmitoiltransferase; CerS:ceramida sintase. DES: dihidroceramida desaturase. SMS: esfingomielinina sintase. Smase: esfingomielinase. CDase: ceramidase. 131
- Figura 36-** Metabolismo simplificado de acilcarnitinas. n: número de carbonos da cadeia proveniente do ácido graxo; AG: ácido graxo livre; L: cadeia longa; M: cadeia media; C: cadeia curta; CoA: coenzima A; Seta vermelha para baixo: diminuição com Clopidogrel+Sinvastatina; Seta azul para baixo: diminuição nos dois tratamentos. Círculo azul: Alguns compostos da classe com tendência de aumento e outros com tendência de diminuição nos dois tratamentos. \* diminuição dos níveis do corpo cetônico ácido 3-hidroxiibutírico. 134
- Figura 37-** Metabolismo da glutatona. As setas para cima indicam aumento dos metabólitos após 1 ou 6 meses de tratamento, enquanto que as setas para baixo indicam diminuição dos níveis dos metabólitos. A cor verde representa mudança significativa apenas no grupo CS, a cor azul no grupo TR e a cor roxa nos dois grupos. 137

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b> Características das técnicas analíticas comumente empregadas em metabolômica	32
<b>Tabela 2-</b> Análise estatística multivariada dos modelos de PLS-DA construídos com dados de análise de plasma por CE-MS e RPLC-MS (modo positivo e negativo)	75
<b>Tabela 3-</b> <i>Heatmap</i> dos resultados da Análise Univariada (ANOVA medidas repetidas com um fator) das análises de plasma dos pacientes por GC-MS	80
<b>Tabela 4-</b> <i>Heatmap</i> dos metabólitos significativos por ANOVA de medidas repetidas com um fator identificados das análises de CE-MS	81
<b>Tabela 5-</b> Fragmentação característica dos lipídios identificados	84
<b>Tabela 6-</b> <i>Heatmap</i> dos metabólitos significativos por ANOVA de medidas repetidas com um fator identificados das análises de plasma por RPLC-MS e caracterizados por MS/MS	87
<b>Tabela 7 -</b> Resultados obtidos da otimização do preparo de amostras de urina para análise por HILIC-MS no modo negativo e positivo	104
<b>Tabela 8-</b> Resultados obtidos para diferentes fases móveis testadas para análise de urina por HILIC-MS	110
<b>Tabela 9-</b> Modelos de PLS-DA de comparações de tratamento e temporais de dados de urina dos pacientes adquiridos por RPLC-MS e HILIC-MS no modo positivo e negativo	114
<b>Tabela 10-</b> Características de lipoproteínas	123
<b>Tabela 11-</b> Ésteres de colesterol diminuídos no plasma de pacientes que sofreram AMI após trinta dias de tratamento	124
<b>Tabela 12-</b> GL e PL significativamente alterados por ANOVA de medidas repetidas no plasma de pacientes que sofreram AMI após 30 dias de tratamento	124
<b>Tabela 13-</b> Alterações do nível plasmático de PL contendo ácido araquidônico na composição após 30 dias de tratamento	129
<b>Tabela 14-</b> Esfingolipídios alterados no plasma de pacientes de AMI após 30 dias de tratamento	130
<b>Tabela Suplementar 1 –</b> Identificação putativa dos <i>molecular features</i> significativos das análises de plasma por RPLC-MS no modo positivo (ESI+) e negativo (ESI-) de ionização.	147
<b>Tabela Suplementar 2 –</b> Identificação putativa de <i>molecular features</i> significativos pela análise de urina por RPLC-MS modo positivo e HILIC-MS modo positivo e negativo.	171

## SUMÁRIO

<b>Capítulo 1- Introdução .....</b>	<b>17</b>
<b>1 - Infarto agudo do miocárdio .....</b>	<b>18</b>
<b>2 - Estatinas e anti-plaquetários no tratamento do infarto do miocárdio .....</b>	<b>19</b>
<b>3 - Metabolômica .....</b>	<b>22</b>
<b>4 - Metabolômica e doenças cardiovasculares .....</b>	<b>36</b>
<b>5 – Bibliografia .....</b>	<b>38</b>
<b>Capítulo 2 – Objetivos .....</b>	<b>47</b>
<b>1 – Objetivos gerais .....</b>	<b>48</b>
<b>2 – Objetivos Específicos .....</b>	<b>48</b>
<b>Capítulo 3 – Parte Experimental .....</b>	<b>49</b>
<b>1 - Estudo clínico .....</b>	<b>50</b>
<b>2 - Análise metabolômica .....</b>	<b>52</b>
<b>2.1 - Materiais e métodos .....</b>	<b>52</b>
<b>2.2 - Análise metabolômica de amostras de plasma por CE-MS .....</b>	<b>52</b>
<b>2.2.1 – Instrumentação .....</b>	<b>52</b>
<b>2.2.2 - Preparo de amostra .....</b>	<b>52</b>
<b>2.2.3 - Análise de plasma por CE-MS .....</b>	<b>53</b>
<b>2.2.4 - Tratamento de dados .....</b>	<b>53</b>
<b>2.2.5 - Identificação dos compostos significativos .....</b>	<b>54</b>
<b>2.3 - Análise metabolômica de amostras de plasma por GC-MS .....</b>	<b>54</b>
<b>2.3.1 – Instrumentação .....</b>	<b>54</b>
<b>2.3.2 - Preparo de amostra .....</b>	<b>55</b>
<b>2.3.3 – Análise de plasma por GC-MS .....</b>	<b>55</b>
<b>2.3.4 - Tratamento de dados .....</b>	<b>55</b>

<b>2.4 - Análise metabolômica de amostras de plasma por RPLC-MS no modo positivo e negativo de ionização</b>	<b>56</b>
2.4.1 – Instrumentação	56
2.4.2 - Preparo de amostra	56
2.4.3 - Análise de plasma por RPLC-MS	56
2.4.4 - Tratamento de dados	57
2.4.5 - Identificação dos compostos significativos	58
<b>2.5 - Análise metabolômica de amostras de urina por RPLC-MS no modo positivo</b>	<b>58</b>
2.5.1 – Instrumentação	58
2.5.2 - Preparo de amostra	58
2.5.3 - Análise de urina por RPLC-MS	59
2.5.4 - Tratamento de dados	59
2.5.5 - Identificação dos metabólitos significativos	60
<b>2.6- Análise metabolômica de amostras de urina por HILIC-MS no modo positivo e negativo</b>	<b>60</b>
2.6.1 – Instrumentação	60
2.6.2 - Otimização do preparo de amostras de urina para HILIC-MS	60
2.6.3 - Otimização cromatográfica de urina por HILIC-MS	61
2.6.4 – Tratamento de dados da otimização de preparo de amostras e cromatográfica	62
2.6.5 - Análise metabolômica de urina por HILIC-MS	62
2.6.6 - Tratamento de dados	63
2.6.7 - Identificação dos compostos significativos	63
<b>3 – Bibliografia</b>	<b>64</b>

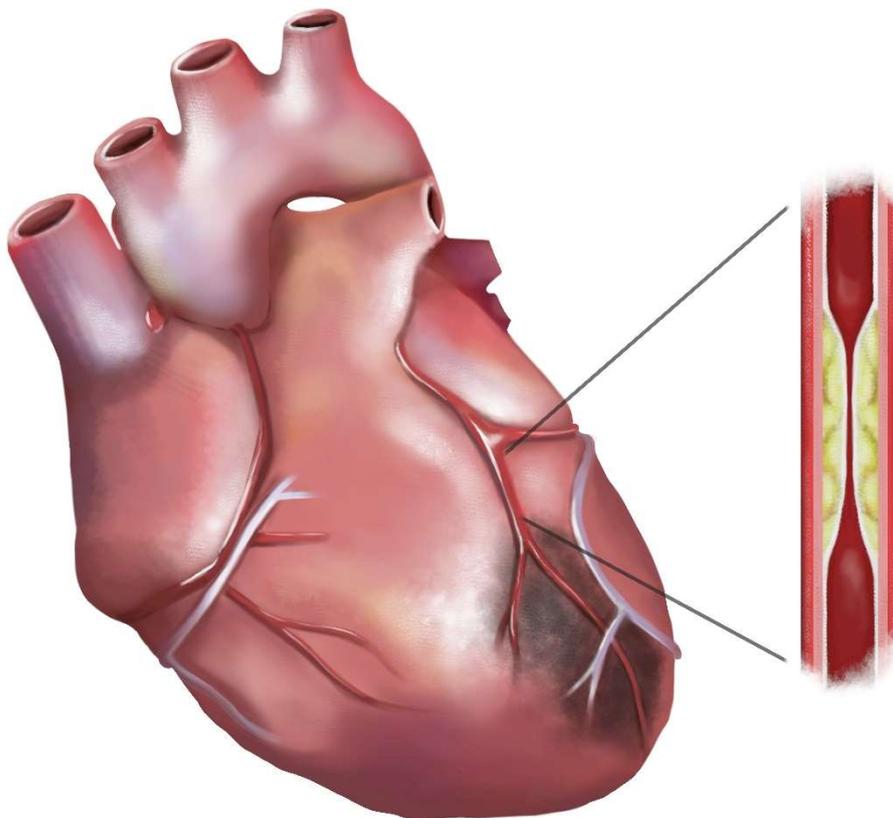
<b>Capítulo 4 – Resultados e Discussão .....</b>	<b>66</b>
<b>1 - Análise metabolômica global multiplataforma de plasma .....</b>	<b>67</b>
<b>2 - Análise metabolômica global multiplataforma de urina .....</b>	<b>101</b>
<b>3 - Discussão biológica .....</b>	<b>122</b>
<b>3.1 - Ésteres de colesterol .....</b>	<b>122</b>
<b>3.2 - Metabolismo de glicerolipídios e glicerofosfolipídios .....</b>	<b>124</b>
<b>3.3 - Ácido araquidônico .....</b>	<b>128</b>
<b>3.4 - Metabolismo de esfingolipídios .....</b>	<b>130</b>
<b>3.5 - Metabolismo de ácidos graxos, acilcarnitinas e aminoácidos ramificados .....</b>	<b>132</b>
<b>3.6 - Síntese da glutathione .....</b>	<b>137</b>
<b>4 – Bibliografia .....</b>	<b>138</b>
<b>Capítulo 5 – Conclusões .....</b>	<b>144</b>
<b>1 – Conclusões .....</b>	<b>145</b>
<b>Apêndices .....</b>	<b>147</b>
<b>Tabela Suplementar 1 .....</b>	<b>148</b>
<b>Tabela Suplementar 2 .....</b>	<b>171</b>
<b>Súmula Curricular .....</b>	<b>198</b>

# **Capítulo 1 – Introdução**

## 1 - Infarto agudo do miocárdio

Segundo a OMS (Organização Mundial da Saúde), a maior causa de morte no ano de 2019 foram as doenças cardiovasculares, totalizando aproximadamente 9 milhões de vítimas, representando 16% do total de mortes do ano<sup>1</sup>. Dentre as doenças cardiovasculares, o infarto do miocárdio é a maior causa de morbidade e mortalidade no mundo<sup>2</sup>.

O infarto do miocárdio é considerado uma necrose de cardiomiócitos (células do músculo cardíaco), devido à isquemia prolongada<sup>3</sup>, causada principalmente por placas vulneráveis à ruptura ou erosão, que promovem a oclusão parcial ou completa de artérias coronárias (Figura 1), que ocasiona cerca de 70% de eventos fatais de infarto do miocárdio<sup>2</sup>.



**Figura 1** - Representação de um coração com necrose de uma parte do músculo cardíaco e artérias coronárias obstruídas que causam o infarto agudo do miocárdio.

A isquemia do miocárdio é o primeiro estágio do desenvolvimento do infarto, e é normalmente diagnosticada a partir do histórico do paciente, do exame de eletrocardiograma (ECG, do inglês *electrocardiogram*)<sup>3</sup> e da medida de biomarcadores de necrose cardíaca, como as troponinas cardíacas e a fração MB da creatinofosfoquinase (CK-MB, (do inglês *MB fraction of creatine kinase*)<sup>4</sup>. Os pacientes com isquemia cardíaca podem apresentar fadiga, dispnéia e/ou combinações variáveis de desconfortos difusos no peito, nas extremidades

superiores, mandíbula ou epigástrico, que geralmente duram por mais de 20 minutos e podem ser acompanhados de sudorese, náusea ou desmaio<sup>3</sup>.

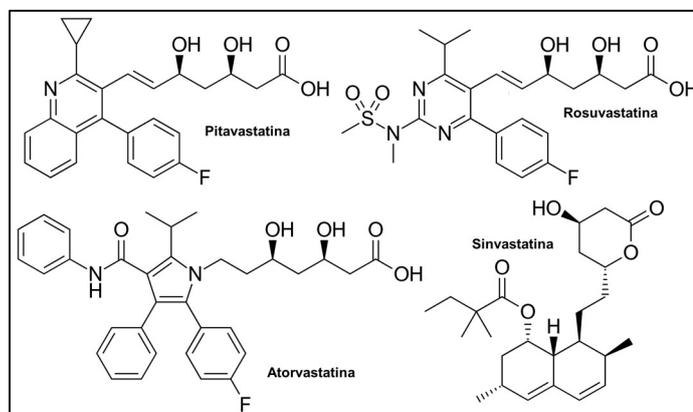
No estudo INTERHEART realizado em 52 países, anormalidades lipídicas (razão ApoB/ApoA1), tabagismo, histórico de hipertensão ou diabetes, obesidade abdominal e fatores psicossociais foram associados a um aumento de risco de ocorrência do infarto do miocárdio, enquanto que o consumo regular de frutas e vegetais, o consumo moderado de álcool e atividade física regular foram associados à redução de risco<sup>5</sup>.

Em 2018, o infarto agudo do miocárdio (IAM) foi responsável por mais de 119 mil óbitos no Brasil, de acordo com dados disponibilizados no DATASUS<sup>6</sup>. Indivíduos que sobrevivem ao infarto do miocárdio são mais propensos à reincidência do infarto e apresentam uma taxa anual de morte de 5%, ou seja, uma taxa cerca de seis vezes maior, que a de indivíduos de mesma idade que não possuem doenças cardíacas coronárias<sup>7</sup>. Assim, o estudo de tratamentos eficazes após um episódio de infarto agudo do miocárdio é de extrema importância.

## 2 - Estatinas e anti-plaquetários no tratamento do infarto do miocárdio

A necrose completa das células do músculo cardíaco em risco devido à isquemia é progressiva<sup>8</sup>, e pode levar duas ou mais horas, dependendo de alguns fatores como a sensibilidade dos miócitos à isquemia, demanda do miocárdio por oxigênio e nutrientes, circulação colateral à zona isquêmica e/ou oclusão coronária arterial persistente ou intermitente<sup>3</sup>. Mesmo após a perda de massa de miocárdio viável cessar, a região infartada pode se expandir ou contrair durante as primeiras semanas, o que é de extrema importância para o prognóstico do paciente<sup>8</sup>. Alguns tratamentos podem auxiliar na recuperação e no prognóstico de pacientes que tiveram IAM, como o uso de estatinas e antiplaquetários.

As estatinas são inibidores da 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase (HMG-CoA redutase), uma enzima da via de produção do mevalonato, um intermediário do colesterol, e são comumente utilizadas no controle dos níveis de colesterol (Figura 2). Além de sua ação hipolipidêmica, outros efeitos



**Figura 2** - Estruturas de algumas estatinas.

pleiotrópicos benéficos das estatinas, como melhora da função endotelial, redução do estresse

oxidativo, menor adesão de plaquetas e aumento da estabilidade de placas ateroscleróticas, vêm sendo estudados<sup>9,10</sup>. Com relação ao infarto agudo de miocárdio, vários estudos apontam benefícios do uso de estatinas<sup>10,11,12</sup>, e a sociedade europeia de cardiologia (ESC, do inglês *European Society of Cardiology*) recomenda sua administração precoce, e em altas doses, para pacientes que sofreram um infarto agudo do miocárdio, independentemente de seus níveis de colesterol<sup>13</sup>.

Na revisão da literatura de Ludman *et al.*, foram compilados estudos com animais e administração de estatinas previamente à reperfusão do miocárdio<sup>a</sup>, que demonstraram a diminuição da massa infartada com essa terapia<sup>11,10</sup>.

No estudo MIRACL (Myocardial Ischemia Reduction with Aggressive Cholesterol Lowering), envolvendo 3086 pacientes em 122 centros no mundo, os pacientes que receberam atorvastatina ao invés de placebo, entre 24 e 96 horas após a hospitalização, apresentaram menos casos de acidentes vasculares cerebrais e de re-hospitalização de emergência devido à isquemia, no período de acompanhamento clínico de 16 semanas<sup>12</sup>.

No estudo de Sposito *et al.* de pacientes com IAM, a dose alta e precoce de sinvastatina (nas primeiras horas de admissão) conferiu atenuação do estresse oxidativo e da atividade inflamatória, melhora na produção de NO e da função vasomotora endotelial<sup>11</sup>.

Dentre as estatinas, a sinvastatina é uma estatina hidrofóbica amplamente empregada para tratamento e prevenção primária e secundária de doenças cardiovasculares, devido a sua eficiência e relativo baixo custo (patente expirada)<sup>14</sup>. Apesar da eficácia da sinvastatina, há evidências que a rosuvastatina, uma estatina hidrofílica, é mais potente na diminuição dos níveis de colesterol<sup>15</sup>, e apresenta benefícios no tratamento e prevenção secundária do IAM<sup>16,17</sup>.

No estudo de Chitose *et al.*, comparando a rosuvastatina (hidrofílica) e a atorvastatina (hidrofóbica), no tratamento e prevenção secundária de pacientes que sofreram um infarto agudo do miocárdio, com supradesnível do segmento ST<sup>b</sup>, verificou-se que em termos de níveis de colesterol, não houve diferença entre os dois tratamentos, porém, o uso da estatina hidrofílica (rosuvastatina) levou a uma melhora na fração de ejeção do ventrículo esquerdo e um aumento do índice de salvamento do miocárdio<sup>16</sup>.

As estatinas hidrofóbicas, como a sinvastatina e a atorvastatina, são metabolizadas principalmente pelo sistema do citocromo P450, exceto a pitavastatina, enquanto que as estatinas hidrofílicas, como a rosuvastatina, não são significativamente metabolizadas por essa

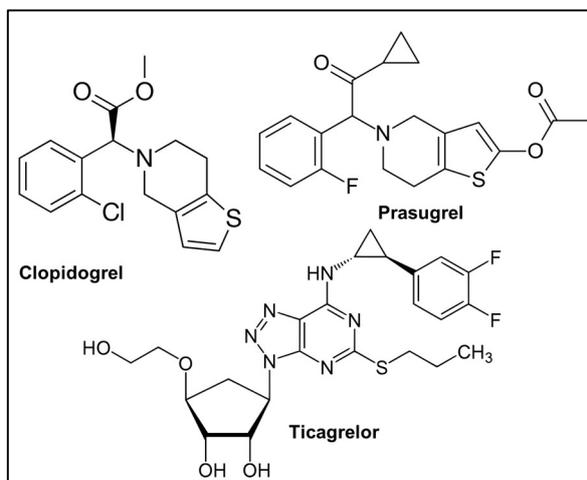
---

<sup>a</sup> Tratamentos para a recuperação da circulação.

<sup>b</sup> Uma alteração medida pelo exame de eletrocardiograma. O supradesnível do segmento ST é associado a isquemia do miocárdio.

via<sup>18</sup>. O sistema CYP450 é responsável pelo metabolismo de outros fármacos que podem interagir com as estatinas hidrofóbicas<sup>18</sup>, como o antiplaquetário clopidogrel<sup>19</sup>, que é frequentemente administrado em casos de IAM.

Antiplaquetários são recomendados no tratamento de pacientes que sofreram IAM, devido à redução de incidentes isquêmicos adversos<sup>20</sup>. Na intervenção coronária percutânea primária, procedimento comum para reperfusão do miocárdio, recomenda-se o uso de terapia antiplaquetária dual, com a administração concomitante de aspirina e um bloqueador de receptor de ADP (P2Y<sub>12</sub>), como clopidogrel, prasugrel ou ticagrelor (Figura 3)<sup>13</sup>.



**Figura 3** - Estruturas de fármacos bloqueadores de receptor de ADP.

O clopidogrel é um pró-fármaco da classe das tienopiridinas, muito empregado no tratamento de síndromes coronárias agudas, que sofre vasta metabolização até a formação do metabólito tiol ativo<sup>20</sup>. Este, por sua vez inibe irreversivelmente a proteína P2Y<sub>12</sub>, que é um dos principais receptores de ADP responsáveis pela agregação plaquetária<sup>20,21</sup>.

No estudo CLARITY-TIMI (Clopidogrel as Adjunctive Reperfusion Therapy–Thrombolysis in Myocardial Infarction), a administração de clopidogrel frente ao placebo, previamente à intervenção coronária percutânea em pacientes com IAM, com supradesnível no segmento ST, reduziu a incidência de complicações isquêmicas e mortes por problemas cardiovasculares<sup>22</sup>.

Por muitos anos, o bloqueador do receptor de ADP mais recomendado foi o clopidogrel, porém novos fármacos mais potentes, com ação mais rápida e previsível, prasugrel e ticagrelor, foram recomendados como classe IB, enquanto que o clopidogrel como IC para o tratamento de síndrome coronária aguda<sup>20</sup>. No estudo PLATO (PLAtelet inhibition and patient Outcomes) de comparação dos fármacos clopidogrel (tratamento convencional) e ticagrelor em 18.624 pacientes com síndrome aguda coronária, observou-se redução da mortalidade total e por problemas cardiovasculares associada ao uso de ticagrelor<sup>23</sup>. No estudo SWEDEHEART o uso de ticagrelor também foi associado a melhores desfechos, como um menor risco de morte, infarto do miocárdio e derrame, apesar disso, observou-se um maior risco de sangramentos com o uso do ticagrelor em comparação ao clopidogrel<sup>24</sup>.

O ticagrelor é o único inibidor reversível da proteína P2Y<sub>12</sub> aprovado pelo FDA<sup>22</sup>, e há evidências de que seus benefícios para doenças cardiovasculares vão além da inibição do receptor P2Y<sub>12</sub>, com o aumento do nível de adenosina no plasma comprovado pelo estudo de Bonello *et al.*<sup>25</sup> A adenosina contribui para a vasodilatação arterial, reduz efeitos anti-inflamatórios e contribui para o efeito antiplaquetário, entre outros<sup>26</sup>.

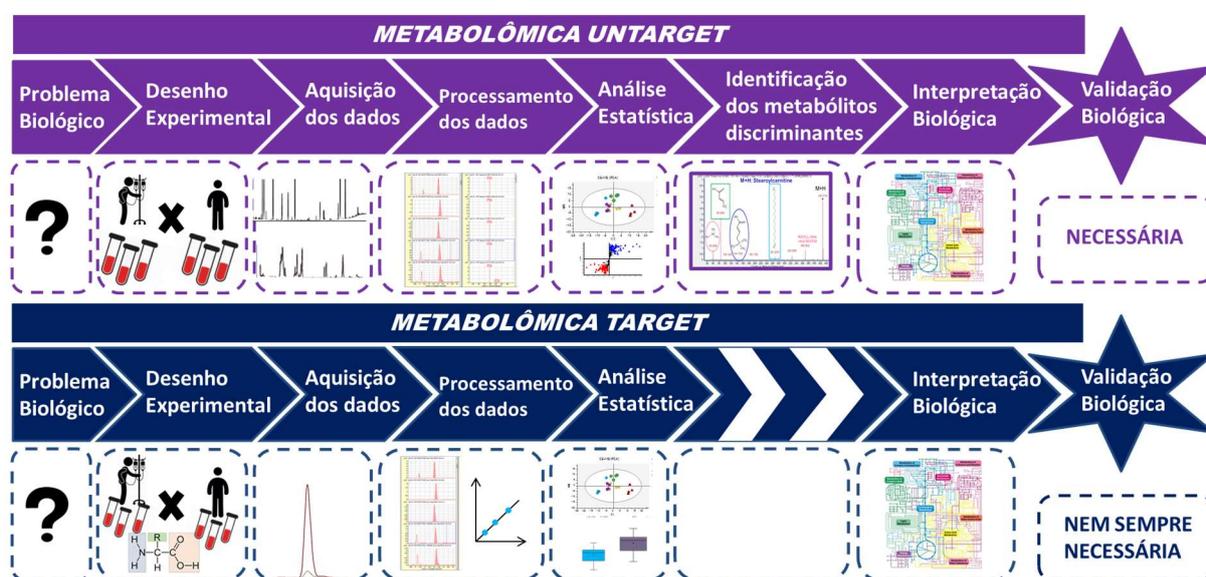
Há evidências de que o uso simultâneo de estatinas e antiplaquetários inibidores do receptor P2Y<sub>12</sub> proporciona efeitos sinérgicos, como melhora nas ações antitrombóticas e na microcirculação coronariana<sup>27</sup>. No estudo de Schmidt *et al.*, o uso conjunto de clopidogrel e estatina foi associado a uma redução na taxa dos principais eventos cardiovasculares adversos (IAM, acidente vascular cerebral isquêmico, trombose de *stent*, necessidade de revascularização da lesão alvo e morte cardíaca), em um ano, em pacientes que passaram por implante coronário de *stent*<sup>28</sup>. Assim, o estudo de sinergia entre esses tipos de medicamentos pode proporcionar melhora no prognóstico de pacientes com IAM.

### 3 - Metabolômica

Atualmente, as ciências “ômicas”, como genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica, são amplamente utilizadas para uma maior compreensão dos mecanismos de funcionamento celular dos organismos a nível molecular<sup>29</sup>. Dentre as ciências ômicas, a metabolômica é a que proporciona uma visão mais próxima ao fenótipo de um organismo. Ainda, é uma abordagem que fornece informações dinâmicas do metabolismo de um organismo, e como ele responde a fatores externos, como uma doença, um tratamento, uma dieta, exposição a compostos tóxicos, entre outros<sup>30</sup>.

A metabolômica baseia-se em estudos comparativos dos metabólitos de uma amostra biológica, como biofluidos, tecidos e células, em grupos controle e teste e/ou estudos temporais. Nesse sentido, duas abordagens diferentes podem ser empregadas: a metabolômica alvo (*target*), em que um ou mais metabólitos pré-determinados são quantificados ou semi-quantificados<sup>31</sup>, ou a metabolômica global (*untarget*), em que o maior número possível de metabólitos é analisado numa amostra biológica. A metabolômica *untarget* pode gerar hipóteses sobre o problema biológico estudado, uma vez que são analisados de uma vez diversos metabólitos, que são produtos intermediários ou finais de diversas reações enzimáticas. No sentido contrário, usualmente a abordagem *target* é utilizada em estudos em que há uma hipótese a ser avaliada<sup>32</sup>.

Nos últimos anos também vem sendo empregados estudos *multi-target*, em que muitos metabólitos pré-determinados de diferentes classes são medidos simultaneamente de forma semi-quantitativa ou quantitativa. Apesar desses estudos serem considerados *target* a priori, a abrangência de classes de metabólitos medidos simultaneamente fornece características de um estudo *untarget*, sem uma hipótese pré-determinada. A vantagem dos estudos *multi-target* está na confiabilidade da identificação dos metabólitos e na quantificação absoluta deles, como realizado em vários estudos na literatura<sup>33</sup>. No entanto, a desvantagem desse tipo de estudo é a limitação do número de metabólitos medidos, podendo excluir metabólitos que seriam importantes na interpretação biológica dos dados e validação biológica (Figura 4).



**Figura 4** - Fluxo de trabalho da metabolômica *untarget* (roxo) e *target* (azul).

Inicialmente há um problema biológico a ser estudado, como a busca por candidatos a biomarcadores de doenças<sup>34,35</sup>, uma melhor compreensão das alterações no metabolismo devido a tratamentos terapêuticos<sup>35</sup>, ou mudança de dieta<sup>36</sup>, a busca por informações sobre os efeitos fenotípicos de alterações genéticas<sup>37</sup> e sobre os mecanismos de ação de fármacos<sup>38</sup>, entre outros.

A partir do problema biológico, um desenho experimental é definido, a fim de planejar o estudo. Nessa etapa estabelece-se a abordagem metabolômica a ser empregada (*target*, *untarget* ou *multi-target*), o organismo a ser utilizado, o(s) tipo(s) e tamanho(s) da amostra, as condições experimentais em que o organismo será submetido, as condições em que a amostra será coletada e armazenada até análise, as técnicas analíticas a serem empregadas, entre outros, sendo que todas essas etapas devem ser padronizadas.

A amostragem envolve uma etapa de *quenching metabólico* para interromper a atividade enzimática, que pode ser realizada pela refrigeração imediata das amostras a baixas temperaturas ( $\leq 20$  °C), adição de solventes gelados à amostra, modificações bruscas de pH, entre outros<sup>39</sup>. A atividade enzimática residual pode alterar consideravelmente o nível de alguns metabólitos, podendo levar a conclusões espúrias. Alguns métodos diferentes e mais modernos de amostragem envolvem a coleta por dispositivos de sangue seco (DBS, do inglês *dried blood spot*), a microdissecção a laser como técnica de amostragem para estudos de uma única célula, além de amostragens *in vivo* por microdiálise ou uso de sondas de microextração de fase sólida (SPME, do inglês *solid-phase microextraction*)<sup>40,41</sup>. Após a amostragem, as amostras geralmente são armazenadas a baixas temperaturas (-40 °C, -80 °C).

O preparo de amostra depende da amostra, da técnica analítica e do tipo de abordagem metabolômica empregada. Para a abordagem metabolômica *untarget*, o preparo de amostra deve ser simples, rápido, reprodutível e não-seletivo, como a desproteneização e extração de metabólitos com solventes orgânicos ou ultracentrifugação (com o uso de filtros de corte de massa molecular) para biofluidos; a lavagem seguida por *lise*/ruptura e extração de metabólitos, em trabalhos com células e tecidos<sup>41</sup>.

Para estudos *target*, preparos de amostras com mais etapas e maior limpeza da amostra são adequados, e podem envolver extrações líquido-líquido, sólido-líquido, com colunas de extração em fase sólida ou de microextração em fase sólida<sup>39</sup>.

Em busca de uma maior frequência analítica e maior repetibilidade do preparo de amostras, alguns estudos estabeleceram protocolos de preparo de amostras automatizados ou semi-automatizados<sup>42,43</sup>.

A análise metabolômica consiste num grande desafio analítico devido à variação de concentração e diversidade de propriedades químicas e físicas dos metabólitos presentes em uma determinada amostra biológica. A concentração de diferentes metabólitos numa célula pode abranger várias ordens de grandeza, de pg/mL a mg/mL<sup>44</sup>. Enquanto que mRNAs são polímeros compostos por 4 nucleotídeos e as proteínas, biopolímeros compostos por 22 aminoácidos, os metabólitos podem apresentar diversas configurações e composições químicas, variando de compostos extremamente polares a compostos apolares e, por isso, há um grande desafio em encontrar um método analítico capaz de detectar todos os analitos em uma única análise<sup>45</sup>. Além disso, ao contrário de RNA e DNA, os metabólitos não podem ser amplificados. Assim, muitas vezes os métodos analíticos são complementares em estudos metabolômicos.

Para acessar o metaboloma, poderosas ferramentas de análise são utilizadas, sendo as mais habituais a ressonância magnética nuclear (NMR, do inglês *nuclear magnetic resonance*) e a espectrometria de massas (MS, do inglês *mass spectrometry*), que geralmente é acoplada a técnicas de separação, como cromatografia gasosa (GC-MS, do inglês *gas chromatography coupled to mass spectrometry*), cromatografia líquida (LC-MS, do inglês *liquid chromatography coupled to mass spectrometry*) e eletroforese capilar (CE-MS, do inglês *capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry*)<sup>46</sup>.

O uso de NMR é frequente em estudos metabolômicos, devido a robustez, simplicidade de preparo de amostra, rapidez e a característica não-destrutiva da técnica<sup>47</sup>. A ressonância magnética nuclear é baseada na interação de radiação eletromagnética, proveniente de um campo magnético externo, com núcleos atômicos que possuem *spin* nuclear diferente de zero. A absorção de energia com uma determinada radiofrequência leva a transições entre o estado excitado e fundamental. O retorno ao estado fundamental libera energia, que é convertido nos sinais observados no espectro de NMR. Esse processo depende do tipo de átomo e do ambiente químico em que ele se encontra (sua estrutura química/ matriz).

Os experimentos de <sup>1</sup>D <sup>1</sup>H NMR são os mais empregados para estudos metabolômicos envolvendo NMR, devido à abundância de núcleos <sup>1</sup>H nas amostras e nos metabólitos, a facilidade de preparo de amostra para esse tipo de experimento, geralmente envolvendo a adição de um solvente deuterado e a facilidade de automação<sup>48</sup>. Além disso, a existência de bancos de dados públicos com centenas de espectros de metabólitos, e ferramentas computacionais automatizadas ou semi-automatizadas, facilitam a etapa de identificação e processamento de dados. Essas características tornam essa plataforma uma boa opção para estudos longitudinais e de larga escala em comparação ao uso de LC-MS e GC-MS. No entanto, deve-se ressaltar que os espectros de <sup>1</sup>H NMR de amostras biológicas são complexos e apresentam muitas sobreposições de sinais. Além disso, diferenças no pH, na força iônica e outros efeitos de matriz de amostras biológicas complexas podem levar a desvios no deslocamento químico, entre as amostras de um mesmo estudo, que devem ser levados em consideração no tratamento de dados, utilizando algoritmos específicos como o BATMAN desenvolvido por Ebbels e colaboradores<sup>49</sup>.

Além de espectros de <sup>1</sup>D <sup>1</sup>H NMR, pode-se obter também espectros com outros núcleos interessantes para metabólitos, como <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N e <sup>31</sup>P, apesar do aumento do tempo de análise e problemas de detectabilidade, especialmente dos núcleos com baixa abundância natural, como <sup>13</sup>C (1,1%) e <sup>15</sup>N (0,36%), para experimentos sem marcação isotópica. Ainda, podem ser empregados métodos de NMR multidimensionais, como <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY (do inglês *correlated*

*spectroscopy*),  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY (do inglês *total correlation spectroscopy*),  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC (do inglês *heteronuclear single-quantum correlation*), entre outros, que auxiliam na identificação inequívoca de alguns metabólitos que dificilmente são identificados por  $^1\text{H}$  NMR, devido à sobreposição de sinais do espectro de uma dimensão. No entanto, o uso de técnicas de 2D de NMR acarreta em perdas de detectabilidade e de velocidade de aquisição de dados<sup>50</sup>.

O NMR também pode ser empregado em estudos metabolômicos de imageamento com análise direta de amostras sólidas ou semi-sólidas, como tecidos, órgãos e células, por experimentos de ressonância magnética nuclear de alta resolução com giro no ângulo mágico<sup>48</sup>.

Outro tipo de experimento interessante para estudos metabolômicos é o NMR quantitativo, que pode ser realizado com a adição de um padrão a amostra. No entanto a complexidade das amostras biológicas, com presença de macromoléculas ou lipoproteínas, pode interferir na quantificação de alguns compostos, que podem ser resolvidas por preparos de amostras com remoção desses interferentes<sup>51</sup>. Assim, geralmente estudos quantitativos de metabolômica são realizados por LC-MS, GC-MS e CE-MS.

A maior desvantagem de NMR frente à espectrometria de massas para estudos metabolômicos é a baixa detectabilidade, com limites de detecção inferiores geralmente de 10 a 100 vezes mais altos do que são obtidos com técnicas de separação acopladas à espectrometria de massas. Esses problemas de detectabilidade podem ser melhorados com o uso de equipamentos com campos magnéticos mais fortes, de micro-sondas e crio-sondas, além de métodos de hiperpolarização. Ainda sim, devido à detectabilidade, o uso de LC-MS e GC-MS corresponde a mais de 80% dos trabalhos publicados em metabolômica<sup>48</sup>.

A espectrometria de massas é uma técnica mais sensível que a ressonância magnética nuclear e o acoplamento de MS com técnicas de separação minimiza problemas de supressão iônica, torna o espectro de massas menos complexo e fornece um parâmetro a mais para a identificação, o tempo de retenção/migração. As vantagens do uso de MS, assim como avanços tecnológicos nos últimos anos, com equipamentos com maior resolução, exatidão e detectabilidade, além de melhora na velocidade de ciclos de trabalho e na faixa dinâmica dos equipamentos, têm alavancado seu uso na metabolômica<sup>52</sup>.

A espectrometria de massas baseia-se na manipulação de íons gasosos sob vácuo e um campo elétrico a fim de separá-los de acordo com sua razão massa e carga ( $m/z$ ). Os espectrômetros de massas são compostos por uma fonte de introdução de amostras, uma fonte de ionização, um ou mais analisadores de massas e um sistema de detecção do sinal. Os analisadores de massas são o coração do espectrômetro de massas, e podem funcionar de diferentes maneiras, resultando em equipamentos com diferentes funcionalidades.

Duas abordagens comuns da espectrometria de massas em estudos metabolômicos envolvem a detecção dos compostos por métodos de monitoramento de reações múltiplas e a detecção de compostos por métodos de *full scan*. Geralmente os experimentos de monitoramento de reações múltiplas são realizados em equipamentos com analisadores do tipo triplo quadrupolo ou *ion trap*, em trabalhos de metabolômica *target* ou *multi-target*, devido à detectabilidade e especificidade desse tipo de experimento, propício para a quantificação absoluta de metabólitos, mas não tão indicado para a identificação de compostos desconhecidos<sup>53</sup>.

O uso de analisadores de massas de alta resolução, como o tempo-de-vôo (TOF, do inglês *time-of-flight*) ou Orbitrap (Thermo Scientific), é crucial em trabalhos de metabolômica *untarget*, pois facilitam a etapa de identificação dos compostos pela exatidão na medida de  $m/z$ <sup>53</sup>. Além disso, muitos desses equipamentos são acoplados a outros analisadores de massas, sendo possível a realização de experimentos de MS/MS, contribuindo ainda mais para a identificação dos metabólitos.

Alguns estudos empregam a injeção direta de amostras biológicas no espectrômetro de massas, porém devido à complexidade desse tipo de amostras, os estudos metabolômicos geralmente utilizam uma técnica de separação acoplada ao espectrômetro de massas, como GC-MS, LC-MS e CE-MS, que minimizam efeitos de supressão iônica.

Uma das técnicas de separação acopladas à espectrometria de massas mais utilizadas em estudos de metabolômica é GC-MS, devido a características de robustez, alta repetibilidade e resolução<sup>54</sup>.

As fontes de ionização aplicadas em estudos metabolômicos por GC-MS são ionização por elétrons (EI, do inglês *electron ionization*) ou ionização química (CI, do inglês *chemical ionization*), sendo que a mais empregada é EI. A ionização por elétrons é bastante energética e gera extensa fragmentação dos compostos na fonte de forma reprodutível. Devido a reprodutibilidade dos espectros gerados por EI há disponibilidade de bibliotecas de compostos, que podem ser utilizadas para a identificação dos metabólitos, como a FiehnLib<sup>55</sup> e *The Golm Metabolome Database*<sup>56</sup>, específicas para metabólitos, ou bibliotecas mais gerais com muitos compostos, como a da NIST ([chemdata.nist.gov](http://chemdata.nist.gov)). Outra vantagem do uso da fonte de EI é poder trabalhar com um espectrômetro de massas de baixa resolução, como um quadrupolo simples, que possui um custo de aquisição e manutenção consideravelmente menor que analisadores de massas de alta resolução, sem perder muita qualidade na identificação dos compostos, devido a repetibilidade do sistema, a riqueza dos espectros de fragmentação e a existência de bibliotecas com muitos metabólitos<sup>44</sup>.

A análise de GC-MS é ideal para compostos voláteis, no entanto, geralmente é empregada para a análise de metabólitos polares de baixa massa molecular (50-600 Da), que devem ser derivatizados. Usualmente duas etapas de derivatização são empregadas, sendo uma etapa de metoximação e uma etapa de sililação, que em geral emprega reagentes de trimetilsililação, que são sensíveis à presença de água. Assim, também é necessária uma etapa de secagem da amostra antes da derivatização das amostras. Os hidrogênios ácidos de grupos funcionais como ácido carboxílico (-COOH), álcool (OH), aminas (-NH<sub>2</sub>), e tiols (-SH) podem ser derivatizados por alquilação, acilação ou sililação. A etapa de derivatização, além de ser longa e laboriosa, pode introduzir perdas e variabilidade no processo, e limita o número de amostras que podem ser preparadas de uma só vez (cerca de 0-50 amostras). Além disso, as amostras derivatizadas devem ser analisadas em até 24-48h após seu preparo<sup>44</sup>.

Assim, nos últimos anos esforços vem sendo feitos para minimizar o tempo de derivatização e/ou aumentar a repetibilidade do processo, como teste de novos reagentes e/ou protocolos<sup>57</sup> e automação da derivatização das amostras, para análise logo após a derivatização, empregando sistemas robotizados<sup>58</sup>.

LC-MS é a técnica analítica mais empregada em estudos metabolômicos, devido a simplicidade do preparo de amostras quando comparada a GC-MS e sua versatilidade para a análise de compostos polares e apolares<sup>59</sup>.

A fonte de ionização mais utilizada em trabalhos de metabolômica por LC-MS é a fonte de ionização por eletrospray (ESI, do inglês *electrospray ionization*). Essa fonte de ionização é branda, produzindo geralmente moléculas protonadas/desprotonadas e/ou cationizadas/anionizadas. Esse tipo de fonte de ionização minimiza a fragmentação das moléculas, ao contrário da ionização por EI. Dessa forma, como não há um espectro de fragmentação característico para moléculas analisadas em modo *full scan*, os trabalhos de metabolômica por LC-MS geralmente empregam analisadores de massas de alta resolução para trabalhos de metabolômica *untarget*, a fim de auxiliar na etapa de identificação de metabólitos, um dos maiores desafios da metabolômica *untarget* por LC-MS<sup>60</sup>. Para a confirmação da identificação nesse caso é necessário realizar experimentos de MS/MS e/ou de adição de padrão analítico à amostra. Para estudos metabolômicos *target* ou *multi-target* analisadores de massas do tipo triplo-quadrupolo, de baixa resolução, são os mais empregados<sup>33</sup>.

A versatilidade da técnica reside no fato de existirem inúmeras colunas com uma grande variedade química de fases estacionárias disponíveis comercialmente. Dessa forma, ao modificar a fase móvel e a fase estacionária, pode-se separar compostos com polaridades muito distintas.

Para compostos apolares ou com baixa polaridade, emprega-se a cromatografia líquida de fase reversa acoplada a espectrometria de massas (RPLC-MS, do inglês *reversed-phase liquid chromatography coupled to mass spectrometry*), em que uma fase estacionária apolar e uma fase móvel contendo água e solvente orgânico, como fase móvel forte, são utilizados. Esse modo de cromatografia é o mais tradicional e o mais empregado em estudos de metabolômica.

Para metabólitos polares, geralmente utiliza-se a cromatografia líquida de interação hidrofílica acoplada à espectrometria de massas (HILIC-MS, do inglês *hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to mass spectrometry*), em que a fase estacionária é polar e a fase móvel é composta de uma mistura de solvente orgânico, em geral acetonitrila, e água, como solvente forte. Esses dois modos de cromatografia são complementares e possibilitam uma alta cobertura do metaboloma, com o uso de apenas um equipamento, alternando entre duas ou mais colunas diferentes, além da medida do espectrômetro de massas no modo positivo e negativo de ionização. Vale ressaltar que a ampla cobertura metabólica é atingida por LC-MS com diferentes análises da mesma amostra e não apenas em uma única análise.

Outras alternativas para compostos polares é a cromatografia líquida de fase reversa com pareamento iônico, que proporciona uma maior retenção de compostos polares.

A cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC, do inglês *ultra high-performance liquid chromatography*) utiliza colunas com partículas menores que 2  $\mu\text{m}$ , que resulta num ganho de resolução, detectabilidade e menor tempo de análise, com picos mais estreitos e maior capacidade de pico. Ainda, o uso de colunas menores possibilita o uso de volumes menores de amostra para injeção, o que pode ser uma vantagem para estudos com volume limitado de amostras. Esse tipo de cromatografia líquida necessita de equipamentos que suportam altas pressões e que possuam baixo volume morto, que vêm sendo aperfeiçoados ao longo do tempo<sup>52</sup>.

Outro avanço na cromatografia líquida foi o advento das colunas de núcleo sólido (*core-shell*), que assim como as colunas com partículas menores de 2  $\mu\text{m}$ , proporcionam uma maior eficiência na separação dos compostos, porém sem necessitar de equipamentos que suportam altas pressões<sup>59</sup>.

A disponibilidade de uma gama de fases estacionárias com diferentes grupos químicos, de partículas menores que 2  $\mu\text{m}$ , ou de núcleo sólido, também tem contribuído para a expansão e aplicação de LC-MS em estudos metabolômicos. Outro avanço dos últimos anos na cromatografia, e que pode beneficiar estudos metabolômicos, é o uso de colunas que suportam altas temperaturas. O uso de alta temperatura na cromatografia pode melhorar a performance cinética do método e diminuir o tempo de análise, com bons resultados, apesar de não ser

indicado para metabólitos que não sejam termicamente estáveis, e de ainda não haver muitas fases estacionárias comerciais disponíveis para tal uso<sup>52</sup>.

A espectrometria de massas também pode ser acoplada à eletroforese capilar para a análise de metabólitos altamente polares e ionizáveis. A técnica possui a vantagem de utilizar baixos volumes de amostras, com volume de injeção da ordem de nanolitros, consome menos reagentes e solventes orgânicos tóxicos do que LC-MS, o preparo de amostra é relativamente simples, e apresenta alta resolução e eficiência inerentes à técnica de separação.

Para trabalhos de metabolômica *untarget* por CE-MS, assim como para LC-MS, deve-se empregar um analisador de massas de alta resolução, para facilitar a identificação dos compostos. Para CE-MS, a ionização também é por eletrospray e o acoplamento entre a eletroforese capilar e o espectrômetro de massas é mais complicado do que para GC-MS ou LC-MS, e deve ser realizado com uma interface capaz de fechar o circuito elétrico referente ao sistema eletroforético e concomitantemente aplicar um potencial elétrico entre a fonte de íons e a entrada do espectrômetro de massas, para formação do eletrospray<sup>33</sup>.

A interface mais empregada em estudos metabolômicos por CE-MS é a que utiliza um líquido auxiliar coaxial com vazão na ordem de 5-10  $\mu\text{L}/\text{min}$ <sup>33</sup>. Essa interface fornece estabilidade na formação do spray, mas tem como desvantagem o fato de diluir o efluente da coluna capilar, que opera sob uma vazão da ordem de 20-100  $\text{nL}/\text{min}$ <sup>61</sup>, o que acarreta numa perda de detectabilidade. Assim, a técnica de CE-MS apresenta menor detectabilidade do que a obtida com LC-MS ou GC-MS<sup>59</sup>. Nos últimos anos desenvolveram-se algumas interfaces sem líquido auxiliar (*sheathless interface*), para contornar problemas de perda de detectabilidade, sendo a mais promissora a que utiliza uma ponta porosa na extremidade do capilar, em contato com um reservatório fechado, que contém os produtos de eletrólise, e está atualmente disponível comercialmente pela SCIEX. Para metabolômica *untarget* urinária o emprego da interface sem líquido auxiliar com ponta porosa gerou uma melhora de até duas ordens de grandeza na sensibilidade em relação à interface tradicional com líquido auxiliar<sup>62</sup>. O desenvolvimento e aprimoramento de interfaces para CE-MS pode levar a um maior uso da técnica em estudos de metabolômica.

Uma das desvantagens do uso de CE-MS em abordagens metabolômicas é a baixa repetibilidade dos tempos de migração, resultante de variações no fluxo eletrosmótico, e o desafio de obter uma configuração sensível, robusta e estável, necessária para estudos em larga escala<sup>52</sup>. Para contornar o problema da variabilidade dos tempos de migração, Schappler e colaboradores desenvolveram um software para converter os tempos de migração em

mobilidades eletroforéticas<sup>63</sup>. Dessa forma, bibliotecas de compostos com mobilidades eletroforéticas podem ser construídas, auxiliando a etapa de identificação dos metabólitos.

Outro avanço de CE-MS para estudos metabolômicos é o uso de injeção multisegmentada, que aumenta bastante a frequência analítica, se tornando atrativo para estudos com bastantes amostras<sup>64</sup>.

O uso de CE-MS também é atrativo em estudos em que há volumes limitados de amostras, como estudos de uma única célula, estudos com modelos de roedores, com lágrimas, entre outros.

Nos últimos anos observou-se que CE-MS vem sendo empregada como uma técnica complementar à RPLC-MS e até mesmo à HILIC-MS, em estudos que empregam multiplataformas analíticas<sup>65</sup>.

Outros experimentos interessantes com o uso de espectrometria de massas em metabolômica são os estudos de imageamento de tecidos, órgãos ou células empregando espectrometria de massas por dessorção/ionização a laser auxiliada por matriz, de íons secundários, por ionização de dessorção por electrospray, entre outros métodos que ainda precisam ser mais explorados e desenvolvidos<sup>66</sup>.

Cada técnica analítica possui características próprias, vantagens e desvantagens (Tabela 1) e nenhuma é capaz de medir todo o metaboloma de uma amostra biológica, assim estudos empregando multiplataformas analíticas proporcionam uma maior cobertura analítica, aumentando a chance de obter informações relevantes ao problema biológico estudado.

**Tabela 1-** Características das técnicas analíticas comumente empregadas em metabolômica

	<b>NMR</b>	<b>GC-MS</b>	<b>LC-MS</b>	<b>CE-MS</b>
<b>Detectabilidade</b>	+	+++	+++	++
<b>Repetibilidade</b>	++++	+++	++	+
<b>Resolução</b>	+	++++	++	+++
<b>Identificação de metabólitos</b>	++	++	+	+
<b>Frequência Analítica</b>	+++	+	++	++
<b>Custo da plataforma*</b>	+++ NMR de alto campo magnético	+ Quadrupolo simples +++ MS de alta resolução	+++ MS de alta resolução ++ Triplo quadrupolo	+++ MS de alta resolução ++ Triplo quadrupolo
<b>Quantificação</b>	possível, com padrão interno	viável, com padrões e padrão(ões) interno(s)	viável, com padrões e padrão(ões) interno(s)	viável, com padrões e padrão(ões) interno(s)
<b>Preparo de amostra</b>	Simple	Complexo, geralmente com derivatização	Média dificuldade	Média dificuldade
<b>Volume de injeção</b>	100-200 µL	1-2 µL	2-10 µL	1-20 nL
<b>Cobertura de metabólitos</b>	Polares e apolares	Voláteis ou passíveis de derivatização	RPLC: apolar HILIC: polar	Polares e ionizáveis

Obs. O número de “+” representa a qualidade da técnica para a característica descrita. A tabela foi baseada no trabalho de Segers *et al.*<sup>59</sup> e McGarrah *et al.*<sup>67</sup>.

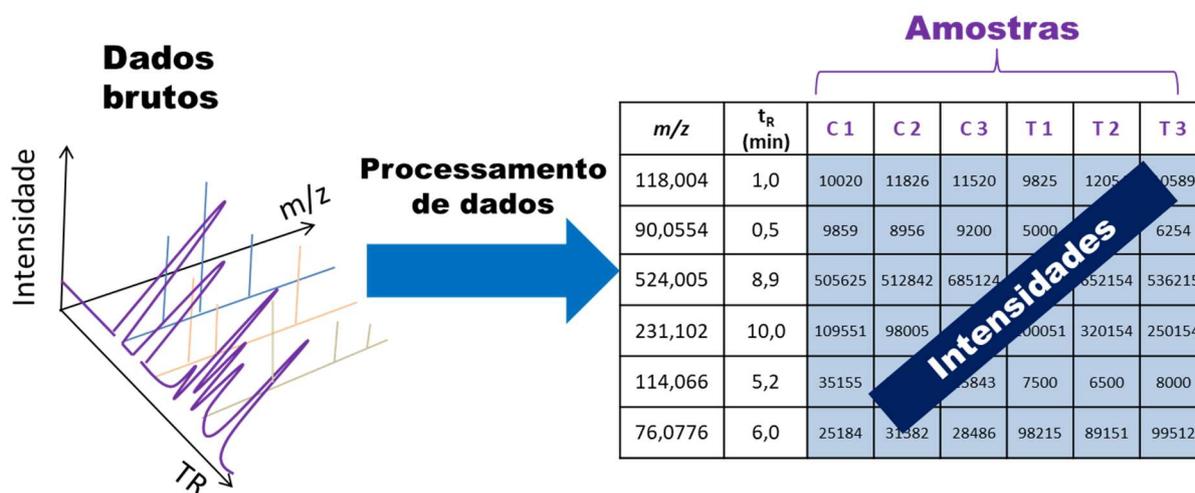
\* Para MS depende do espectrômetro de massas e para NMR do campo magnético, o número de “+” representa o maior custo.

Após o preparo de amostras, a aquisição dos dados é feita por espectrometria de massas ou NMR, gerando dados brutos de alta complexidade, que são processados para obtenção de matrizes de dados que possam ser analisadas por técnicas estatísticas.

Os dados brutos de técnicas de separação acopladas a espectrometria de massas de análises metabolômicas *untarget* geram dados complexos em três dimensões: intensidade,  $m/z$  e tempo de retenção/migração ( $t_R$ ). Assim o processamento de dados envolve as etapas de extração de *molecular features*<sup>c</sup>, correção/ alinhamento do tempo de retenção, agrupamento, e

<sup>c</sup> Os *molecular features* são metabólitos ainda não identificados, caracterizados por intervalos de  $m/z$  e tempo de retenção pré-definidos.

pode envolver também uma etapa de deconvolução em alguns casos. Uma matriz de dados com informações de  $m/z$  (ou massa neutra), tempo de retenção/migração e intensidade dos picos é gerada (Figura 5).



**Figura 5** - Representação do processamento de dados brutos de técnicas de separação acopladas à espectrometria de massas.

O tratamento de dados de estudos de metabolômica *untarget* de NMR envolve as etapas de faseamento (*phasing*), correção da linha de base, alinhamento e normalização.

Para o tratamento de dados de metabolômica *target* por técnicas de separação acopladas à MS, o tratamento de dados é mais simples, envolvendo a integração de picos de compostos e padrões internos pré-selecionados e a quantificação ou semi-quantificação desses metabólitos.

Para o processamento de dados de MS diferentes softwares comerciais, como Compound Discoverer (Thermo Scientific), MassHunter Profiler (Agilent Technologies), Progenesis QI (Waters Corporation), entre outros, ou softwares ou pacotes não comerciais como XCMS<sup>68</sup>, MAVEN<sup>69</sup>, MS-DIAL<sup>70</sup>, MZmine 2<sup>71</sup>, AMDIS (www.amdis.net/), Skyline<sup>72</sup> estão disponíveis. Para NMR, softwares comerciais, como Chenomx NMR Suite (Chenomx Inc.), PERCH (PERCH Solutions Ltd.), MestReNova (Mestrelab Res.), entre outros, e pacotes ou softwares não comerciais, como BATMAN<sup>49</sup>, NMRPipe<sup>73</sup>, rNMR<sup>74</sup>, etc. podem ser empregados.

A matriz de dados gerada, com informações de quantificação relativa ou absoluta é submetida à análise estatística multivariada, como análise de componentes principais (PCA, do inglês *principal component analysis*), análise discriminante por projeção em estruturas latentes (PLS-DA, do inglês *projection to latent structures-discriminant analysis*), análise discriminante por projeção em estruturas latentes ortogonal (OPLS-DA, do inglês *orthogonal*

*projection to latent structures-discriminant analysis*), análise de *clusters*, máquinas de vetores de suporte, entre outras<sup>75</sup>.

Uma das análises mais utilizadas em estudos metabolômicos é PCA um método não supervisionado, ou seja, em que a classe das amostras não é levada em consideração na construção do modelo. Além disso, o método reduz a dimensionalidade dos dados. A projeção dos dados originais resulta na redução de variáveis por meio de componentes principais, que são combinações lineares das variáveis iniciais, além de ortogonais entre si (não correlacionadas entre si). A primeira componente principal representa a maior variância dos dados, a segunda, a segunda maior variância, e assim por diante. Os dados de PCA podem ser visualizados de diferentes maneiras, sendo que o mais comum é pelos gráficos de escores entre duas ou mais componentes principais. Nesse gráfico, cada amostra é representada por um ponto do gráfico, assim pode-se observar a tendência natural dos dados e a presença de *outliers*<sup>76</sup>.

Modelos multivariados supervisionados também são muito utilizados em abordagens metabolômicas, como PLS-DA e OPLS-DA. Nesses modelos a classe das amostras é utilizada para a construção do modelo. A separação dos grupos é obtida por uma relação linear entre a matriz de variáveis preditoras (matriz de dados experimentais) e a matriz de variáveis de resposta (os grupos). Esses modelos são parecidos com o modelo de PCA, porém no modelo de PLS-DA, as componentes principais são rotacionadas para maximizar a separação entre as classes conhecidas. O modelo de OPLS-DA inclui um filtro de correção de sinal ortogonal ao modelo de PLS-DA. Dessa forma, há uma separação da variação da matriz de dados preditivos, da não correlacionada com a resposta. Alguns pesquisadores defendem que o uso desse filtro auxilia na identificação dos metabólitos discriminantes em relação ao modelo de PLS-DA<sup>77</sup>.

Os modelos multivariados supervisionados podem ter problemas de *overfitting* e, portanto, devem ser validados com testes de permutação<sup>78</sup> e validação cruzada<sup>79</sup>, por exemplo.

A matriz de dados também pode ser analisada por estatística univariada, por testes paramétricos, como o teste *t* ou ANOVA (do inglês *analysis of variance*), ou ainda por testes não-paramétricos, como teste de Mann-Whitney, ou Kruskal-Wallis, por exemplo. Devido a grande quantidade de variáveis obtidas em estudos ômicos, deve-se sempre aplicar correções para múltiplos testes, como a de Bonferroni, a de Benjamini-Hochberg, entre outras opções.

Os metabólitos significativamente alterados no estudo devem ter sua identificação confirmada, mediante experimentos de adição de padrões analíticos à amostra e/ou de MS/MS, além do uso de bibliotecas de espectros construídas por padrões analíticos, para espectrometria de massas, e por experimentos 2D para NMR. Alguns bancos de dados e ferramentas podem ser utilizados na etapa de identificação de metabólitos como o Metlin<sup>80</sup>, MassBank<sup>81</sup>, mzcloud

(www.mzcloud.org), MassBank of North America (mona.fiehnlab.ucdavis.edu), LIPID MAPS<sup>82</sup>, CEU Mass Mediator<sup>83</sup> para dados de MS, HMDB<sup>84</sup> para dados de MS e NMR, NMRShiftDB<sup>85</sup>, BioMagResBank, MetaboID<sup>86</sup>, <sup>1</sup>H(<sup>13</sup>C)-TOCCATA<sup>87</sup>, Chenomx NMR Suite (Chenomx Inc.) para dados de NMR, entre outros.

Os metabólitos identificados devem ser inseridos no contexto biológico do problema inicial, o que resulta num grande desafio, uma vez que modelos metabólicos em escala de genoma mostram que menos de 30% dos metabólitos participam de apenas duas reações, e cerca de 12% e 4% participam de mais de 10 ou 20 reações, respectivamente<sup>88</sup>. Alguns bancos de dados podem ser utilizados para auxiliar na interpretação biológica, como o KEGG<sup>89</sup>, MetaCyc<sup>90</sup>, HumanCyc<sup>91</sup>, BioCyc<sup>90</sup> e Reactome<sup>92</sup>. A interpretação biológica também envolve a consulta da literatura sobre o problema biológico, bem como a especialistas da área, evidenciando o caráter multidisciplinar dos estudos metabolômicos, uma área de ciência com colaboração de pesquisadores de diversas áreas.

Dependendo do resultado obtido, hipóteses sobre o problema biológico são criadas e devem ser validadas. Em muitos casos, a validação biológica não é executada. Idealmente deve ser realizada com um novo experimento, que pode envolver a análise *target* dos metabólitos discriminantes, num novo grupo amostral com um grande número de amostras<sup>93</sup>, ou por outros experimentos que não envolvam metabolômica, mas que comprovem a hipótese gerada<sup>94</sup>.

A metabolômica ainda é uma ciência relativamente nova, e poucos metabólitos provenientes de estudos metabolômicos foram validados para a prática clínica. Barbas e colaboradores escreveram um artigo de revisão bibliográfica crítico sobre a validação biológica de biomarcadores em estudos metabolômicos. Na revisão bibliográfica, os autores pesquisaram trabalhos publicados entre 2013 e início de 2018 por dois bancos de dados PubMed e Web of Science. A busca resultou em 98 trabalhos científicos com um certo grau de validação biológica, ou seja, em que havia um conjunto de amostras para a construção do modelo e um outro conjunto de amostras para a validação do modelo<sup>95</sup>. No entanto, a maioria dos trabalhos citados utiliza um tamanho amostral muito pequeno na validação biológica do modelo, sendo necessário mais estudos com um número maior de pacientes para a aplicação clínica do biomarcador.

Dentre os trabalhos citados nessa revisão bibliográfica<sup>95</sup> vale ressaltar a construção de um painel de metabólitos para diferenciar tolerância diminuída à glicose e alteração da glicose em jejum, com dois coortes de validação independentes (n= 668 e n=2430)<sup>96</sup>, e um painel de metabólitos para determinar risco cardiovascular, validado em dois coortes independentes (n = 2622 e n = 3931)<sup>97</sup>.

#### 4 - Metabolômica e doenças cardiovasculares

Doenças cardiovasculares vêm sendo alvo de estudos metabolômicos para maior compreensão do metabolismo associado à patologia<sup>98</sup> e às terapias utilizadas<sup>99,100,101</sup>, para a busca de novos tratamentos<sup>102</sup> e de biomarcadores de diagnóstico<sup>103,104,105</sup>, de prognóstico<sup>104</sup> de classificação de subtipos de doenças cardiovasculares<sup>106,107,108</sup> e de risco de eventos cardiovasculares<sup>109,110,111,112</sup>.

Para melhor compreender o papel patológico de eicosanoides no infarto do miocárdio, Qiu *et al.* monitoraram o perfil de eicosanoides (derivados de ácidos graxos) por LC-MS/MS num modelo animal<sup>98</sup>. Os autores concluíram que durante a isquemia, são produzidos prostanoídes, principalmente pela rota ciclo-oxigenase (COX-1), que causam apoptose dos cardiomiócitos.

Teul *et al.* utilizaram-se da metabolômica *untarget* e *target* de ácidos graxos por GC-MS, para comparar o perfil metabólico de 19 pacientes que apresentaram um evento de síndrome coronariana aguda (SCA), sendo 94,4% dos pacientes com infarto do miocárdio e 5,6% com angina instável, no decorrer do tempo (0, 4 dias, 2 meses e 6 meses)<sup>101</sup>. A metabolômica global resultou em 27 metabólitos estatisticamente significativos, ligados ao estresse metabólico causado por hipoxia e, numa menor extensão, por resistência à insulina, mesmo em pacientes que não foram diagnosticados previamente com diabetes. No início da SCA, os pacientes apresentavam 21 ácidos graxos com altos níveis, que se estabilizaram após o início do tratamento com estatinas e beta bloqueadores (4 dias).

Laursen *et al.* aplicaram uma abordagem metabolômica *untarget* para melhor compreender os efeitos no metabolismo humano do condicionamento isquêmico remoto, um tratamento aplicado para evitar lesões devido à isquemia ou reperfusão, como em casos de infarto do miocárdio<sup>100</sup>. Nesse estudo, plasma de voluntários foram comparados antes e após o tratamento e encontrou-se que o ácido  $\alpha$ -hidroxibutírico estava aumentado após a intervenção. Esse metabólito foi considerado nesse estudo como um possível biomarcador de isquemia transiente tecidual. Ainda, os autores realizaram um teste *in vitro* que demonstrou que o precursor desse metabólito, com permeabilidade celular, tem um efeito protetor contra danos causados por isquemia-reperfusão em cardiomiócitos.

Com o intuito de buscar novos tratamentos para doenças cardiovasculares, Chiamvimonvat e colaboradores testaram o efeito de inibidores de enzimas epóxido hidrolases solúveis na progressão de remodelamento cardíaco após infarto do miocárdio, utilizando um modelo animal de murinos<sup>102</sup>. Os pesquisadores mediram o perfil metabólico de lipídeos

mediadores inflamatórios por LC-MS/MS e observaram uma diminuição significativa da razão ácidos epoxieicosatrienoicos/ ácidos dihidroxieicosatrienoicos para confirmar a ação anti-inflamatória desses inibidores, além da melhora clínica dos animais após o emprego dos inibidores.

Na busca por biomarcadores para diagnóstico precoce de SCA, o estudo de Laborde *et al.* comparou o plasma de voluntários saudáveis com o de indivíduos com SCA sem supradesnível do segmento ST, através da análise metabolômica global e *target* de ácidos graxos por GC-MS (n = 70) e encontrou, após validação com análise alvo, utilizando dois outros conjuntos amostrais independentes e duas técnicas analíticas (GC-MS, n = 30 e LC-MS/MS, n = 20), 5-hidroxitriptofano, ácido 2-hidroxi-butírico e ácido 3-hidroxi-butírico como metabólitos discriminantes entre os dois grupos<sup>104</sup>.

Na busca por marcadores de diagnóstico e prognóstico de pacientes com insuficiência cardíaca, Chen *et al.* empregaram uma análise metabolômica *untarget* por LC-MS e uma *target* multi-analitos envolvendo a quantificação de 180 metabólitos de diferentes classes, como aminoácidos, aminas biogênicas, acilcarnitinas e fosfolípidos utilizando um kit comercial da empresa Biocrates Life Science (Innsbruck, Austria)<sup>105</sup>. Para o painel de biomarcadores de diagnóstico foi utilizado dois grupos de pacientes, um como grupo de treinamento e construção do modelo (n = 231) e um grupo de validação (n = 281), o painel foi construído com os níveis de histidina, fenilalanina, espermidina e fosfadilcolina (34:4). Para o painel de prognóstico, pacientes no estágio de insuficiência cardíaca B e C (n = 140) foram acompanhados por 1,3 ± 0,8 anos resultando em 18 mortes e 29 re-hospitalizações por insuficiência cardíaca, assim um painel com a razão de dimetilarginina/arginina, espermidina, butirilcarnitina e aminoácidos essenciais totais foi construído resultando numa área sob a curva característica de operação do receptor de 85%.

A classificação de diferentes tipos ou subtipos de doenças cardiovasculares é importante para empregar um melhor tratamento para os pacientes. Nesse sentido, o estudo de Fan *et al.* identificou 89 metabólitos por LC-MS para caracterizar 4 subclasses de doenças arteriais coronárias (aterosclerose coronária não obstrutiva, angina estável, angina instável e infarto agudo do miocárdio) num grupo de 2324 pacientes de quatro centros independentes, com um grupo controle de pacientes com a artéria coronária normal<sup>106</sup>. Diferentes modelos de classificação foram construídos, dividindo os pacientes em 3 subgrupos, sendo um para fase de descoberta e construção de modelo (n = 1086), um para fase de teste do modelo (n = 933) e um para validação do modelo (n = 305), com pacientes de um dos centros de coleta. Na fase teste, os modelos tiveram um valor preditivo de 89% a 96% e na fase de validação, de 85 % a 96%.

Nos últimos anos alguns trabalhos de metabolômica, com objetivo de determinar risco de doença cardiovasculares com um grande número de pacientes e acompanhamento por um ou mais anos, vem ganhando destaque, como o trabalho de Delles *et al.* em que avaliaram-se metabólitos correlacionados à hospitalização por insuficiência cardíaca, obtidos de estudos metabolômicos por NMR de pacientes do estudo clínico PROSPER, num outro coorte do estudo FINRISK 1997 (n = 7330; acompanhamento de 5 anos) para validação de biomarcadores<sup>111</sup>. Os pesquisadores identificaram a fenilalanina como um biomarcador de risco de hospitalizações por insuficiência cardíaca.

Pode-se ressaltar ainda o estudo de Laaksonen e colaboradores que desenvolveram e validaram um escore para prever eventos cardiovasculares utilizando o nível sanguíneo de algumas ceramidas e fosfatidilcolinas, para pacientes com doença arterial coronariana, medidas por LC-MS/MS<sup>112</sup>. O escore foi desenvolvido com o estudo WECAC (n = 3789) e validado com os pacientes dos estudos LIPID (n = 5991) e KAROLA (n = 1023). Estudos utilizando ceramidas como biomarcadores de riscos de eventos cardiovasculares são tão promissores que a organização sem fins lucrativos de renome, Mayo Clinic (EUA), já disponibiliza em seu portfólio um exame clínico de medida de ceramidas com um escore para risco de eventos cardiovasculares<sup>113</sup>.

Os trabalhos de metabolômica e doenças cardiovasculares vêm contribuindo para o entendimento das patologias associadas ao coração, ainda sim, algumas lacunas ainda precisam ser preenchidas, como mais estudos com maior número amostral e de vias metabólicas específicas para compreensão do mecanismo bioquímico dessas doenças e para o desenvolvimento de novas terapias.

## 5 - Bibliografia

<sup>1</sup> <https://www.who.int/news/item/09-12-2020-who-reveals-leading-causes-of-death-and-disability-worldwide-2000-2019>), acessado em 06 de janeiro de 2021.

<sup>2</sup> White, H.D.; Chew, D.O. *Lancet* 2008; 372: 570–84.

<sup>3</sup> Thygesen, K.; Alpert, J.S.; Jaffe, A.S.; Simoons, M.L.; Chaitman, B.R.; White, H.D.; Katus, H.A.; Apple, F.S.; Lindahl, B.; Morrow, D.A.; Chaitman, B.R.; Clemmensen, P.M.; Johanson, P.; Hod, H.; Underwood, R.; Bax, J.J.; Bonow, J.J.; Pinto, F.; Gibbons, R.J.; Fox, K.A.; Atar, D.; Newby, L.K.; Galvani, M.; Hamm, C.W.; Uretsky, B.F.; Steg, P.G.; Wijns, W.; Bassand, J.-P.; Menasche, P.; Ravkilde, J.; Ohman, E.M.; Antman, E.M.; Wallentin,

- L.C.; Armstrong, P.W.; Januzzi, J.L.; Nieminen, M.S.; Gheorghide, M.; Filippatos, G.; Luepker, R.V.; Fortmann, S.P.; Rosamond, W.D.; Levy, D.; Wood, D.; Smith, S.C.; Hu, D.; Lopez-Sendon, J.-L.; Robertson, R.M.; Weaver, D.; Tendera, M.; Bove, A.A.; Parkhomenko, A.N.; Vasilieva, E.J.; Mendis, S.; Bax, J.J.; Baumgartner, H.; Ceconi, C.; Dean, V.; Deaton, C.; Fagard, R.; Funck-Brentano, C.; Hasdai, D.; Hoes, A.; Kirchhof, P.; Knuuti, J.; Kolh, P.; McDonagh, T.; Moulin, C.; Popescu, B.A.; Reiner, Z.; Sechtem, U.; Sirnes, P.A.; Tendera, M.; Torbicki, A.; Vahanian, A.; Windecker, S.; Morais, J.; Aguiar, C.; Almahmeed, W.; Arnar, D.O.; Barili, F.; Bloch, K.D.; Bolger, A.F.; Botker, H.E.; Bozkurt, B.; Bugiardini, R.; Cannon, C.; de Lemos, J.; Eberli, F.R.; Escobar, E.; Hlatky, M.; James, S.; Kern, K.B.; Moliterno, D.J.; Mueller, C.; Neskovic, A.N.; Pieske, B.M.; Schulman, S.P.; Storey, R.F.; Taubert, K.A.; Vranckx, P.; Wagner, D.R. *J Am Coll Cardiol*. 2012;60(16):1581-98.
- <sup>4</sup> Santos, E.S.; Baltar, V.T.; Pereira, M.P.; Minuzzo, L.; Timerman, A.; Avezum, A. *Arq Bras Cardio*. 2011; 96(3):179-87.
- <sup>5</sup> Yusuf, S.; Hawken, S.; Ôunpuu, S.; Dans, T.; Avezum, A.; Lanas, F.; McQueen, M.; Budaj, A.; Pais, P.; Varigos, J.; Lisheng, L. *Lancet* 2004; 364: 937–52.
- <sup>6</sup> <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sih/cnv/niuf.def>, acessado em 20 de julho de 2020.
- <sup>7</sup> [http://www.who.int/cardiovascular\\_diseases/priorities/secondary\\_prevention/country/en/index1.html](http://www.who.int/cardiovascular_diseases/priorities/secondary_prevention/country/en/index1.html), acessado em 3 de março de 2020.
- <sup>8</sup> Ertl, G.; Frantz, S. *Cardiovascular Research* 2005, 66: 22– 32.
- <sup>9</sup> Wang, C.-Y.; Liu, P.-Y.; Liao, J.K. *Trends Mol Med* 2008, 14(1): 37-44.
- <sup>10</sup> Ludman A.; Venugopal, V.; Yellon, D.M.; Hausenloy, D.J. *Pharmacol Ther* 2009, 122: 30–43.
- <sup>11</sup> Sposito, A.C.; Santos, S.N.; Faria, E.C.; Abdalla, D.S.P.; Silva, L.P.; Soares, A.A.S.; Japiassú, A.V.T.; Silva, J.C.Q.; Ramires, J.A.F.; Coelho, O.R. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011;31:1240-1246.
- <sup>12</sup> Schwartz, G. G.; Olsson, A. G.; Ezekowitz, M. D.; Ganz, P.; Oliver, M. F.; Waters, D.; Zeiher, A.; Chaitman, B. R.; Leslie, S.; Stern, T.; Myocardial Ischemia Reduction with Aggressive Cholesterol Lowering (MIRACL) Study Investigators *JAMA*, 2001, 285(13):1711-1718.
- <sup>13</sup> Steg, P.G.; James, S.K.; Atar, D.; Badano, L.P.; Lundqvist, C.B.; Borger, M.A.; Di Mario, C.; Dickstein, K.; Ducrocq, G.; Fernandez-Aviles, F.; Gershlick, A.H.; Giannuzzi, P.;

Halvorsen, S.; Huber, K.; Juni, P.; Kastrati, A.; Knuuti, J.; Lenzen, M.J.; Mahaffey, K.W.; Valgimigli, M.; van't Hof, A.; Widimsky, P.; Zahger, D.; Bax, J.J.; Baumgartner, H.; Ceconi, C.; Dean, V.; Deaton, C.; Fagard, R.; Funck-Brentan, C.; Hasdai, D.; Hoes, A.; Kirchhof, P.; Knuuti, J.; Kolh, P.; McDonagh, T.; Moulin, C.; Popescu, B.A.; Reiner, Z.; Sechtem, U.; Sirnes, P.A.; Tendera, M.; Torbicki, A.; Vahanian, A.; Windecker, S.; Hasdai, D.; Astin, F.; Åström-Olsson, K.; Budaj, A.; Clemmensen, P.; Collet, J.-P.; Fox, K.A.; Fuat, A.; Gustiene, O.; Hamm, C.W.; Kala, P.; Lancellotti, P.; Maggioni, A.P.; Merkely, B.; Neumann, F.-J.; Piepoli, M.F.; Van de Werf, F.; Verheugt, F.; Wallentin, L. *European Heart J* 2012,33(20): 2569-2619.

<sup>14</sup> Markman, B.E.O.; Rosa, P.C.P.; Koschtschak, M.R.W. *Rev Saúde Pública* 2010, 44(6):1055-1062.

<sup>15</sup> Jones, P.H.; Davidson, M.H.; Stein, E.A.; Bays, H.E.; McKenney, J.M.; Miller, E.; Cain, V.A.; Blasetto, J.W. *Am J Cardiol* 2003, 92(2):152-160.

<sup>16</sup> Chitose, T.; Sugiyama, S.; Sakamoto, K.; Shimomura, H.; Yamashita, T.; Hokamaki, J.; Tsunoda, R.; Shiraishi, S.; Yamashita, Y.; Ogawa, H. *Atherosclerosis* 2014, 237: 251-258.

<sup>17</sup> Yun, K.H.; Oh, S.K.; Rhee, S.J.; Yoo, N.J.; Kim, N.-H.; Jeong, J.-W. *Int J Cardiol* 2011,146:68-72.

<sup>18</sup> Schachter, M. *Fundam Clin Pharmacol* 2005, 19(1):117-125.

<sup>19</sup> França C.N.; Pinheiro L.F.; Izar M.C.; Brunialti, M.K.; Salomão, R.; Bianco, H.T.; Kasma, S.H.; Barbosa, S.P.; de Nucci, G.; Fonseca, F.A. *Circ J*. 2012;76:729-736.

<sup>20</sup> Komosa, A.; Lesiak, M.; Siniawski, A.; Mularek-Kubzdela, T.; Grajek, S. *Postepy Kardiologii Interwencyjnej* 2014,10(35): 32–39.

<sup>21</sup> Franchi, F.; Angiolillo, D. J. *Nat Rev Cardiol* 2015, 12: 30–47.

<sup>22</sup> Sabatine, M.S.; Cannon, C.P.; Gibson, C.M.; López-Sendón, J.L.; Montalescot, G.; Theroux, P.; Lewis, B.S.; Murphy, S.A.; McCabe, C.H.; Braunwald, E. *JAMA* 2005, 294(10):1224-1232.

<sup>23</sup> Varenhorst, C.; Alström, U.; Braun, O.Ö.; Storey, R.F.; Mahaffey, K.W.; Bertilsson, M.; Cannon, C.P.; Scirica, B.M.; Himmelmann, A.; James, S.K.; Wallentin, L.; Held, C. *Heart* 2014, 100(22):1762-1769.

<sup>24</sup> Sahle, A.; Varenhorst, C.; Lagerqvist, B.; Renlund, H.; Omerovic, E.; Erlinge, D.; Wallentin, L.; James, S. K.; Jernberg, T. *Eur Heart J* 2016, 37:3335–3342.

- <sup>25</sup> Bonello, L.; Laine, M.; Kipson, N.; Mancini, J.; Helal, O.; Fromonot, J.; Gariboldi, V.; Condo, J.; Thuny, F.; Frere, C.; Camoin-Jau, L.; Paganelli, F.; Dignat-George, F.; Guieu, R. **J. Am. Coll. Cardiol.** 2014, 63(9):872-877.
- <sup>26</sup> Sabatine, M.S.; Cannon, C.P.; Gibson, C.M.; López-Sendón, J.L.; Montalescot, G.; Theroux, P.; Lewis, B.S.; Murphy, S.A.; McCabe, C.H.; Braunwald, E. **JAMA** 2005, 294(10):1224-1232.
- <sup>27</sup> França, C.N.; Pinheiro, L.F.; Izar, M.C.; Brunialti, M.K.; Salomão, R.; Bianco, H.T.; Kasma, S.H.; Barbosa, S.P.; de Nucci, G.; Fonseca, F.A. **Circ. J.** 2012, 76: 729 – 736.
- <sup>28</sup> Schmidt, M.; Johansen, M.B.; Maeng, M.; Kaltoft, A.; Jensen, L.O.; Tilsted, H.H.; Bøtker, H.E.; Baron, J.A.; Sørensen, H.T. **Br. J. Clin. Pharmacol** 2012, 74(1):161-70.
- <sup>29</sup> Villas-Bôas, S.G.; Gombert, A.K. **Biotechnologia Cienc. Desenvolv.** 2006, 36:58-69.
- <sup>30</sup> Canuto, G. A. B.; Costa, J. L.; Cruz, P. L. R., Souza, A. R. L.; Faccio, A. T.; Klassen, A.; Rodrigues, K. T., Tavares, M.F.M. **Quim Nova** 2018, 41(1):75-91.
- <sup>31</sup> Lu, W.; Bennett, B. D.; Rabinowitz, J. D. **J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci** 2008, 871: 236–242.
- <sup>32</sup> Patti, G. J.; Yanes, O.; Siuzdak, G. **Nat. Ver. Mol. Cell. Biol.** 2012, 13(4): 263–269.
- <sup>33</sup> Begou, O.; Gika; H. G.; Wilson, I. D.; Theodoridis, G. **Analyst** 2017, 142:3079-3100.
- <sup>34</sup> Boudonck, K. J.; Michell, M.N.; Németh, L.; Keresztes, L.; Nyska, A.; Shinar, D.; Rosenstock, M. **Toxicol. Pathol** 2009, 37:280-292.
- <sup>35</sup> Spratlin, J.L.; Serkova, N.J.; Eckhardt, G. **Clin Cancer Res** 2009, 15:431-440.
- <sup>36</sup> Wishart, D.S. **Trends Food Sci. Technol.** 2008, 19:482-493.
- <sup>37</sup> Manetti, C.; Bianchetti, C.; Bizzarri, M.; Casciani, L.; Castro, C.; D'Ascenzo, G.; Delfini, M.; Di Cocco, M.E.; Laganà, A.; Miccheli, A.; Motto, M.; Conti, F. **Phytochemistry** 2004, 65:3187–3198.
- <sup>38</sup> Vincent, I. M.; Ehmann, D. E.; Mills, S. D.; Perros, M.; Barrett, M. P. **Antimicrob Agents Chemother** 2016, 60(4):2281–2291.
- <sup>39</sup> Álvarez-Sánchez, B.; Priego-Capote, F.; Castro, M. D. L. De **TrAC Trends Anal Chem** 2010, 29:120–127.
- <sup>40</sup> Gong, Z.-G.; Hu, J.; Wu, X.; Xu, Y.-J. **Crit Rev Anal Chem** 2017 47(4):325-331.
- <sup>41</sup> Vuckovic, D. **Anal Bioanal Chem** 2012, 403:1523–1548.

- <sup>42</sup> Saigusa, D.; Okamura, Y.; Motoike, I.N.; Katoh, Y.; Kurosawa, Y.; Saijyo, R.; Koshiba, S.; Yasuda, J.; Motohashi, H.; Sugawara, J.; Tanabe, O.; Kinoshita, K.; Yamamoto, M. *PLoS ONE* 2016, 11(8): e0160555.
- <sup>43</sup> Filla, L. A.; Sanders, K. L.; Filla, R. T.; Edwards, J. L. *Analyst* 2016, 141:3858-3865.
- <sup>44</sup> Beale, D.J.; Pinu, F.R.; Kouremenos, K.A.; Poojary, M.M.; Narayana, V.K.; Boughton, B.A.; Kanojia, K.; Dayalan, S.; Jones, O.A.H.; Dias, D.A. *Metabolomics* 2018, 14(11):152.
- <sup>45</sup> Villas-Bôas, S. G.; Bruheim, P., *OMICS* 2007, 11:305-313.
- <sup>46</sup> Lenz, E.M.; Wilson, I.D. *J. Proteome Res* 2007, 6:443-458.
- <sup>47</sup> Baninia Habchi, B.; Alves, S.; Paris, A.; Rutledge, D. N.; Rathahao-Paris, E. *Trends Analyt. Chem.* 2016, 85:128-139.
- <sup>48</sup> Emwas, A.H.; Roy, R.; McKay, R.T.; Tenori, L.; Saccenti, E.; Gowda, G.A.N.; Raftery, D.; Alahmari, F.; Jaremko, L.; Jaremko, M.; Wishart, D.S. *Metabolites* 2019, 9(7):123.
- <sup>49</sup> Hao, J.; Liebeke, M.; Astle, W.; De Iorio, M.; Bundy, J. G.; Ebbels, T. M. D. *Nat Protoc* 2014, 9(6)1416-1427.
- <sup>50</sup> Markley, J.L.; Brüschweiler, R.; Edison, A.S.; Eghbalian, H.R.; Powers, R.; Raftery, D.; Wishart, D.S. *Curr Opin Biotechnol* 2017, 43:34-40.
- <sup>51</sup> Snytnikova, O. A.; Khlichkina, A.A.; Sagdeev, R. Z.; Tsentalovich, Y. P. *Metabolomics* 2019, 15:84.
- <sup>52</sup> Koheler, I.; Giera, M. *J Sep Sci* 2017, 40:93-108.
- <sup>53</sup> Liu, X.; Locasale, J.W. *Trends Biochem Sci* 2017, 42(4):274-284.
- <sup>54</sup> Lenz, E. M.; Wilson, I. D. *J. Proteome Res* 2007, 6:443-458.
- <sup>55</sup> Kind, T.; Wohlgemuth, G.; Lee, D. L.; Palazoglu, M.; Shahbaz, S.; Fiehn, O. *Anal Chem* 2009, 81(24): 10038-10048.
- <sup>56</sup> Kopka, J.; Schauer, N.; Krueger, S.; Birkemeyer, C.; Usadel, B.; Bergmuller, E.; Dormann, P.; Weckwerth, W.; Gibon, Y.; Stitt, M.; Willmitzer, L.; Fernie, A.R.; Steinhauser, D. *Bioinformatics* 2005, 21:1635-1638.
- <sup>57</sup> Khakimov, B.; Motawia, M.S.; Bak, S.; Engelsens, S.B. *Anal Bioanal Chem* 2013, 405:9193-9205.
- <sup>58</sup> Zarate, E.; Boyle, V.; Rupprecht, U.; Green, S.; Villas-Boas, S.G.; Baker, P.; Pinu, F.R. *Metabolites* 2017, 7:1.
- <sup>59</sup> Segers, K.; Declerck, S.; Mangelings, D.; Heyden, Y.V.; Eeckhaut, A.V. *Bioanalysis* 2019, 11(24):2297-2318.

- <sup>60</sup> Chaleckis, R.; Meister, I.; Zhang, P.; Wheelock, C.E. *Curr Opin Biotech* 2019, 55:44-50.
- <sup>61</sup> Zhang, W.; Hankemeier, T.; Ramautar, R. *Curr Opin Biotechnol* 2017, 43:1-7.
- <sup>62</sup> Ramautar, R.; Busnel, J. M.; Deelder, A. M.; Mayboroda, O.A. *Anal Chem* 2012, 84, 885-892.
- <sup>63</sup> Gonzalez-Ruiz, V.; Gagnebin, Y.; Drouin, N.; Codesido, S.; Rudaz, S.; Schappler, J. *Electrophoresis* 2018, 39:1222–1232.
- <sup>64</sup> Kuehnbaum, N.L.; Kormendi, A.; Britz-McKibbin, P. *Anal Chem* 2013, 85(22):10664-10669.
- <sup>65</sup> Ramautar, R.; Somsen, G. W.; de Jong, G. J. *Electrophoresis* 2019, 40:165-179.
- <sup>66</sup> Perez, C.J.; Bagga, A.K.; Prova, S.S.; Yousefi Taemeh, M.; Ifa, D.R. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2019, 33( S3): 27-53.
- <sup>67</sup> Robert W. McGarrah, R. W.; Crown, S. B.; Zhang, G.-F.; Shah, S. H.; Newgard, C. B. *Circ Res* 2018, 122:1238-1258.
- <sup>68</sup> Smith, C.A.; Want, E.J.; O'Maille, G.; Abagyan, R.; Siuzdak, G. *Anal Chem* 2006, 78:779–787.
- <sup>69</sup> Clasquin, M.F.; Melamud, E.; Rabinowitz, J.D. *Curr Protoc Bioinform* 2012, 37:14.11.1-14.11.23.
- <sup>70</sup> Tsugawa, H.; Cajka, T.; Kind, T.; Ma, Y.; Higgins, B.; Ikeda, K.; Kanazawa, M.; VanderGheynst, J.; Fiehn, O. *Nat Methods* 2015, 12:523–526.
- <sup>71</sup> Pluskal, T.; Castillo, S.; Villar-Briones, A.; Orešič, M. *BMC Bioinformatics* 2010, 11:395.
- <sup>72</sup> Adams, K.J.; Pratt, B.; Bose, N.; Dubois, L.G.; St John-Williams, L.; Perrott, K.M.; Ky, K.; Kapahi, P.; Sharma, V.; MacCoss, M.J.; Moseley, M.A.; Colton, C.A.; MacLean, B.X.; Schilling, B.; Thompson, J.W.; Alzheimer's Disease Metabolomics Consortium *J Proteome Res* 2020 19(4):1447-1458.
- <sup>73</sup> Delaglio, F.; Grzesiek, S.; Vuister, G.W.; Zhu, G.; Pfeifer, J.; Bax, A. *J Biomol NMR* 1995, 6:277–293.
- <sup>74</sup> Lewis, I. A.; Schommer, S. C.; Markley, J. L. *Magn Reson Chem* 2009, 47:S123-S126.
- <sup>75</sup> Liland, K. H. *TrAC Trends Anal Chem* 2011, 30(6): 827-841.
- <sup>76</sup> De Souza, A. M.; Poppi, R. J. *Quim Nova* 2012, 35:223–229.
- <sup>77</sup> Worley, B.; Powers, R. *Curr. Metabolomics* 2013, 1:92–107.
- <sup>78</sup> Sugimoto, M.; Kawakami, M.; Robert, M.; Soga, T.; Tomita, M. *Curr Bioinform* 2012, 7: 96–108.

- <sup>79</sup> Eriksson, L.; Trygg, J.; Wold, S. *J. Chemom.* 2008, 22:594–600.
- <sup>80</sup> Tautenhahn, R.; Cho, K.; Uritboonthai, W.; Zhu, Z.; Patti, G. J.; Siuzdak, G. *Nat Biotechnol* 2012, 30:826–828.
- <sup>81</sup> Horai, H.; Arita, M.; Kanaya, S.; Nihei, Y.; Ikeda, T.; Suwa, K.; Ojima, Y.; Tanaka, K.; Tanaka, S.; Aoshima, K.; Oda, Y.; Kakazu, Y.; Kusano, M.; Tohge, T.; Matsuda, F.; Sawada, Y.; Hirai, M. Y.; Nakanishi, H.; Ikeda, K.; Akimoto, N.; Maoka, T.; Takahashi, H.; Ara, T.; Sakurai, N.; Suzuki, H.; Shibata, D.; Neumann, S.; Iida, T.; Tanaka, K.; Funatsu, K.; Matsuura, F.; Soga, T.; Taguchi, R.; Saito, K.; Nishioka, T. *J Mass Spectrom* 2010, 45:703–714.
- <sup>82</sup> Fahy, E.; Sud, M.; Cotter, D.; Subramaniam, S. *Nucleic Acids Res* 2007, 35:W606–W612.
- <sup>83</sup> de la Fuente, A. G.; Godzien, J.; López, M. F.; Rupérez, F. J.; Barbas, C.; Otero, A. *J Pharmaceu Biomed Anal* 2018, 154:138–149.
- <sup>84</sup> Wishart, D.S.; Feunang, Y.D.; Marcu, A.; Guo, A.C.; Liang, K.; Vázquez-Fresno, R.; Sajed, T.; Johnson, D.; Li, C.; Karu, N.; Sayeeda, Z.; Lo, E.; Assempour, N.; Berjanskii, M.; Singhal, S.; Arndt, D.; Liang, Y.; Badran, H.; Grant, J.; Serra-Cayuela, A.; Liu, Y.; Mandal, R.; Neveu, V.; Pon, A.; Knox, C.; Wilson, M.; Manach, C.; Scalbert, A. *Nucleic Acids Res* 2018, 46(D1):D608–D617.
- <sup>85</sup> Steinbeck, C.; Krause, S.; Kuhn, S. *J Chem Inf Comput Sci* 2003, 43:1733–1739.
- <sup>86</sup> Mackinnon, N.; Somashekar, B. S.; Tripathi, P.; Ge, W.; Rajendiran, T. M.; Chinnaiyan, A. M.; Ramamoorthy, A. *J Magn Reson* 2013, 226:93–99.
- <sup>87</sup> Bingol, K.; Bruschweiler-Li, L.; Li, D.-W.; Brüschweiler, R. *Anal Chem* 2014, 86(11):5494–5501.
- <sup>88</sup> Nielsen, J.; Oliver, S. *Trends Biotechnol* 2005, 23(11):544–546.
- <sup>89</sup> Kanehisa, M.; Goto, S.; Hattori, M.; Aoki-Kinoshita, K. F.; Itoh, M.; Kawashima, S.; Katayama, T.; Araki, M.; Hirakawa, M. *Nucleic Acids Res* 2006, 34:D354–D357.
- <sup>90</sup> Caspi, R.; Altman, T.; Dreher, K.; Fulcher, C. a; Subhraveti, P.; Keseler, I. M.; Kothari, A.; Krummenacker, M.; Latendresse, M.; Mueller, L. a; Ong, Q.; Paley, S.; Pujar, A.; Shearer, A. G.; Travers, M.; Weerasinghe, D.; Zhang, P.; Karp, P. D. *Nucleic Acids Res* 2012, 40:D742–D753.
- <sup>91</sup> Romero, P.; Wagg, J.; Green, M. L.; Kaiser, D.; Krummenacker, M.; Karp, P. D. *Genome Biol* 2005, 6:R2.
- <sup>92</sup> Haw, R.; Stein, L. *Curr. Protoc Bioinforma* 2012, 38: 8.7.1–8.7.23

- <sup>93</sup> Liesenfeld, D.B.; Habermann, N.; Owen, R.W.; Scalbert, A.; Ulrich, C.M. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2013, 22(12):2182-201.
- <sup>94</sup> Ganti, S.; Weiss, R. H. *Urol. Oncol.* 2011 29(5):551-557.
- <sup>95</sup> López-López, A.; López-González, A.; Barker-Tejeda, T.C.; Barbas, C. *Expert Rev Mol Diagn* 2018, 18(6):557-575.
- <sup>96</sup> Cobb, J.; Eckhart, A.; Motsinger-Reif, A.; Carr, B.; Groop, L.; Ferrannini, E. *Diabetes Care* 2016, 39(6):988-995.
- <sup>97</sup> Würtz, P.; Havulinna, A.S.; Soininen, P.; Tynkkynen, T.; Prieto-Merino, D.; Tillin, T.; Ghorbani, A.; Artati, A.; Wang, Q.; Tiainen, M.; Kangas, A.J.; Kettunen, J.; Kaikkonen, J.; Mikkilä, V.; Jula, A.; Kähönen, M.; Lehtimäki, T.; Lawlor, D.A.; Gaunt, T.R.; Hughes, A.D.; Sattar, N.; Illig, T.; Adamski, J.; Wang, T.J.; Perola, M.; Ripatti, S.; Vasani, R.S.; Raitakari, O.T.; Gerszten, R.E.; Casas, J.P.; Chaturvedi, N.; Ala-Korpela M.; Salomaa, V. *Circulation* 2015, 131(9):774-785.
- <sup>98</sup> Qiu, H.; Liu, J.Y.; Wei, D.; Li, N.; Yamoah, E.N.; Hammock, B.D.; Chiamvimonvat, N. *Cardiovasc. Res.* 2012, 95:336–345.
- <sup>99</sup> Jiang, P.; Dai, W.; Yan, S.; Chen, Z.; Xu, R.; Ding, J.; Xiang, L.; Wang, S.; Liu, R.; Zhang, W. *Mol. BioSyst.* 2011, 7:824–831
- <sup>100</sup> Laursen, M.R.; Hansen, J.; Elkjær, C.; Stavnager, N.; Nielsen, C.B.; Pryds, K.; Johnsen, J.; Nielsen, J.M.; Bøtker, H.E.; Johannsen, M. *Metabolomics* 2017, 13:67.
- <sup>101</sup> Teul, J.; Garcia, A.; Tuñón, J.; Martín-Ventura, J.L.; Tarín, N.; Bescós, L.L.; Egido, J.; Barbas, C.; Rupérez, F.J. *J Pharm. Biomed. Anal.* 2011, 56(2):343-351.
- <sup>102</sup> Li, N.; Liu, J.Y.; Timofeyev, V.; Qiu, H.; Hwang, S.H.; Tuteja, D.; Lu, L.; Yang, J.; Mochida, H.; Low, R.; Hammock, B.D.; Chiamvimonvat, N. *J Mol Cell Cardiol* 2009, 47(6):835-845.
- <sup>103</sup> Senn, T.; Hazen, S.L.; Tang, W.H.W. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 2012, 55:70-76.
- <sup>104</sup> Laborde, C.M.; Mourino-Alvarez, L.; Posada-Ayala, M.; Alvarez-Llamas, G.; Serranillos-Reus, M.G.; Moreu, J.; Vivanco, F.; Padial, L.R.; Barderas, M.G. *Metabolomics* 2014, 10:414–424.
- <sup>105</sup> Cheng, M.-L.; Wang, C.-H.; Shiao, M.-S.; Liu, M.-H.; Huang, Y.-Y.; Huang, C.-Y.; Mao, C.-T.; Lin, J.-F.; Ho, H.-Y.; Yang, N.-I. *J Am Coll Cardiol* 2015, 65 (15):1509-1520.
- <sup>106</sup> Fernández Peralbo, M.A.; Priego-Capote, F.; Galache-Osuna, J.G.; Luque de Castro, M.D. *Electrophoresis* 2013, 34:2901–2909.

- <sup>107</sup> Calderón-Santiago, M.; Priego-Capote, F.; Galache-Osuna, J.G.; Luque de Castro, M.D. **Electrophoresis** 2013, 34:2827–2835.
- <sup>108</sup> Fan, Y.; Li, Y.; Chen, Y.; Zhao, Y. J.; Liu, L. W.; Li, J.; Wang, S. L.; Alolga, R. N.; Yin, Y.; Wang, X. M.; Zhao, D. S.; Shen, J. H.; Meng, F. Q.; Zhou, X.; Xu, H.; He, G. P.; Lai, M. D.; Li, P.; Zhu, W.; Qi, L. W. **J Am Coll Cardiol** 2016, 68(12):1281–1293.
- <sup>109</sup> Rizza, S.; Copetti, M.; Rossi, C.; Cianfarani, M.A.; Zucchelli, M.; Luzi, A.; Pecchioli, C.; Porzio, O.; Di Cola, G.; Urbani, A.; Pellegrini, F.; Federici, M. **Atherosclerosis** 2014, 232(2):260-264.
- <sup>110</sup> McGranaghan, P.; Saxena, A.; Rubens, M.; Radenkovic, J.; Bach, D.; Schleußner, L.; Pieske, B.; Edelmann, F.; Trippel, T. D. **Biomarkers** 2020, 25:2, 101-111.
- <sup>111</sup> Delles, C.; Rankin1, N. J.; Boachie, C.; McConnachie, A.; Ford, I.; Kangas, A.; Soininen, P.; Trompet, S.; Mooijaart, S. P.; Jukema, J. W.; Zannad, S.; Ala-Korpela, M.; Salomaa, V.; Havulinna, A. S.; Welsh, P.; Würtz, P.; Sattar, N. **Eur J Heart Fail** 2018, 20: 663–673.
- <sup>112</sup> Hilvo, M.; Meikle, P.J.; Pedersen, E.R.; Tell, G. S.; Dhar, I.; Brenner, H.; Schöttker, B.; Lääperi, M.; Kauhanen, D.; Koistinen, K. M.; Jylhä, A.; Huynh, K.; Mellett, N. A.; Tonkin, A. M.; Sullivan, D. R.; Simes, J.; Nestel, P.; Koenig, W.; Rothenbacher, D.; Nygård, O.; Laaksonen, R. **Eur Heart J**. 2020, 41(3):371-380.
- <sup>113</sup> <https://www.mayoclinic.org/medical-professionals/cardiovascular-diseases/news/ceramides-a-class-of-lipids-with-links-to-heart-disease/mac-20429577>, acessado em 21 de julho de 2020.

## **Capítulo 2 – Objetivos**

## **1 – Objetivos gerais**

Esta tese visa comparar o metabolismo de pacientes que sofreram IAM, submetidos a duas estratégias terapêuticas distintas, com uso conjunto de estatinas (sinvastatina ou rosuvastatina) e bloqueadores do receptor de ADP (clopidogrel ou ticagrelor), ao longo do tempo (basal, após 1 mês e 6 meses de terapia), por meio da metabolômica global, visando melhor compreender os mecanismos de atuação dos fármacos no tratamento do IAM.

## **2 – Objetivos Específicos**

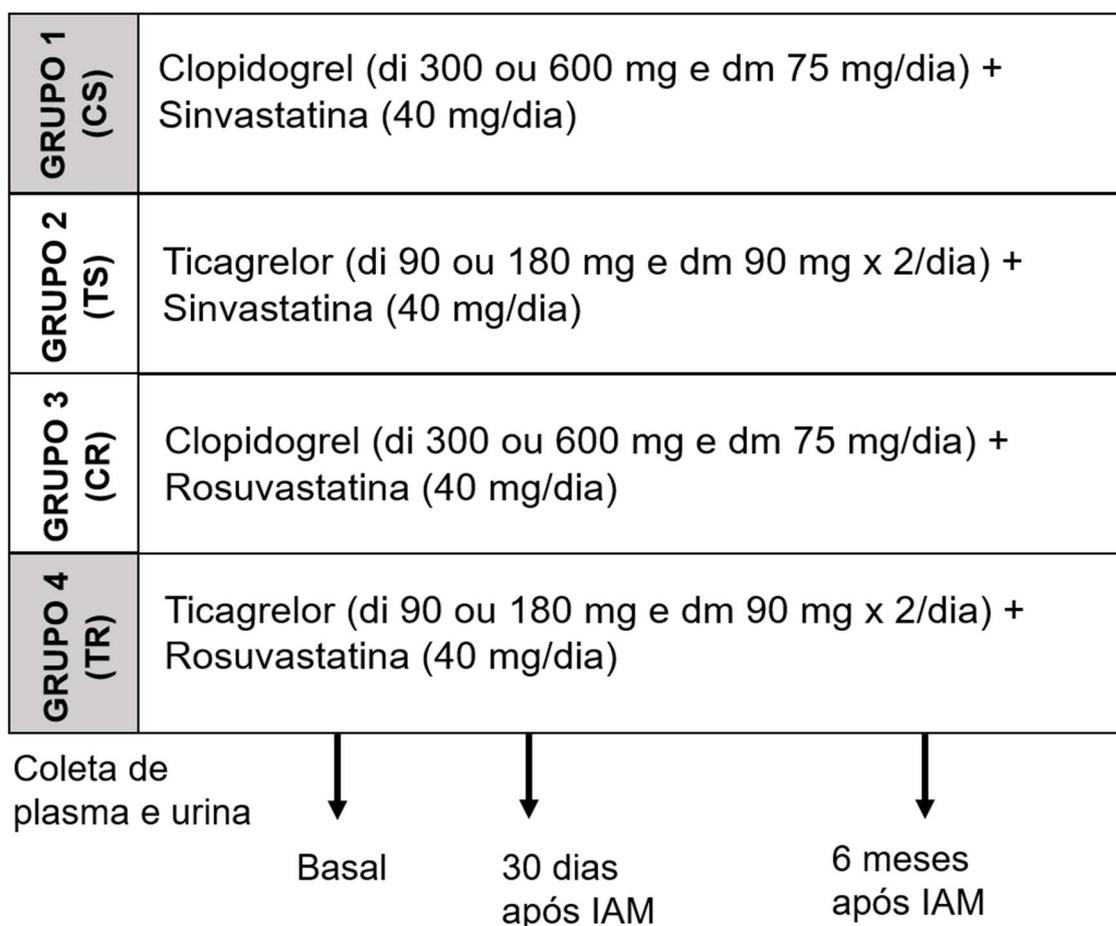
- Analisar e comparar o efeito de dois tratamentos (clopidogrel e simvastatina ou ticagrelor e rosuvastatina), assim como sua evolução temporal, no metaboloma de pacientes que sofreram IAM, com análises de plasma (após 30 dias de tratamento) e urina (após 30 dias e 6 meses de tratamento), por uma abordagem metabolômica multiplataforma.
- Empregar ferramentas estatísticas multivariada e univariada para encontrar e identificar os metabólitos responsáveis pelas diferenças entre os tratamentos e a alteração temporal causada pelos tratamentos;
- Associar os metabólitos discriminantes às suas vias metabólicas para compreender a diferença entre os tratamentos e sua atuação no metabolismo do paciente após o IAM.

## **Capítulo 3 – Parte experimental**

## 1 - Estudo clínico

O estudo clínico é parte do projeto temático aprovado pela FAPESP (Processo: 12/51692-7) coordenado pelo Professor Dr. Francisco Antonio Helfenstein Fonseca da UNIFESP. Nesse estudo clínico, foram selecionados 200 pacientes estáveis admitidos no Hospital São Paulo da UNIFESP, que sofreram infarto agudo do miocárdio com supradesnível do segmento ST no eletrocardiograma, tratados nas primeiras seis horas com o trombolítico tenecteplase ou intervenção percutânea (IP).

Os pacientes foram randomizados para receber um tratamento combinado com uma estatina (sinvastatina ou rosuvastatina) e um inibidor do receptor P2Y<sub>12</sub> (clopidogrel ou ticagrelor) por um desenho fatorial 2x2 (sinvastatina e clopidogrel ou sinvastatina e ticagrelor ou rosuvastatina e clopidogrel ou rosuvastatina e ticagrelor), além do tratamento convencional de IAM (Figura 6). Amostras de plasma (em EDTA) e de urina de todos os pacientes, na manhã seguinte ao IAM (basal), após 1 mês de tratamento e após 6 meses de tratamento foram coletadas no Hospital São Paulo da UNIFESP desde 15 de maio de 2015. Para o estudo descrito nesta tese, foram analisadas amostras de plasma de 24 pacientes que recebem clopidogrel e sinvastatina (CS – grupo 1) no tempo basal, 26 pacientes que recebem ticagrelor e rosuvastatina (TR - grupo 4) no tempo basal, 19 pacientes do grupo 1 após 30 dias de tratamento e 21 pacientes do grupo 4 após 30 dias de tratamento. Amostras de urina de 20 pacientes do grupo 1 (um paciente adicionado) e 22 do grupo 4 foram analisadas no tempo basal, após 30 dias e após 6 meses também foram utilizadas nessa tese.



**Figura 6** - Desenho experimental para coleta de amostras de plasma e urina (di = dose inicial, dm = dose de manutenção).

A sinvastatina ou rosuvastatina foram administradas em altas doses de 40 mg/dia, independentemente do uso do trombolítico ou IP. As doses dos bloqueadores do receptor P2Y12, foram de acordo com o tratamento recebido nas seis primeiras horas (tenecteplase ou IP). Para pacientes que receberam o trombolítico tenecteplase, foi administrado clopidogrel com uma dose inicial de 300 mg, seguida por dose diária de manutenção de 75 mg, ou ticagrelor com dose inicial de 90 mg e de manutenção de 90 mg de 12h em 12h. Para os casos de IP, o tratamento foi com clopidogrel com dose inicial de 600 mg e de manutenção de 75 mg/dia, ou ticagrelor com dose inicial de 180 mg, seguida por uma dose de 90 mg de 12h em 12h.

Para avaliação de prognóstico, os pacientes foram acompanhados por especialistas durante um ano, realizando exames de ressonância nuclear magnética com realce tardio para quantificação da necrose miocárdica, tecido isquêmico e exame da função ventricular esquerda, além de exames de angiografia coronária e de medida de biomarcadores de danos ao miocárdio (troponina, CK-MB).

## **2 - Análise metabolômica**

### **2.1 – Materiais e métodos**

Água ultrapura foi obtida com um sistema Milli-Q (Millipore, Billerica, MS, EUA). Metanol (grau MS), heptano (grau MS) e ácido fórmico (grau MS) foram comprados da Fluka Analytical (Buchs, Switzerland). Acetonitrila (grau MS) e a mistura certificada de metil ester de n-ácidos graxos (C8-C22) são da Supelco (Bellefonte, PA, EUA). Piridina (grau ACS), hidrocloreto de o-metoxiamina (grau analítico), N,O-bis-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (BSTFA) com 1% (v/v) trimetilclorosilano (TMCS), metil estearato C18:0 (grau GC), metil-terc-butil eter, metionina sulfona foram adquiridos da Sigma Aldrich (Darmstadt, Alemanha). Padrões usados como massas de referência: purina, HP-0921 (hexakis(1H,1H,3H-tetrafluoropropoxi)fosfazina) e trifluoroacetato de amônio (TFANH<sub>4</sub>) foram compradas da Agilent Technologies (Santa Clara, CA, EUA). Solução 30% de hidróxido de amônio (grau analítico) era da Panreac Quimica SA (Barcelona, Espanha). Isopropanol (grau MS), formiato de amônio (grau MS), acetato de amônio (grau MS), e os padrões analíticos p-fluorofenilalanina, clorocolina e ácido 4-bromo-benzóico foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Darmstadt, Alemanha).

### **2.2– Análise metabolômica de amostras de plasma por CE-MS**

#### **2.2.1 - Instrumentação**

Empregou-se um sistema de eletroforese capilar (7100 CE, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA) acoplado a um espectrômetro de massas do tipo tempo-de-voo (6224 TOF/MS, Agilent Technologies) para as análises. Uma centrífuga Megafuge 1.0R (Heraeus, Hanau, Alemanha) e um vortex Fisherbrand (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) foram utilizados no preparo das amostras. Os dados foram obtidos no laboratório do grupo CEMBio da Profa Coral Barbas na Universidad CEU San Pablo em Boadilha del Monte na Espanha.

#### **2.2.2 - Preparo de amostra**

A uma alíquota de 100 µL de plasma, adicionaram-se 100 µL de uma solução contendo 0,2 mol/L de ácido fórmico e 0,4 mmol/L de metionina sulfona (padrão interno) em 5% acetonitrila. A mistura foi homogeneizada por vortex por 1 min e transferida a um filtro de

corte molecular (30 KDa) e centrifugada no filtro por 70 min (2000 rpm, 4 °C)<sup>1</sup>. O filtrado foi transferido para um vial e analisado. Uma alíquota de 10 µL de cada filtrado foi misturada para fazer uma amostra de controle de qualidade (QC, do inglês *quality control*), que foi injetada no início, a cada 6 amostras e no final da análise. A cada dia, um vial de QC era adicionado ao equipamento. Uma amostra de branco de preparo de amostra foi analisada no final da sequência (depois das amostras de QC).

### 2.2.3 - Análise de plasma por CE-MS

As amostras de plasma extraído foram injetadas num capilar de sílica fundida (100 cm, 50 µm DI) aplicando-se 50 mbar por 50 s. Após a injeção da amostra, o eletrólito de corrida (1 mol/L ácido fórmico em 10% v/v metanol) foi injetado aplicando-se 100 mbar por 20 s para pré-concentrar a amostra *on-line* (*stacking*). A separação foi realizada em polaridade normal com 25 mbar de pressão interna e aplicando-se 30 kV por 30 min. A vazão do líquido auxiliar, composto de 50:50 metanol:água contendo duas massas de referência, purina (0,125 µmol/L, *m/z* 121,0509) e HP-0921 (0,0625 µmol/L *m/z* 922,0098), foi de 0,6 mL/min com uma razão de split de 1:100<sup>1</sup>. A espectrometria de massas foi feita em modo positivo de *m/z* 100 a 1000, com velocidade de scan de 1 spectra/s. A voltagem do capilar foi de 3500 V, do *fragmentor* 125 V, do *Skimmer* 65 V e do octopolo 750 V. Para o ESI, a temperatura do gás foi de 200 °C a uma pressão de 10 psi. Duas amostras de cada grupo foram analisadas com energia do *fragmentor* a 200 V, a fim de que os compostos se fragmentem na fonte de ionização, auxiliando na identificação dos compostos.

### 2.2.4 - Tratamento de dados

Os *molecular features*<sup>a</sup> foram extraídos, alinhados e integrados por meio do software MassHunter Profiler (versão B.06.00, Agilent Technologies). Uma identificação putativa dos metabólitos presentes em plasma foi realizada por meio de uma biblioteca *in-house* com dados de tempo de migração relativo ao padrão interno, massa exata e massa exata de fragmentos dos metabólitos formados na fonte de ESI. Os *molecular features* que foram identificados putativamente como fragmentos de metabólitos formados na fonte foram desconsiderados. Para serem descartados, os possíveis fragmentos, deveriam estar presentes na biblioteca,

---

<sup>a</sup> Os *molecular features* são metabólitos ainda não identificados, caracterizados por intervalos de *m/z* e tempo de retenção pré-definidos. Em processamentos com etapas de deconvolução, o *mf* é composto por um conjunto de *m/z*'s relacionados ao mesmo composto com mesmo tempo de retenção e formato de pico. Quando extraído de mais de uma amostra, o *mf* é caracterizado por estar agrupado e presente em diversas amostras.

apresentar mesmo tempo de migração do metabólito e mesmo formato de pico. Para preencher os *missing values*, um algoritmo de K-vizinhos mais próximos (KNN, do inglês *k-nearest neighbors*)<sup>2</sup> foi aplicado por meio do software MATLAB (Mathworks Inc., Natick, MA, EUA). As intensidades foram normalizadas pela área do padrão interno (metionina sulfona) e os *molecular features* que apresentaram coeficiente de variação nas amostras de QC maior que 30% foram removidos, por não serem uma medida confiável. Os dados foram então submetidos à análise multivariada por componentes principais (PCA) e análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) no SIMCA P+12.0 (Umetrics, Umeå, Suécia). Uma ANOVA de um fator e medidas repetidas foi realizada por um script *in-house* no MATLAB. A porcentagem de alteração e o *heatmap* foram feitos no Excel 2016 (Microsoft Office, Redmont, WA, EUA).

### **2.2.5 - Identificação dos compostos significativos**

Os compostos foram primeiramente putativamente identificados através da biblioteca *in-house* de compostos presentes no plasma, e pela plataforma CEU Mass Mediator<sup>3</sup>, que busca simultaneamente em diversos bancos de dados, como KEGG<sup>4</sup>, HMDB<sup>5</sup>, METLIN<sup>6</sup> e LIPID MAPS<sup>7</sup>. No total, 29 compostos significativos foram identificados por adição de padrão analítico às amostras.

## **2.3 - Análise metabolômica de amostras de plasma por GC-MS**

### **2.3.1 - Instrumentação**

As análises foram realizadas num cromatógrafo a gás (Agilent Technologies 7890A) acoplado com um espectrômetro de massas do tipo quadrupolo-tempo-de-vôo (Q-TOF: Agilent Technologies 7200). O cromatógrafo gasoso também estava acoplado a um amostrador multipropósito (GERSTEL MPS Autosampler, GERSTEL GmbH & Co. KG, Mülheim, Alemanha), sendo que as etapas de derivatização da amostra e adição do padrão interno foram automatizadas pelo instrumento. Foram utilizados também um vortex Fisherbrand (Thermo Fisher Scientific), uma centrífuga (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) e um concentrador rotativo de amostras a vácuo (Thermo Fisher Scientific) para a etapa de precipitação de proteínas e de secagem do sobrenadante. As análises foram realizadas no laboratório do grupo CEMBIO, da Profa Coral Barbas na Universidad CEU San Pablo em Boadilha del Monte na Espanha.

### 2.3.2 - Preparo de amostra

A uma alíquota de 50 µL de plasma, 150 µL de acetonitrila gelada foram adicionados. A mistura foi agitada em vortex por 2 min e deixada no gelo por 5 min. Na sequência, a amostra foi centrifugada (10 min, 15.400×g, 4 °C); exatamente 100 µL do sobrenadante foram transferidos para um vial, e evaporados até a secura. Quatro amostras de água, utilizadas como branco do sistema e reagentes, foram preparadas e injetadas no início e no final da lista de análise.

### 2.3.3 – Análise de plasma por GC-MS

O amostrador multipropósito (GERSTEL) realizou as etapas de derivatização (metoximação e sililação) e adição do padrão interno. Ao inserir uma lista de trabalho no equipamento, o software do amostrador multipropósito calcula os tempos de preparo de amostra, para que as amostras sejam injetadas logo após o seu preparo. Na primeira etapa, a amostra seca foi ressuspendida em 20 µL de hidrocloreto de o-metoxiamina (15 mg/mL) em piridina. A mistura foi agitada por 10 min e incubada a 70 °C por 1 h. Antes de adicionar o reagente sililante, a amostra fica por 5 min no amostrador (4 °C). Após esse período, foram adicionados 20 µL de BSTFA 1% TMCS e, em seguida, a amostra foi agitada por 5 min e incubada por 60 min a 70 °C. Após 5 min no amostrador (4 °C), adicionaram-se 100 µL de padrão interno (10 ppm, C18:0 metil estearato) em heptano. A mistura foi agitada por 1 min e 1 µL de amostra foi injetado a 250 °C, em modo split (razão 12:1), em uma coluna DB5-MS (30 m, 0,250 mm DI, 0,25 µm filme de 95 % dimetil, 5 % difenilpolisiloxano). A coluna foi mantida a 60 °C por 1 min, aquecida a 325 °C a uma taxa de 10°C/min e mantida a 325 °C por 10 min. A vazão do gás de arraste (He) utilizado foi de 1,5 mL/min. A amostra foi ionizada por elétrons (EI) a 70 eV. A análise foi realizada em modo positivo na faixa de  $m/z$  50-500.

### 2.3.4 - Tratamento de dados

A deconvolução e identificação dos metabólitos pelas bibliotecas FiehnLib e NIST 14 (NIST, Gaithersburg, MD, EUA) foram feitas no software Unknowns Analysis (Agilent Technologies). Alguns compostos foram identificados utilizando conjuntamente os softwares MassHunter Qualitative (versão B.06.00, Agilent Technologies) e NIST MS Search (NIST). As áreas dos compostos identificados e de alguns não identificados, foram integradas utilizando o software Mass Hunter Quantitative (versão B.06.00, Agilent Technologies), escolhendo um

íon como quantificador e dois íons como qualificadores dos compostos. Os compostos presentes nas amostras de brancos foram removidos da tabela de dados. Os dados foram normalizados pelo algoritmo LOESS (LOESS, do inglês *locally estimated scatterplot smoothing*)<sup>8</sup> baseado nas amostras de QC e na ordem de injeção por um script *in-house* no MATLAB. Os compostos com coeficiente de variação (CV) maior de 30% nas amostras de QC foram removidos. As análises de estatística univariada e multivariada foram feitas utilizando os mesmos softwares descritos para CE-MS.

## **2.4 - Análise metabolômica de amostras de plasma por RPLC-MS no modo positivo e negativo de ionização**

### **2.4.1 - Instrumentação**

As análises de cromatografia líquida foram realizadas em um cromatógrafo a líquido Agilent 1200 acoplado a um espectrômetro de massas do tipo quadrupolo tempo-de-voo (Q-TOF Agilent 6520). No preparo de amostras, empregou-se uma centrífuga (Eppendorf) e um vortex Fisherbrand. Os experimentos foram realizados no laboratório do grupo CEMBIO, da Profa Coral Barbas na Universidad CEU San Pablo em Boadilha del Monte na Espanha.

### **2.4.2 - Preparo de amostra**

Foram adicionados 140 µL de metanol gelado a 40 µL de plasma. A mistura foi agitada por vortex por 2 min. Após 5 min em temperatura ambiente, 140 µL de éter metil t-butílico (MTBE) foram adicionados a essa mistura, que foi homogeneizada por vortex por 2 min, centrifugada e o sobrenadante foi reservado para injeção no cromatógrafo. Um *pool* de todas as amostras de plasma foi utilizado e preparado 16 vezes como amostras de controle de qualidade (QC). Essas amostras de controle de qualidade foram injetadas 10 vezes no início, a cada 6 amostras e uma vez no final das análises. Por dia, foram preparadas cerca de 40 amostras (incluindo amostras do experimento e amostras de controle de qualidade) para minimizar a decomposição das amostras.

### **2.4.3 - Análise de plasma por RPLC-MS**

Uma alíquota de 5 µL de plasma tratado foi injetada numa coluna Agilent Poroshell 120 EC-C8 column (150×2,1 mm, 2,7 µm) mantida a 60 °C. Para o modo negativo, a fase móvel A consistia em 0,1% ácido fórmico aquoso e B 15:85:0.1 isopropanol:metanol:ácido fórmico

(v/v). Para o modo positivo, a fase móvel A consistia em uma solução aquosa a 10 mmol/L de formiato de amônio e B 10 mmol/L formiato de amônio em 15:85 isopropanol:metanol (v/v). A bandeja de amostra foi mantida a 15 °C durante as análises. O gradiente utilizado foi: 0-23 min (75-96 %B), 23-31 min (96 %B), 31-31.5 min (96-100 %B), 31,5-32,5 (100 %B), 32,5-33 min (100-75 %B), 33-40 min (75%B) a uma vazão de 0,4 mL/min<sup>9</sup>. A espectrometria de massas foi feita na faixa de  $m/z$  de 100-1200 para o modo positivo e 100-1000 para o modo negativo, a uma velocidade de 1,05 spectras/s. Para os dois modos, a voltagem do capilar foi de 4500 V, do *fragmentor* 175 V, do *Skimmer* 65 V e do octopolo 750 V. Para o ESI, a temperatura do gás foi de 350 °C a uma pressão de 40 psi. Uma solução contendo massas de referência (5 µmol/L de purina, 1,13 µmol/L de HP-0921 e 0,05 mmol/L de TFANH<sub>4</sub>) em 95:5 acetonitrila:água era continuamente analisada para correção de  $m/z$  num sistema de dual ESI. Ao final das análises metabolômicas, algumas amostras foram injetadas no modo de aquisição dependente de dados (DDA, do inglês *data dependent acquisition*) em dois métodos para cada modo de ionização, com energia de colisão de 20 V em um método e de 40 V para o segundo método, com velocidade de aquisição de 1,05 espectros/s para o modo MS e 1,8 espectros/s para o modo de MS/MS, com um máximo de 2 precursores por ciclo, uma janela de isolamento de 1,3 amu para o MS/MS e com uma lista de exclusão de  $m/z$  presentes em abundância na análise de brancos de preparo (modo positivo: 121,0509; 149,0233; 322,0481; 922,0098; modo negativo: 299,2590; 955,9707; 154,9733; 248,9545; 174,9554; 339,1993; 343,9943; 325,1836; 119,0363; 112,9856; 966,0007; 383,3532) com uma janela de 50 ppm para exclusão, para obtenção de espectros de MS/MS para identificação.

#### 2.4.4 - Tratamento de dados

Os *molecular features* foram extraídos, alinhados e integrados por meio do software MassHunter Profiler (versão B.06.00, Agilent technologies). Os *missing values* foram substituídos pela metade da menor área entre os molecular features adjacentes. As intensidades foram normalizadas pelo algoritmo LOESS no MATLAB e os *molecular features* que apresentaram coeficiente de variação nas amostras de QC maior que 30% foram removidos, por não serem uma medida confiável. Os dados foram então submetidos à análise multivariada por componentes principais (PCA) e análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) no SIMCA P+12.0. Uma ANOVA de um fator e medidas repetidas foi realizada por um script *in-house* no MATLAB. A porcentagem de alteração e o *heatmap* foram feitos no Excel (Microsoft Office).

## 2.4.5 - Identificação dos compostos significativos

Os compostos significativos foram putativamente identificados pela plataforma CEU Mass Mediator<sup>3</sup>. Para a busca, uma tolerância de 10 ppm na massa exata foi adotada e foram considerados os seguintes adutos:  $[M-H]^-$ ,  $[M+Cl]^-$ ,  $[M+HCOOH-H]^-$  e  $[M-H-H_2O]^-$  para o modo negativo, e  $[M+H]^+$ ,  $[M+Na]^+$ ,  $[M+K]^+$ ,  $[M+NH_4]^+$ ,  $[M+H-H_2O]^+$  para o modo positivo. A confirmação da identificação dos compostos foi realizada pelo espectro de fragmentação utilizando o software MS-DIAL<sup>10</sup> para visualização dos espectros e pelo padrão característico de fragmentação de algumas classes de lipídeos, ou comparando com espectros contidos no METLIN<sup>6</sup>.

## 2.5 - Análise metabolômica de amostras de urina por RPLC-MS no modo positivo

### 2.5.1 - Instrumentação

As análises cromatográficas de amostras de urina de cerca de 40 pacientes no tempo basal, após um mês e 6 meses de dois tratamentos diferentes (CS – clopidogrel e sinvastatina ou TR – ticagrelor e rosuvastatina) foram realizadas em um cromatógrafo a líquido Agilent 1260 Infinity II, acoplado a um espectrômetro de massas com analisador de massas do tipo quadrupolo tempo-de-voe (Q-TOF) Agilent 6530. No preparo de amostras empregou-se uma mini centrífuga (BioPet technologies, Siracusa, Nova York, EUA) e um vortex Kasvi (São José do Pinhais, Paraná, Brasil). Os dados foram obtidos no laboratório do Prof. Dr. Marcone Augusto Leal de Oliveira na Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG.

### 2.5.2 - Preparo de amostra

Uma alíquota de 450  $\mu$ L de metanol gelado contendo 66,67  $\mu$ mol/L de p-fluorofenilalanina como padrão interno foi adicionada a 150  $\mu$ L de urina (concentração final do padrão interno de 50  $\mu$ mol/L). A mistura foi homogeneizada por vortex. Após 30 min a -20 °C, a amostra foi centrifugada (7200 rpm, 10 min) e o sobrenadante foi injetado. Um *pool* do sobrenadante de todas as amostras de urina foi utilizado como amostras de controle de qualidade (QC). Essas amostras de controle de qualidade foram injetadas 8 vezes no início, a cada 10 amostras e uma vez no final das análises. Uma amostra de água (150  $\mu$ L) foi preparada da mesma maneira que as amostras de urina, sendo utilizada como amostra de branco de

preparo, e foi injetada duas vezes antes das amostras de urina e duas vezes após as amostras de urina.

### 2.5.3 - Análise de urina por RPLC-MS

Uma alíquota de 0,5  $\mu\text{L}$  de urina tratada foi injetada numa coluna Phenomenex (Torrance, CA, EUA) Kinetex PFP (150 $\times$ 2,1 mm, 2,6  $\mu\text{m}$ ) conectada a uma pré-coluna Phenomenex PFP (2,1 mm) mantida a 40 °C. A fase móvel A consiste em 0,1% ácido fórmico aquoso e B 0,1% ácido fórmico em metanol (v/v). A bandeja de amostra foi mantida a 4 °C durante as análises. O gradiente utilizado foi: 0-1 min (0 %B), 1-2,5 min (0-25 %B), 2,5-3 min (25-90 %B), 3-5 min (90-100 %B), 5-8 min (100 %B), 8-8,1 min (100-0 %B), 8,1-17,5 min (0 %B) a uma vazão de 0,3 mL/min. A espectrometria de massas foi feita na faixa de  $m/z$  de 75-1200 a uma velocidade de 1 spectra/s. A voltagem do capilar foi de 3500 V, do *fragmentor* 125 V, do *Skimmer* 65 V, do *Nozzle* de 1000 V e do octopolo 750 V. Para o ESI, a pressão do nebulizador foi de 30 psi, a temperatura do gás de secagem foi de 250 °C a uma vazão de 8 L/min. Para o gás de impulsão (*sheath gas*) do sistema de Jet Stream, a temperatura foi de 350 °C a uma vazão de 11 L/min. Uma solução 95:5 acetonitrila:água contendo massas de referência (purina 5  $\mu\text{mol/L}$ , HP-0921 2,5  $\mu\text{mol/L}$ ) era continuamente analisada para correção de  $m/z$  num sistema de dual Jet Stream ESI (Agilent Technologies). Após 8,5 min de análise, o efluente proveniente da cromatografia líquida era desviado do espectrometro de massas para o rejeito.

### 2.5.4 - Tratamento de dados

Os dados obtidos a partir das análises em triplicata de urina humana foram pré-tratados com o software livre R (versão 3.5.2)<sup>11</sup> e pelo pacote XCMS<sup>12,13</sup> (versão 3.4.4). Primeiramente, os dados cromatográficos foram convertidos para o formato “.mzXML” para serem lidos pelo pacote XCMS utilizando o msConvert (ProteoWizard)<sup>14</sup>. Os *molecular features* foram extraídos por meio do algoritmo centWave do XCMS (peakwidth = c(3, 40), ppm=70, mzdifff = 0.01, prefilter=c(3,800), noise=600, snthresh=12) e agrupados pelo algoritmo density (minFraction=0.7, bw=3, binSize=0.012). Os *missing values* foram preenchidos com o algoritmo FillPeaks (ppm=3). A tabela de dados foi obtida no formato de valores separados por tabulação (.tsv), e os dados foram então tratados no programa Excel (Microsoft Office 2016), onde os *molecular features* detectados em 4 ou 3 amostras dos brancos de preparo (4 brancos) foram removidos e a área dos demais *molecular features* que apareceram em 2 brancos foram

descontadas da média da área dos brancos. As análises foram normalizadas pela mediana utilizando o MetaboAnalyst<sup>15</sup>. O coeficiente de variação das amostras de controle de qualidade após a normalização foram calculados e *molecular features* com CV maior que 30% foram removidos. A análise multivariada (PCA e PLS-DA) foi realizada utilizando o software SIMCA P+12.0. A análise univariada foi feita no MATLAB (Mathworks Inc.). Os compostos significativos foram verificados no Skyline<sup>16</sup>.

### **2.5.5 - Identificação dos metabólitos significativos**

Os compostos significativos foram putativamente identificados pela plataforma CEU Mass Mediator<sup>3</sup>. Para a busca, uma tolerância de 10 ppm na massa exata foi adotada e foram considerados os seguintes adutos  $[M+H]^+$ ,  $[M+Na]^+$ ,  $[M+K]^+$  e  $[M+H-H_2O]^+$ .

## **2.6- Análise metabolômica de amostras de urina por HILIC-MS no modo positivo e negativo**

### **2.6.1 - Instrumentação**

As análises foram realizadas num sistema de HPLC (Prominence, Shimadzu, Kyoto, Japão) acoplado a um espectrômetro de massas com analisador do tipo quadupolo-tempo-de-vôo e ionização por electrospray (microQTOF II, Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). Para o preparo de amostras empregou-se uma centrífuga (Sigma, Osterode, Alemanha) e um vortex (Kasvi). Os experimentos de otimização e as análises metabolômicas foram realizados no laboratório do Prof. Massuo Jorge Kato no Instituto de Química da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

### **2.6.2 - Otimização do preparo de amostras de urina para HILIC-MS**

Para a otimização do preparo de amostras, adicionaram-se 10  $\mu$ L de padrão interno (p-fluorofenilalanina) 9020  $\mu$ mol/L e 300  $\mu$ L de solvente gelado (acetonitrila, isopropanol ou 1:1 acetonitrila:isopropanol) a 100  $\mu$ L de amostra de um *pool* de urina de voluntários saudáveis. A mistura foi homogeneizada no vortex, e após 30 min em repouso a -20 °C, foi centrifugada (10 min, 13000 rpm). A 100  $\mu$ L de sobrenadante, adicionaram-se 10  $\mu$ L de solução do segundo padrão interno (modo positivo: clorocolina 550  $\mu$ mol/L e modo negativo: ácido 4-bromobenzóico 2200  $\mu$ mol/L). As amostras foram preparadas em triplicata. Alíquotas de água também foram submetidas ao mesmo procedimento de preparo de amostras, para servirem

como branco de preparo. Para a otimização do método cromatográfico, as amostras foram preparadas utilizando 1:1 acetonitrila:isopropanol para a precipitação de proteínas. As amostras de urina foram analisadas de acordo com o procedimento descrito no item abaixo (Capítulo 3 - item 2.6.3) com a fase móvel I nos dois modos de ionização e com o gradiente 10-35 %B (0 - 4 min), 35-50 %B (4 - 6,5 min), 50-95 %B (6,5 - 7 min), 95 % B (7-9 min), 95-10 %B (9-9,1 min), 10 %B (9,1-20 min) no modo negativo e com o gradiente 10-50 %B (0-3,3 min), 50-95 %B (3,3-5 min), 95 %B (5 - 10 min), 95-10 %B (10-10,1 min), 10 %B (10,1-18,5 min) no modo positivo.

### **2.6.3 - Otimização cromatográfica de urina por HILIC-MS**

Foram injetados 3 e 5 µL de amostra, no modo positivo e negativo respectivamente, numa coluna Kinetex HILIC (150 x 2,1 mm, 2,6 µm) da Phenomenex conectada a uma pré-coluna Phenomenex HILIC (2,1 mm) mantida a 40 °C. As fases móveis testadas para o modo negativo foram a fase móvel I, que tem como solvente A 95:5 acetonitrila:solução aquosa 200 mmol/L formiato de amônio com pH = 6,4 (sem ajuste de pH), e como solvente B, solução aquosa de formiato de amônio a 10 mmol/L e a fase móvel II que apresenta como solvente A 95:5 acetonitrila:solução aquosa 200 mmol/L de acetato de amônio, e como solvente B, solução aquosa de 10 mmol/L de acetato de amônio (pH = 6,8, sem ajuste de pH). Para o modo positivo foram testadas duas fases móveis, a fase móvel I e a fase móvel III, que apresenta como solvente A 95:5 acetonitrila:solução aquosa 200 mmol/L de formiato de amônio com pH = 3,0 (ajustado com ácido fórmico), e como solvente B, solução aquosa de formiato de amônio 10 mmol/L de pH = 3 (ajustado com ácido fórmico). O gradiente utilizado nos testes foi 10-50 %B (0-3,3 min), 50-95 %B (3,3-5 min), 95%B (5-10 min), 95-10 %B (10-10,1 min), 10 %B (10,1-20 min) a uma vazão de 0,23 mL/min. Uma solução de formiato de sódio 10 mmol/L em 50:50 isopropanol:água foi infundida ao final da corrida para calibração da massa exata (sem passar pela coluna cromatográfica).

O espectro de massas foi obtido no modo de ionização negativo e positivo na faixa de m/z de 70-1000, e os parâmetros do espectrômetro de massas foram: tensão do capilar 3500 V (modo negativo)/ 4000 V (modo positivo); pressão do nebulizador 4 bar; vazão do gás de secagem (N<sub>2</sub>) 8,0 mL/min e temperatura de dessolvatação 200 °C.

#### 2.6.4 – Tratamento de dados da otimização de preparo de amostras e cromatográfica

Os dados obtidos a partir das análises em triplicata de urina humana pelos diferentes métodos cromatográficos foram pré-tratados com o software livre R (versão 3.5.2)<sup>11</sup> e pelo pacote XCMS<sup>12,13</sup> (versão 3.4.4). Primeiramente, os dados cromatográficos foram exportados no software DataAnalysis 4.0 (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) para o formato “.mzXML” para serem lidos pelo pacote XCMS. Os molecular features foram extraídos por meio do algoritmo centWave do XCMS (modo negativo: peakwidth = c(15, 120), ppm=50, mzdiff = 0.01, prefilter=c(3,400), noise=200; no modo positivo: peakwidth = c(15, 120), ppm=70, mzdiff = 0,01, prefilter=c(3,400), noise=200), agrupados pelo algoritmo density (minSamples =2, bw=20). A seguir, o tempo de retenção dos grupos de *molecular features* foram alinhados pelo algoritmo peakgroups (modo negativo: minFraction = 0.7, family="symmetric", smooth="loess/modo positivo: sem essa etapa) e os *molecular features* foram reagrupados utilizando novamente o algoritmo density (modo negativo: bw=15, binSize=0,1, minFraction=1; modo positivo: bw=5, binSize=0,03, minFraction=1 ). A tabela de dados foi obtida no formato de valores separados por tabulação (.tsv), e os dados foram então tratados no programa Excel (Microsoft Office 2016), onde os molecular features detectados em todas as amostras das réplicas analisadas foram contabilizados, e a média do coeficiente de variação (CV) da intensidade de todos os *molecular features* foi calculada. Os cromatogramas de pico de base (BCP, do inglês *base peak chromatogram*) e do íon extraído de alguns metabólitos foram obtidos pelo software R.

#### 2.6.5 - Análise metabolômica de urina por HILIC-MS

Adicionaram-se 300 µL de solvente gelado (1:1 acetonitrila:isopropanol) contendo p-fluorofenilalanina 133,3 µmol/L a 100 µL de amostra de urina dos pacientes. A mistura foi homogeneizada no vortex e após 30 min em repouso a -20 °C, centrifugada (10 min, 13000 rpm) e o sobrenadante recolhido e analisado. Um *pool* do sobrenadante de todas as amostras de urina foi utilizado como amostras de controle de qualidade (QC). Essas amostras de controle de qualidade foram injetadas 10 vezes no início, a cada 10 amostras e uma vez no final das análises. Uma amostra de água (100 µL) foi preparada da mesma maneira que as amostras de urina, sendo utilizada como amostra de branco de preparo e foi injetada duas vezes antes das amostras de urina e duas vezes após as amostras de urina. As amostras foram analisadas segundo o método descrito no Capítulo 3 – item 2.6.3 com a fase móvel que apresenta o solvente A contendo 95:5 acetonitrila:solução aquosa 200 mmol/L formiato de amônio com pH

= 6,4 (sem ajuste de pH), e como solvente B, solução aquosa de formiato de amônio 10 mmol/L, e com o tempo de corrida de 18,5 min ao invés de 20 min.

### 2.6.6 - Tratamento de dados

Os dados obtidos a partir das análises em triplicata de urina humana pelos diferentes métodos cromatográficos foram pré-tratados com o software livre R (versão 3.5.2)<sup>11</sup> e pelo pacote XCMS<sup>12,13</sup> (versão 3.4.4). Primeiramente, os dados cromatográficos foram calibrados e convertidos para o formato “.cdf” para serem lidos pelo pacote XCMS utilizando um script no Data Analysis (Bruker Daltonics). Os *molecular features* foram extraídos por meio do algoritmo centWave do XCMS (modo negativo: peakwidth = c(15, 120), ppm=70, mzdifff = 0,01, prefilter=c(3,400), noise=200); modo positivo: peakwidth = c(15, 180), ppm=100, mzdifff = 0.01, prefilter=c(3,400), noise=200). Os *molecular features* entre 0,5 min e 10 min foram alinhados pelo algoritmo obiwarp (binSize=0,025) e agrupados pelo algoritmo density (modo negativo: minFraction=0,75,bw=30, binSize=0,03; modo positivo: minFraction=0,75, bw=30, binSize=0,025). Os *missing values* foram preenchidos com o algoritmo FillPeaks. A tabela de dados foi obtida no formato de valores separados por tabulação (.csv), e os dados foram então tratados no programa Excel (Microsoft Office 2016), onde os *molecular features* detectados nos brancos de preparo e com a razão das médias das áreas das amostras pela média das áreas do branco menores que 10 foram removidos. As análises foram normalizadas utilizando a ordem de injeção e os controles de qualidade por LOWESS<sup>17</sup>. O coeficiente de variação das amostras de controle de qualidade após a normalização foram calculados e *molecular features* com CV maior que 30% foram removidos. A análise multivariada (PCA e PLS-DA) foi realizada no software SIMCA P+12 e a análise univariada de ANOVA de medidas repetidas foi executada no MATLAB. Os compostos significativos foram verificados no Skyline<sup>16</sup>.

### 2.6.7 - Identificação dos compostos significativos

Os compostos significativos foram identificados putativamente pela plataforma CEU Mass Mediator<sup>3</sup>. Para a busca, uma tolerância de 10 ppm na massa exata foi adotada e foram considerados os seguintes adutos: [M-H]<sup>-</sup>, [M+Cl]<sup>-</sup>, [M+HCOOH-H]<sup>-</sup> e [M-H-H<sub>2</sub>O]<sup>-</sup> para o modo negativo e [M+H]<sup>+</sup>, [M+Na]<sup>+</sup>, [M+K]<sup>+</sup>, [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>, [M+H-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> para o modo positivo.

### 3 - Bibliografía

- <sup>1</sup> González-Domínguez, R.; García, A.; García-Barrera, T.; Barbas, C.; Gómez-Ariza, J.L. *Electrophoresis* 2014, 35:3321–3330.
- <sup>2</sup> Armitage, E.G.; Godzien, J.; Alonso-Herranz, V.; López-Gonzálvez, A.; Barbas, C. *Electrophoresis* 2015, 36:3050–3060.
- <sup>3</sup> Gil-de-la-Fuente, A.; Godzien, J.; Saugar, S.; Garcia-Carmona, R.; Badran, H.; Wishart, D.S.; Barbas, C.; Otero, A. *J. Proteome Res.* 2019, 18(2):797–802.
- <sup>4</sup> Kanehisa, M.; Goto, S.; Hattori, M.; Aoki-Kinoshita, K. F.; Itoh, M.; Kawashima, S.; Katayama, T.; Araki, M.; Hirakawa, M. *Nucleic Acids Res* 2006, 34:D354-D357.
- <sup>5</sup> Wishart, D. S.; Tzur, D.; Knox, C.; Eisner, R.; Guo, A. C.; Young, N.; Cheng, D.; Jewell, K.; Arndt, D.; Sawhney, S.; Fung, C.; Nikolai, L.; Lewis, M.; Coutouly, M. A.; Forsythe, I.; Tang, P.; Shrivastava, S.; Jeroncic, K.; Stothard, P.; Amegbey, G.; Block, D.; Hau, D. D.; Wagner, J.; Miniaci, J.; Clements, M.; Gebremedhin, M.; Guo, N.; Zhang, Y.; Duggan, G. E.; Macinnis, G. D.; Weljie, A. M.; Dowlatabadi, R.; Bamforth, F.; Clive, D.; Greiner, R., Li, L.; Marrie, T.; Sykes, B. D.; Vogel, H.J.; Querengesser, L. *Nucleic Acids Res* 2007, 35:D521-D526.
- <sup>6</sup> Tautenhahn, R.; Cho, K.; Uritboonthai, W.; Zhu, Z. J.; Patti, G. J.; Siuzdak, G. *Nat Biotechnol*, 2012, 30:826-828.
- <sup>7</sup> Fahy, E.; Sud, M.; Cotter, D.; Subramaniam, S. *Nucleic Acids Res* 2007, 35: W606-W612.
- <sup>8</sup> Dunn, W.B.; Broadhurst, D.; Begley, P.; Zelena, E.; Francis-McIntyre, S.; Anderson, N.; Brown, M.; Knowles, J.D.; Halsall, A.; Haselden, J.N.; Nicholls, A.W.; Wilson, I.D.; Kell, D.B.; Goodacre, R.; Human Serum Metabolome (HUSERMET) Consortium *Nat Protoc.* 2011, 6(7):1060-1083.
- <sup>9</sup> Ciborowski, M.; Javier Rupérez, F.; Martínez-Alcázar, M. P.; Angulo, S.; Radziwon, P.; Olszanski, R.; Kloczko, J.; Barbas, C. *J Proteome Res* 2010, 9(8), 4131–4137.
- <sup>10</sup> Tsugawa, H.; Ikeda, K.; Takahashi, M.; Satoh, A.; Mori, Y.; Uchino, H.; Okahashi, N.; Yamada, Y.; Tada, I.; Bonini, P.; Higashi, Y.; Okazaki, Y.; Zhou, Z.; Zhu, Z. J.; Koelmel, J.; Cajka, T.; Fiehn, O.; Saito, K.; Arita, M.; Arita, M. *Nature Biotechnol* 2020, 38(10), 1159–1163.
- <sup>11</sup> R Core Team. *R Foundation for Statistical Computing*, 2020, Vienna, Austria (<https://www.R-project.org/>).
- <sup>12</sup> Colin A. S.; Want, E. J.; O’maille, G., Abagyan, R., Siuzdak, G. *Anal Chem* 2006, 78:779-787.
- <sup>13</sup> Gary, J.P.; Tautenhahn, R.; Siuzdak, G. *Nature Protocols* 2012, 7:508-516.

<sup>14</sup> Chambers, M.C.; Maclean, B.; Burke, R.; Amodei, D.; Ruderman, D.L.; Neumann, S.; Gatto, L.; Fischer, B.; Pratt, B.; Egertson, J.; Hoff, K.; Kessner, D.; Tasman, N.; Shulman, N.; Frewen, B.; Baker, T.A.; Brusniak, M.Y.; Paulse, C.; Creasy, D.; Flashner, L.; Kani, K.; Mulding, C.; Seymour, S.L.; Nuwaysir, L.M.; Lefebvre, B.; Kuhlmann, F.; Roark, J.; Rainer, P.; Detlev, S.; Hemenway, T.; Huhmer, A.; Langridge, J.; Connolly, B.; Chadick, T.; Holly, K.; Eckels, J.; Deutsch, E.W.; Moritz, R.L.; Katz, J.E.; Agus, D.B.; MacCoss, M.; Tabb, D.L.; Mallick, P. *Nature Biotech.*, 2012, 30:918–920.

<sup>15</sup> Chong, J.; Wishart, D. S.; Xia, J. *Current Protoc Bioinformatics* 2019, 68(1):e86.

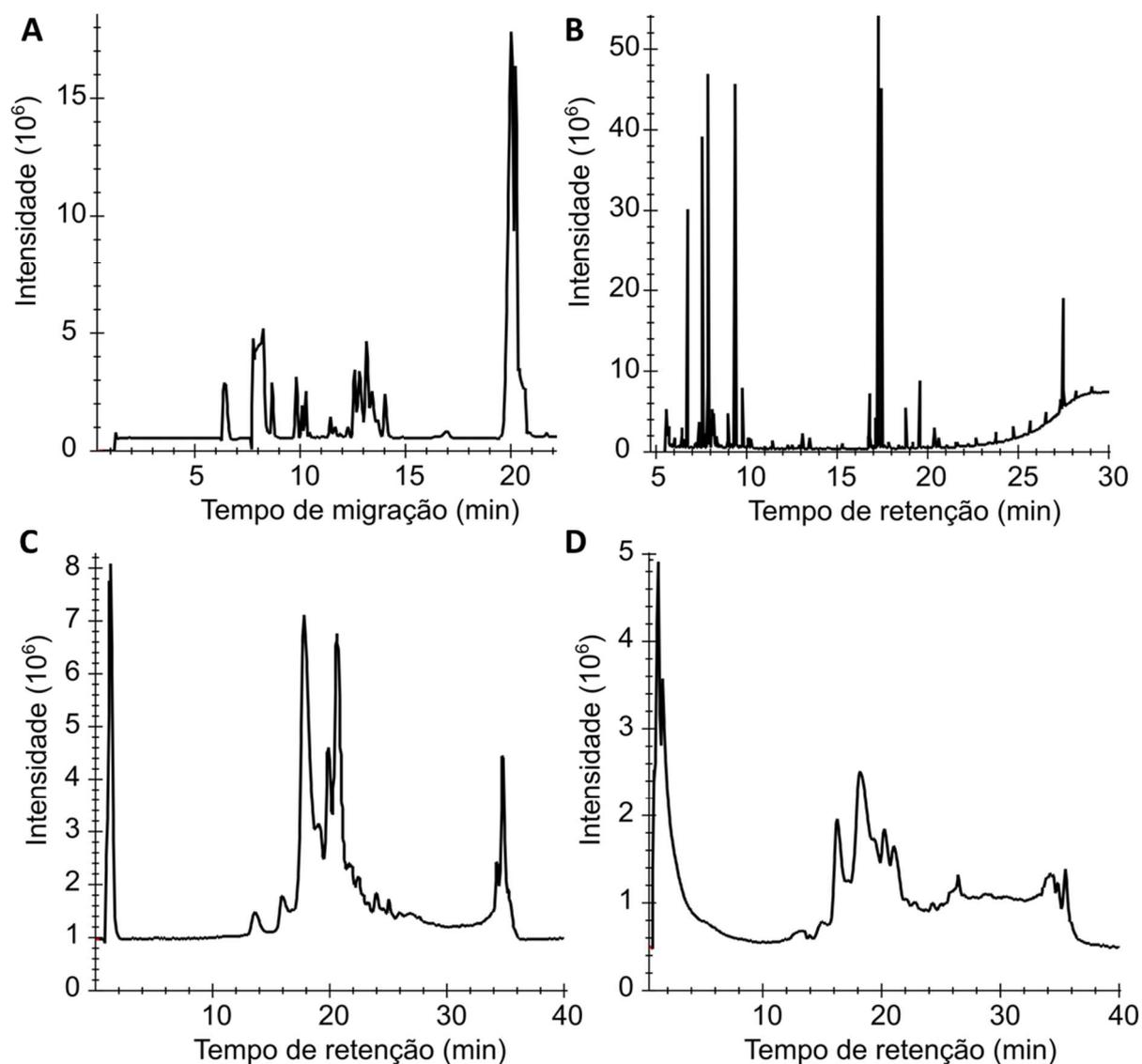
<sup>16</sup> Adams, K. J.; Pratt, B.; Bose, N.; Dubois, L. G.; John-Williams, L. S.; Perrott, K. M.; Ky, K.; Kapahi, P.; Sharma, V.; MacCoss, M. J.; Moseley, M. A.; Colton, C. A.; MacLean, B. X.; Schilling, B.; Thompson, J. W.; Alzheimer's Disease Metabolomics Consortium *J Proteome Res* 2020, 19(4): 1447–1458.

<sup>17</sup> Tsugawa, H.; Kanazawa, M.; Ogiwara, A.; Arita, M. *Bioinformatics* 2014, 30:2379–2380.

## **Capítulo 4 – Resultados e Discussão**

## 1 - Análise metabolômica global multiplataforma de plasma

Inicialmente 50 pacientes que chegaram ao Hospital São Paulo após sofrerem um infarto agudo do miocárdio foram divididos nos grupos de tratamento clopidogrel+sinvastativa (CS-b, n=24) ou ticagrelor+rosuvastatina (TR-b, n=26) e suas amostras de plasma e urina foram coletadas no tempo basal. Após trinta dias de tratamento, amostras de plasma e urina de 40 desses pacientes também foram coletadas para análise por metabolômica *untarget* (CS-t n=19 e TR-t, n=21). As amostras de plasma desses pacientes foram analisadas por CE-MS (modo positivo), GC-MS (modo positivo) e RPLC-MS (modo positivo e negativo), para se obter uma maior cobertura metabólica, e eletroferograma/cromatogramas típicos estão apresentados na Figura 7.



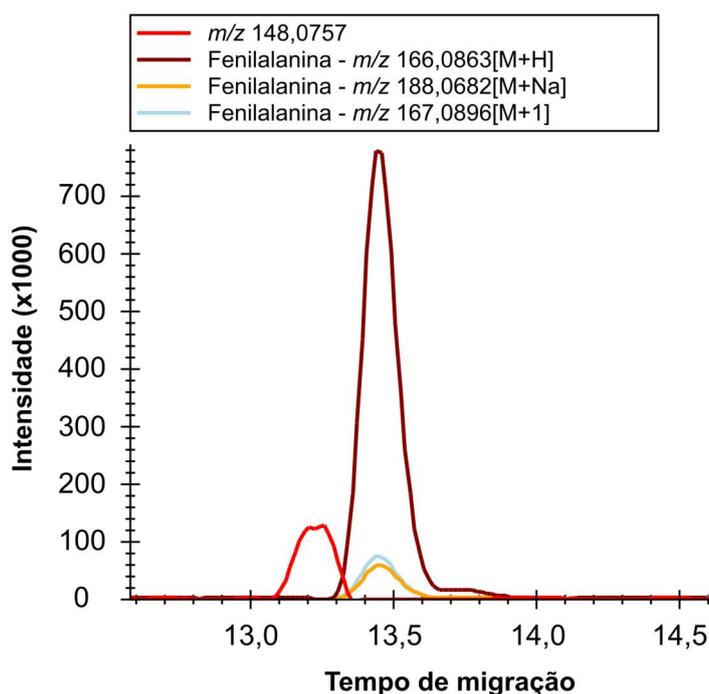
**Figura 7-** Cromatograma de íons totais (TIC) das análises de plasma por CE-MS (A), GC-MS(B) e RPLC-MS no modo positivo (C) e negativo (D).

As análises de plasma por técnicas de separação acopladas à espectrometria de massas geram dados complexos em três dimensões (tempo de retenção/migração, intensidade e  $m/z$ ) que devem ser pré-processados para obtenção de uma matriz de dados para a comparação do metaboloma dos grupos e comparação temporal dos tratamentos.

Os dados de CE-MS e RPLC-MS (modo positivo e negativo) foram obtidos por um analisador de massas de alta resolução e por ionização por eletrospray, um tipo de ionização branda, em que forma-se majoritariamente moléculas protonadas/desprotonadas e/ou cationizadas/anionizadas. Assim, a forma de pré-processar os dados oriundas dessas duas técnicas analíticas é bastante similar.

Dessa forma, os dados de CE-MS e RPLC-MS foram pré-processados no software MassHunter Profiler (Agilent), que usa um algoritmo para detectar os picos presentes nas amostras, integrar as áreas desses picos e agrupá-los em *molecular features*<sup>a</sup>. Esse software permite uma verificação visual do resultado, bem como correções de integração das áreas obtidas, resultando na obtenção de dados de qualidade.

Além disso, o software também agrupa num único *molecular feature*,  $m/z$  relacionados ao mesmo composto, como diferentes adutos ( $[M+H]^+$ ,  $[M+Na]^+$ ,  $[M+H-H_2O]^+$ ,  $[M+NH_4]^+$ ) e picos isotópicos (M+1, M+2), um processo conhecido como deconvolução. Esse agrupamento de  $m/z$  referente ao mesmo composto está exemplificado na Figura 8 para a fenilalanina. Na Figura 8 podemos observar pelo mesmo formato de pico, tempo de migração e pelas diferenças de massa, que há a presença dos adutos  $[M+H]^+$  e  $[M+Na]^+$ , além do pico isotópico M+1 para a fenilalanina.



**Figura 8** – Eletroferogramas dos íons extraídos de  $m/z$  148,0757,  $m/z$  166,0863,  $m/z$  188,0682,  $m/z$  167,0896 obtidos de análise de plasma por CE-MS.

<sup>a</sup> Os *molecular features* são metabólitos ainda não identificados, caracterizados por intervalos de  $m/z$  e tempo de retenção pré-definidos. Em processamentos com etapas de deconvolução, o *mf* é composto por um conjunto de  $m/z$ 's relacionados ao mesmo composto com mesmo tempo de retenção e formato de pico. Quando extraído de mais de uma amostra, o *mf* é caracterizado por estar agrupado e presente em diversas amostras.

Também podemos verificar que o pico referente à  $m/z$  148,0757, que pela massa exata poderia ser o  $[M+H-H_2O]^+$  da fenilalanina, na verdade pertence a outra molécula, pois apresenta um tempo de migração e formato de pico diferentes do  $[M+H]^+$  da fenilalanina.

Dessa forma, foram obtidos 204, 534 e 642 *molecular features* das análises de plasma dos pacientes por CE-MS e RPLC-MS no modo positivo e negativo, respectivamente.

Os dados de GC-MS foram obtidos também por um analisador de massas de alta resolução, porém ao contrário dos dados de CE-MS e RPLC-MS, os dados de GC-MS foram adquiridos por ionização por elétrons, um tipo de ionização mais energética, em que a molécula é bastante fragmentada na fonte. Portanto, os dados obtidos por GC-MS são tratados de uma outra forma.

Inicialmente, os picos de todas as amostras, representados por um  $m/z$  e  $t_R$ , são extraídos por um algoritmo; então o software realiza uma deconvolução dos dados, para juntar  $m/z$  referentes ao mesmo composto num único *molecular feature* e, para obter um espectro de massas deconvoluido para cada composto. A deconvolução realizada aqui é similar à mostrada anteriormente para CE-MS e RPLC-MS, mas essa leva em conta apenas o tempo de retenção e formato de pico (e não a diferença na massa e possíveis adutos). A fragmentação gerada por EI dá origem a um espectro de massas característico para cada composto. Os espectros de massas gerados por GC-MS são altamente reproduzíveis, mesmo com equipamentos de marcas diferentes, e assim, podem ser comparados com bibliotecas. Após a deconvolução, todos os espectros de massas gerados no presente trabalho foram comparados com espectros de massas das bibliotecas FiehnLib<sup>1</sup> e NIST (NIST, Gaithersburg, MD, EUA) para a identificação dos compostos.

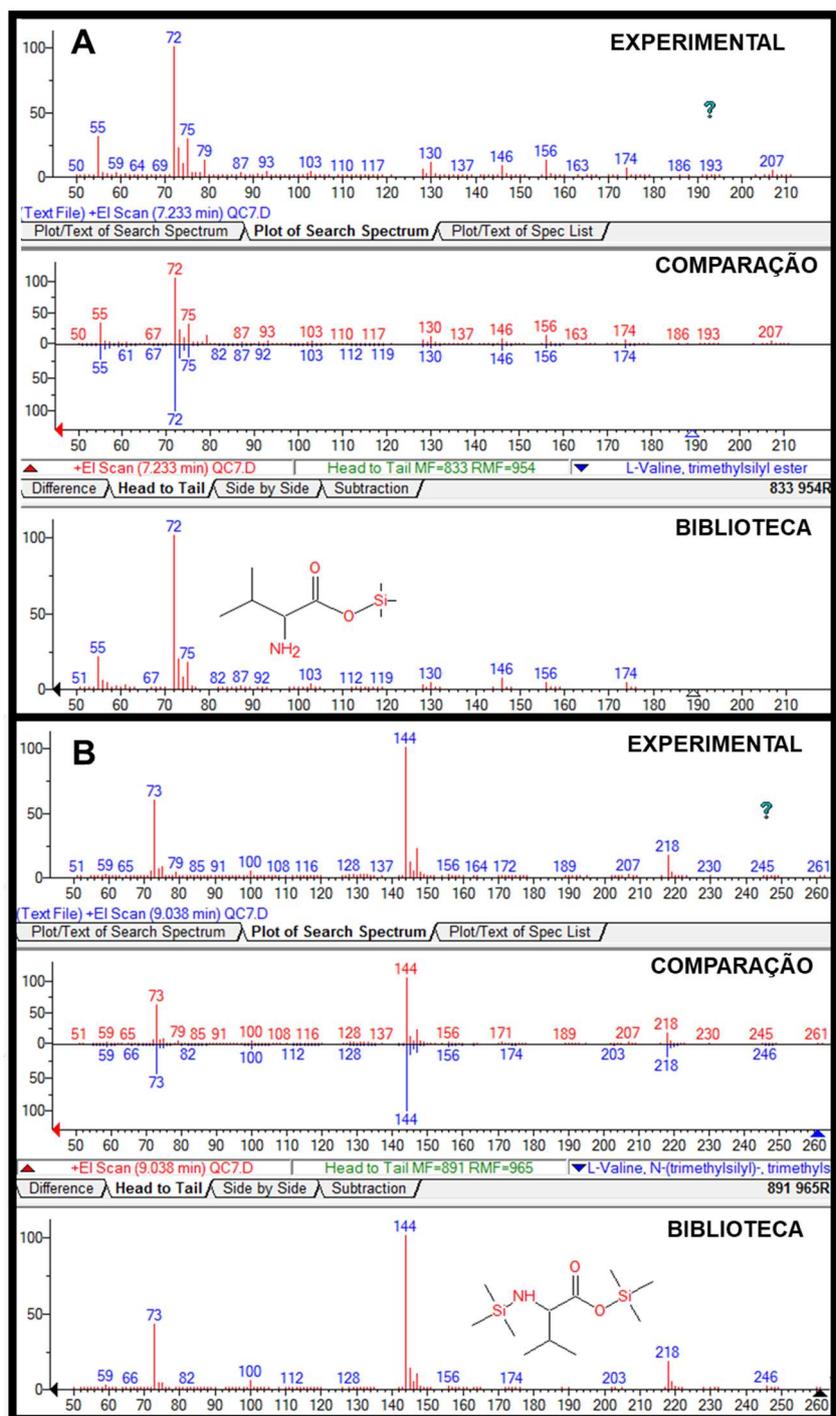
Nesse trabalho optou-se por empregar o método cromatográfico desenvolvido por Fiehn, bem como o mesmo tipo de derivatização (metoximação/ trimetilsililação), que permite acesso à biblioteca do autor, para posterior identificação dos compostos. A primeira etapa de derivatização consiste na metoximação para proteção de grupos de cetos-álcoois e principalmente de açúcares, que podem estar na forma de cadeia aberta ou fechada e resultar em múltiplos produtos de derivatização, tornando o cromatograma muito mais complexo. O trabalho de Yi *et al.* evidenciou a importância da etapa de metoximação ao derivatizar uma amostra de padrão de glicose com apenas uma etapa de sililação, e para comparar, em outro experimento, derivatizou a amostra com uma etapa de metoximação seguida pela etapa de sililação<sup>2</sup>. A derivatização sem a etapa de metoximação resultou em mais de 20 picos no cromatograma, enquanto que a derivatização em duas etapas resultou apenas em dois picos. A etapa de trimetilsililação substitui hidrogênios ácidos de grupos funcionais como ácidos

carboxílicos (-COOH), alcóois (-OH), aminas (-NH<sub>2</sub>) e tióis (-SH) por grupos de trimetilsilício, tornando os compostos voláteis e termicamente estáveis<sup>3</sup>.

O método Fiehn foi desenvolvido para trabalhos de metabolômica e apresenta diversos metabólitos endógenos em sua biblioteca, assim, além da confirmação do composto pelo espectro de massas, pode-se confirmar a identificação por tempo de retenção, tornando a identificação do composto muito mais robusta<sup>1</sup>. Para compostos não encontrados na biblioteca FiehnLib, o espectro de massas foi comparado com a biblioteca NIST.

Aplicando esse processamento de dados na presente tese houve a identificação de 64 compostos e mais 3 compostos desconhecidos. A área dos compostos identificados e desconhecidos foi obtida utilizando um software de quantificação de área (MassHunter Quantitative), em que se escolheu um íon como quantificador (geralmente o mais intenso) e dois íons como qualificadores dos compostos, inclusive para os desconhecidos. A área dos íons quantificadores é a área utilizada nas análises estatísticas, enquanto que os íons qualificadores servem para confirmar a identificação da molécula.

Alguns compostos podem apresentar mais de um produto de derivatização, por apresentarem mais de um hidrogênio ácido. O aminoácido valina, por exemplo, apresenta três hidrogênios ácidos e nas análises de plasma por GC-MS foi possível observar dois produtos de derivatização, um com um grupo de trimetilsilício e outro com dois (Figura 9). Dessa forma, a área de diferentes produtos de derivatização referentes ao mesmo metabólito foram somadas para as análises estatísticas realizadas na sequência. O mesmo procedimento foi adotado para açúcares que possuem espectro de massas e tempo de retenção muito similares.



**Figura 9-** Identificação de produtos de derivatização da valina com um (A) ou dois (B) grupos de trimetilsilício pelo software NIST MS Search, em que pode-se observar o espectro de massas obtido experimentalmente, a comparação do espectro de massas experimental com o espectro de massas da biblioteca e o espectro de massas da biblioteca.

As tabelas geradas contendo as áreas dos *molecular features* devem passar por algumas etapas antes de serem submetidas às análises estatísticas. Primeiramente, remove-se os compostos que não são oriundos das amostras de plasma. Para isso, preparou-se pelo menos um branco de preparo (ou seja, todas as etapas de preparo de amostra foram realizadas com

água ultrapura no lugar da amostra biológica). Esse branco foi analisado no início e no final das análises para excluir compostos não biológicos das análises estatísticas.

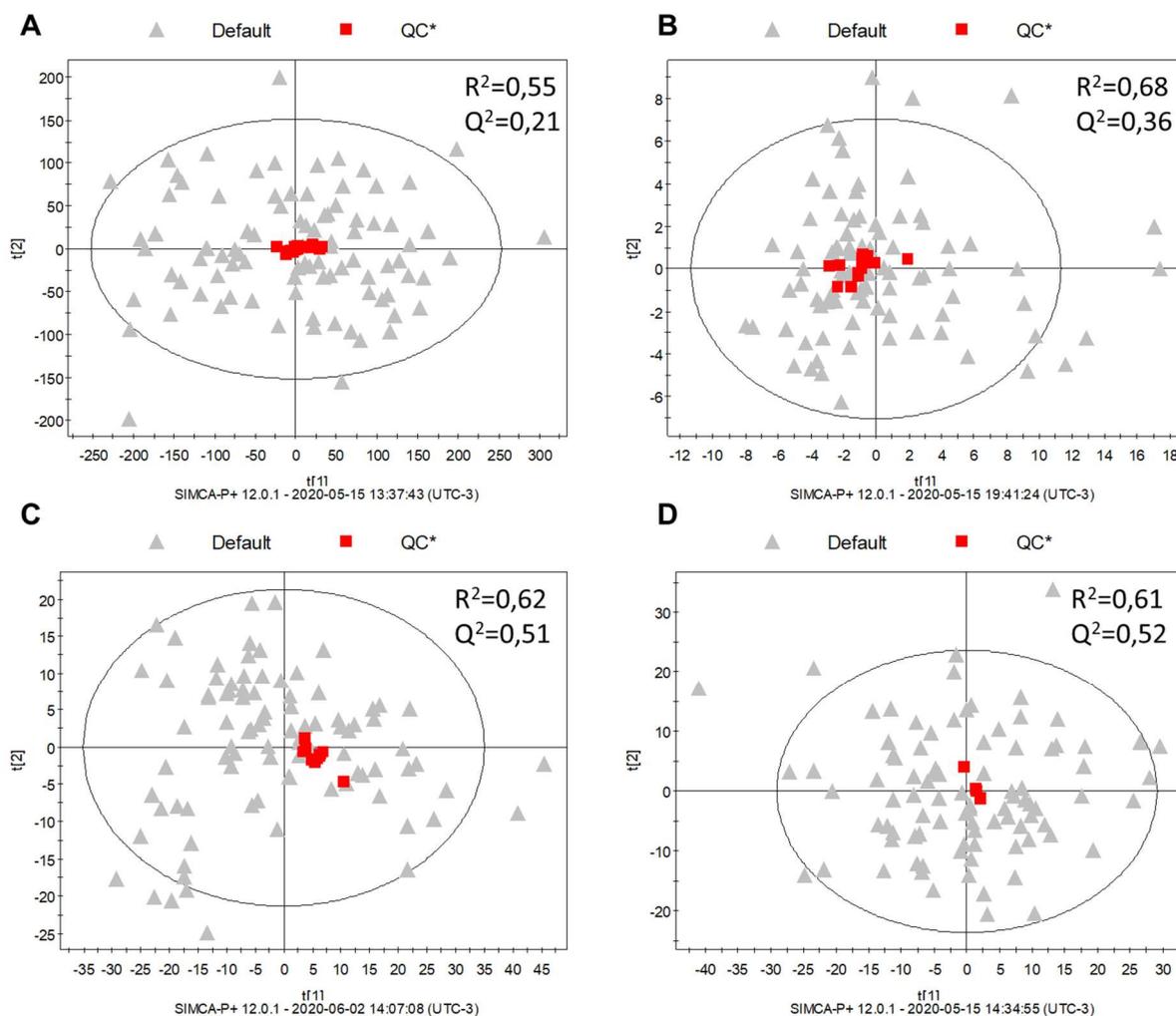
Após essa etapa, os dados passam por uma etapa de normalização. Os dados de GC-MS e RPLC-MS do modo positivo e negativo foram normalizados por LOESS<sup>4</sup>, um tipo de normalização que utiliza a ordem de injeção e as amostras de controle de qualidade (QC) para corrigir diferenças nos sinais analíticos devido a variações sistemáticas, como perda de sensibilidade após muitas injeções. Os dados de CE-MS foram normalizados pela área do padrão interno, para também corrigir erros sistemáticos e diferenças em volume de injeção, que para a técnica de eletroforese capilar é da ordem de nanolitros.

Após a normalização, uma etapa importante é a substituição dos valores faltantes (*missing values*), que podem impactar as análises estatísticas. Para as análises de GC-MS e CE-MS essa etapa foi realizada por um algoritmo de KNN. Esse algoritmo substitui o valor faltante pelo valor da amostra que é mais parecida com a amostra com o valor faltante, dentro de um mesmo grupo. Para *molecular features* com muitos valores faltantes (>70%), o algoritmo mantém o zero. Para *molecular features* com valores faltantes entre 40-70%, o algoritmo utiliza todas as amostras (inclusive os zeros) para substituir o valor, o que significa que o algoritmo pode manter o zero na tabela. Para valores faltantes menor que 40%, o algoritmo é aplicado utilizando apenas as amostras sem valores faltantes para a substituição do zero<sup>5</sup>. Essa abordagem foi estudada no trabalho de Barbas e colaboradores, que compararam diferentes métodos de substituição de *missing values*<sup>5</sup>. Para os dados de RPLC-MS, os *missing values* foram substituídos pela metade do valor mínimo encontrado para o respectivo *molecular feature*. Essa abordagem assume que o valor faltante ocorre devido a baixa concentração do composto na amostra (menor que o limite de detecção).

Após essa etapa, os *molecular features* que ainda apresentaram grande variação durante as análises das amostras de QC, que são constituídas pela mistura de todas as amostras, foram removidos, com base no valor do coeficiente de variação das amostras de QC (CV > 30%).

A estabilidade analítica foi verificada pela análise multivariada de componentes principais (PCA). Para os dados de CE-MS, utilizou-se o escalonamento por pareto, e para os demais dados empregou-se o auto-escalonamento. Os escalonamentos utilizados centralizam o valor de cada variável na média ( $X - \bar{X}$ ), e dividem essa diferença pelo desvio padrão da variável (autoescalamento) ou pela raiz quadrada do desvio padrão (pareto). O escalonamento é empregado para minimizar a diferença de intensidade entre as diferentes variáveis, que podem apresentar escalas de concentração diferente no plasma, ou maior detectabilidade na análise<sup>6</sup>.

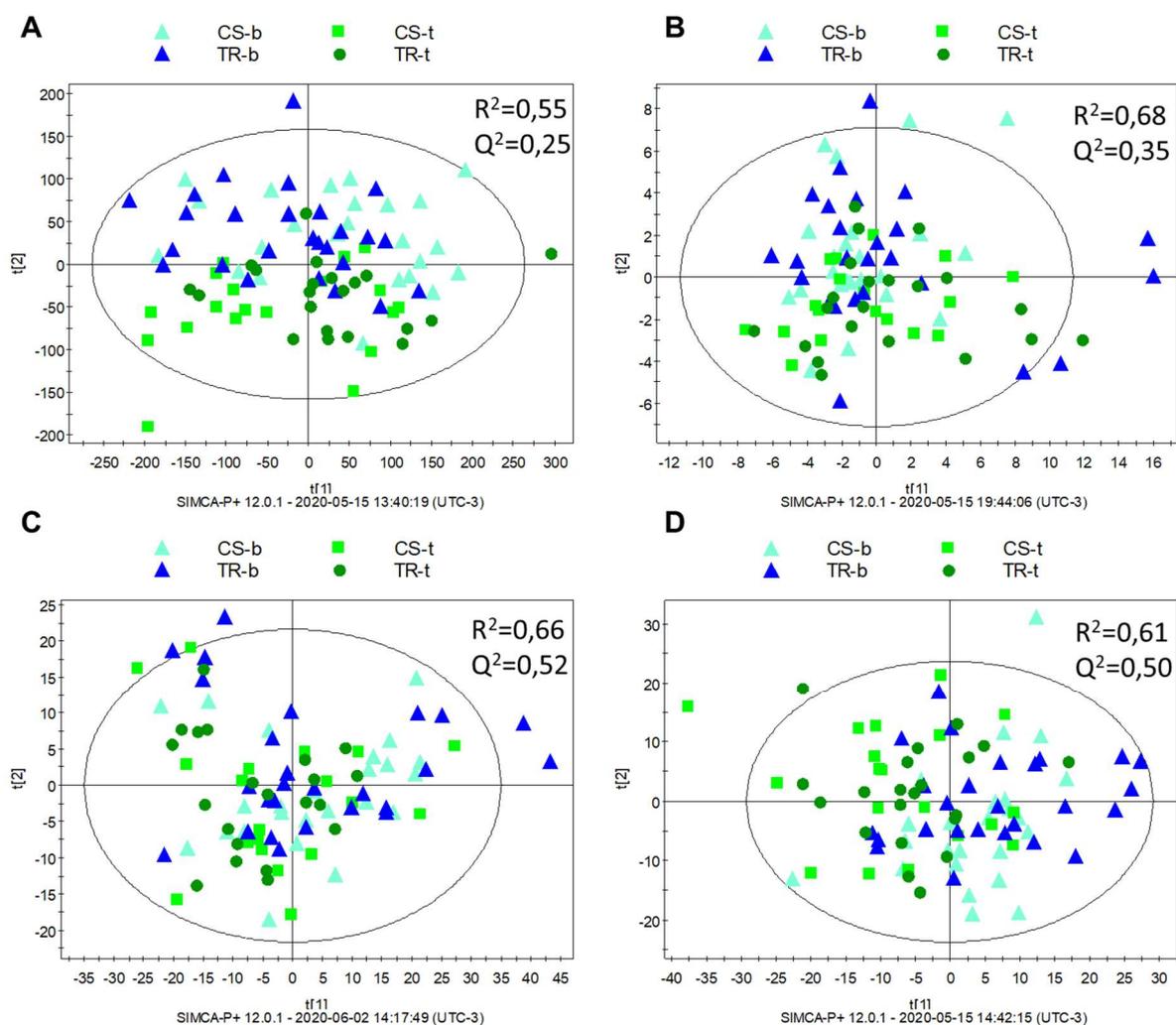
As amostras de QC estão agrupadas, demonstrando a qualidade dos dados adquiridos (Figura 10). Pode-se verificar que algumas amostras estão fora da elipse de  $T^2$  de Hotelling, porém não verificou-se nada de anormal nas amostras ou nos dados brutos adquiridos para excluí-las do processamento. Os dados obtidos são de humanos, em que há uma variabilidade de fatores que não podem ser controlados experimentalmente, como dieta e estilo de vida, o que pode causar uma maior dispersão dos dados.



**Figura 10-** Gráficos de escores dos modelos de PCA das análises de plasma por CE-MS (A), GC-MS (B), RPLC-MS modo positivo (C) e RPLC-MS modo negativo (D). As amostras em vermelho (■) representam os QC e as demais amostras dos estudos estão representadas em cinza (▲).

A dispersão e tendência dos dados também foi verificada pelo modelo de PCA, após a remoção das amostras de QC (Figura 11). Pelos gráficos de escores dos modelos de PCA, é possível verificar uma tendência de separação temporal dos grupos nos dados de CE-MS (separação das amostras em azul, representando o período basal e, em verde, representando o período após trinta dias de tratamento). Nos demais gráficos de escores dos modelos de PCA,

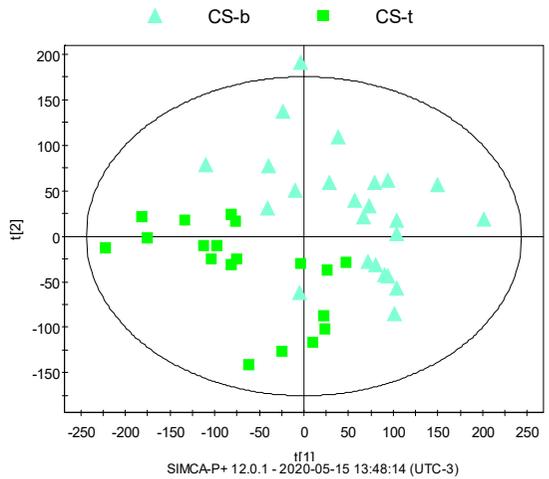
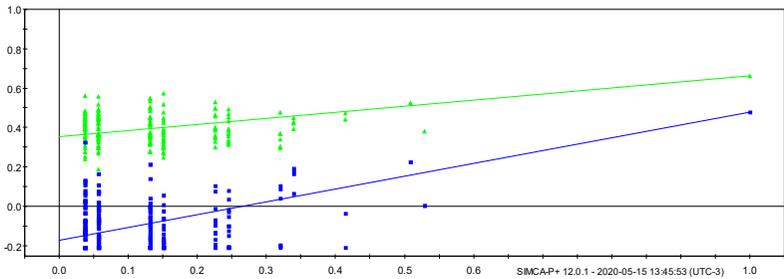
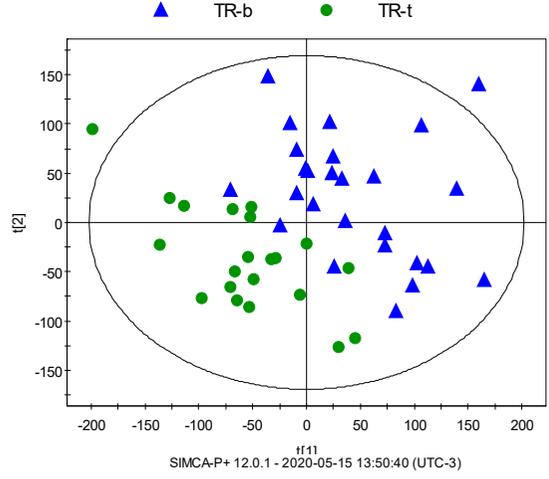
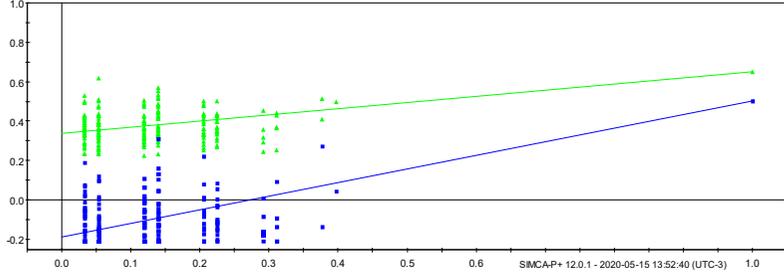
não é possível verificar nenhuma tendência de agrupamento óbvia (separação temporal ou dos tratamentos).



**Figura 11-** Gráficos de escores dos modelos de PCA construídos com as amostras dos paceutes e sem amostras de QC das análises de plasma por CE-MS (A), GC-MS (B), LC-MS modo positivo (C) e LC-MS modo negativo (D).

Após essa primeira avaliação dos dados por um modelo multivariado não supervisionado (PCA), ou seja, um modelo construído sem a informação dos grupos das amostras; verificou-se a separação temporal e dos tratamentos por modelos multivariados supervisionados de PLS-DA (Tabela 2).

**Tabela 2-** Análise estatística multivariada dos modelos de PLS-DA construídos com dados de análise de plasma por CE-MS e RPLC-MS (modo positivo e negativo)

Técnica	PLS-DA CS-t (▲) vs CS-b (■)	PLS-DA TR-t (▲) vs TR-b (●)
GC-MS	Não houve separação por PLS-DA ( $Q^2 < 0,4$ )	Não houve separação por PLS-DA ( $Q^2 < 0,4$ )
CE-MS	 <p>2 componentes  <math>R^2=0,77</math>; <math>Q^2= 0,45</math>  <math>p</math>-valor CV-ANOVA: <math>2,8 \times 10^{-4}</math>                      Teste de permutação (<math>R^2</math> ▲ <math>Q^2</math> ■)</p> 	 <p>2 componentes  <math>R^2=0,73</math>; <math>Q^2= 0,51</math>  <math>p</math>-valor CV-ANOVA: <math>4,2 \times 10^{-6}</math>                      Teste de permutação (<math>R^2</math> ▲ <math>Q^2</math> ■)</p> 

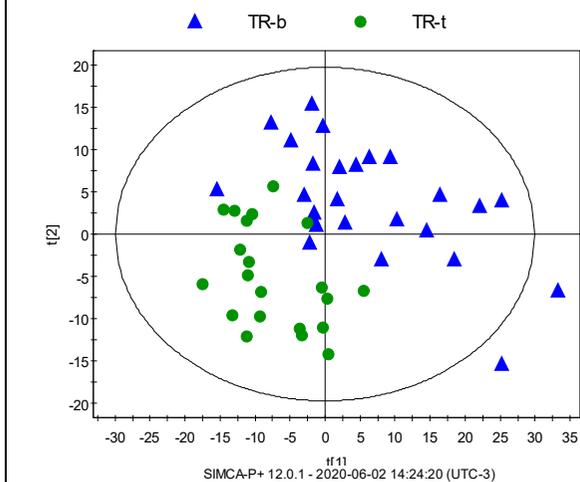
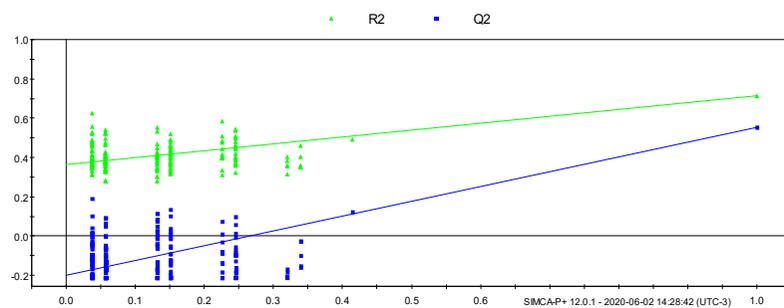
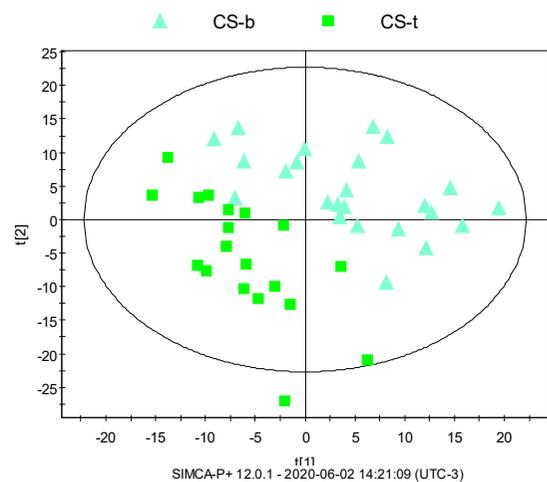
RPLC-MS (+)

2 componentes

$R^2=0,72$ ;  $Q^2= 0,56$

$p$ -valor CV-ANOVA:  $5,11 \times 10^{-6}$

Teste de permutação ( $R^2$  ▲  $Q^2$  ■)

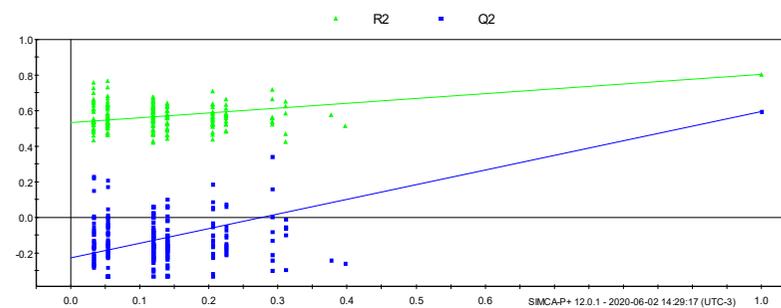


3 componentes

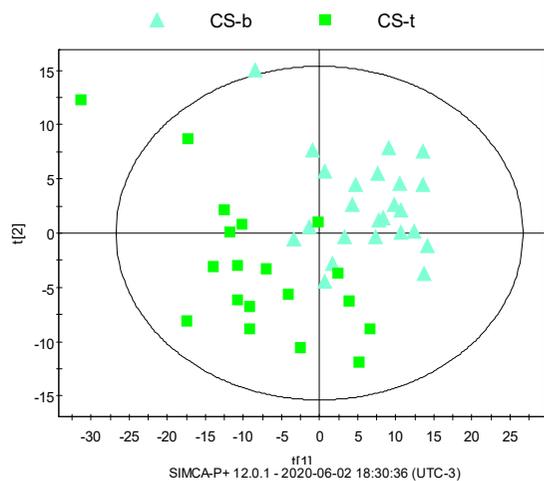
$R^2=0,81$ ;  $Q^2= 0,60$

$p$ -valor CV-ANOVA:  $8,24 \times 10^{-7}$

Teste de permutação ( $R^2$  ▲  $Q^2$  ■)



**RPLC-MS (-)**

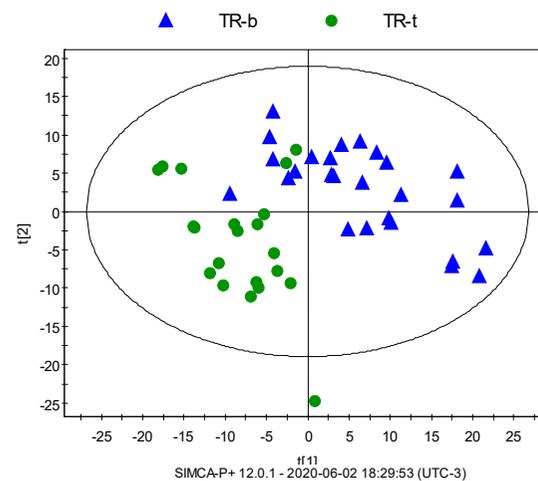
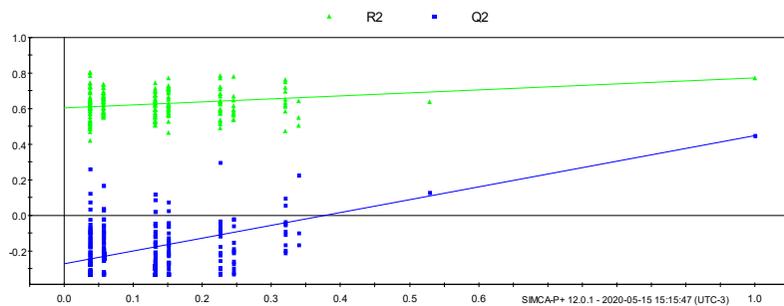


3 componentes

$R^2=0,77$ ;  $Q^2= 0,45$

$p$ -valor CV-ANOVA:  $2,78 \times 10^{-4}$

Teste de permutação ( $R^2$  ■  $Q^2$  ■)

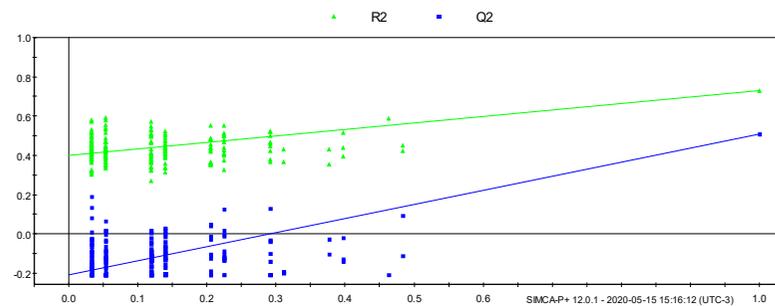


2 componentes

$R^2=0,73$ ;  $Q^2= 0,51$

$p$ -valor CV-ANOVA:  $4,2 \times 10^{-6}$

Teste de permutação ( $R^2$  ■  $Q^2$  ■)



A Tabela 2 mostra o gráfico de escores dos modelos de PLS-DA construídos, além de informações relevantes do modelo, como o número de componentes de cada modelo, o  $R^2$  e parâmetros de validação do modelo multivariado ( $Q^2$ ,  $p$ -valor de CV-ANOVA e teste de permutação).

O  $R^2$  representa o ajuste do modelo<sup>7</sup>. O valor de  $R^2$  varia de 0 a 1 e quanto mais próximo de um, maior é a variância explicada pelo modelo. O valor de  $Q^2$  é calculado pelo software por uma validação cruzada, em que uma fração de amostras é retirada do conjunto de dados. Então, um novo modelo é construído com as demais amostras e a classe das amostras não utilizadas na construção desse novo modelo é prevista. Esse procedimento se repete até que todas as amostras tenham sido previstas apenas uma vez. O valor de  $Q^2$  é calculado a partir da soma dos quadrados dos resíduos dessa predição (PRESS, do inglês *predicted residual error sum of squares*), que é convertido no valor de  $Q^2$  para facilitar sua interpretação e se assemelhar a escala do  $R^2$ . O valor de  $Q^2$  máximo é 1, e quanto mais próximo de 1, maior a previsibilidade do modelo. O  $Q^2$  pode assumir valores negativos, o que indica que o modelo não é válido e nem preditivo. Para modelos biológicos os valores usuais de  $Q^2$  e  $R^2$  são  $>0,4$  e  $>0,7$ , respectivamente<sup>7</sup>. No entanto, o manual do fabricante do software recomenda valores de  $Q^2$  acima de  $0,5$ <sup>8</sup> e não há um consenso na literatura sobre os limites mínimos desse parâmetro.

Eriksson *et al.* recomendam também a avaliação do modelo por um teste de CV-ANOVA (análise de variância de resíduos preditivos da validação cruzada, do inglês *analysis of variance of cross-validated predictive residuals*) em que um teste F de significância é aplicado para se verificar se o modelo PLS possui resíduos preditivos da validação cruzada significativamente menores do que a variação global em torno da média da resposta<sup>9</sup>. O teste resulta em um valor de F e um  $p$ -valor (indicado na Tabela 2). Apenas modelos com  $p$ -valor da CV-ANOVA menores que 0,05 foram considerados válidos.

Aplicou-se também um teste de permutação para avaliação dos modelos de PLS-DA. Nesse teste, a matriz de dados (X) é fixa, enquanto que a matriz de resposta (Y, classes/grupos) é aleatoriamente permutada  $n$  vezes (nesse caso 200 vezes). Para cada permutação, um novo modelo é construído com novos valores de  $R^2$  e  $Q^2$ , que são utilizados para construção de um gráfico em que os valores de  $R^2$  e  $Q^2$  são plotados em relação ao coeficiente de correlação entre a resposta real e a resposta da permutação. Dessa forma, podemos observar se o  $R^2$  e o  $Q^2$  dos modelos calculados a partir da permutação (modelos construídos ao acaso) fornecem valores maiores que o valor de  $R^2$  e  $Q^2$  do modelo real, invalidando o modelo, ou menores, validando o modelo<sup>9</sup>.

Assim, apenas os modelos com  $Q^2 < 0,4$ ,  $R^2 > 0,7$  e que foram validados por CV-ANOVA e permutação foram apresentados na Tabela 2.

As comparações temporais resultaram em modelos com previsibilidade baixa a moderada ( $Q^2$  entre 0,448 e 0,559), que podem ser observados em estudos com humanos em que há maior variabilidade. Os dados de GC-MS não resultaram em modelos multivariados satisfatórios de separação. A separação entre os tratamentos após 30 dias também não resultou em modelos adequados, com baixos valores de  $Q^2$  e que foram insatisfatórios na validação do modelo por CV-ANOVA e por permutações. Dessa forma os metabólitos significativos foram escolhidos apenas pela análise univariada (ANOVA de medidas repetidas).

Foi realizada uma análise univariada de ANOVA de medidas repetidas para os dados de CE-MS, GC-MS e RPLC-MS modo positivo e negativo para avaliar os metabólitos responsáveis pelas diferenças temporais e entre os tratamentos.

A ANOVA de medidas repetidas foi realizada para verificar a diferença nas médias dos grupos em amostras coletadas em tempos diferentes. O script utilizado no MATLAB realiza teste de contraste de esfericidade<sup>b</sup> de Mauchly e teste de correção de Greenhouse-Geisser, que é aplicado para casos em que não há esfericidade. O script também faz comparações dois a dois para verificar em quais comparações as diferenças foram significativas, com correção post hoc de Bonferroni para múltiplas comparações, minimizando erros do tipo I.

A ANOVA de medidas repetidas dos dados de GC-MS resultou em 15 metabólitos significativos (Tabela 3). O *heatmap* dos metabólitos significativamente alterados pela análise univariada foi construído a partir dos valores de porcentagem de alteração, em que a diferença da média do grupo controle e do grupo teste é dividida pela média do grupo controle. A classe de metabólitos mais alterada temporalmente são os ácidos orgânicos e graxos. Pode-se observar pelo *heatmap*, que a tendência de aumentar ou diminuir os níveis dos metabólitos temporalmente com os dois tratamentos (CS e TR) é similar, o que corrobora o fato dos modelos multivariados de separação entre os grupos CS e TR após trinta dias de tratamento não apresentarem separação.

---

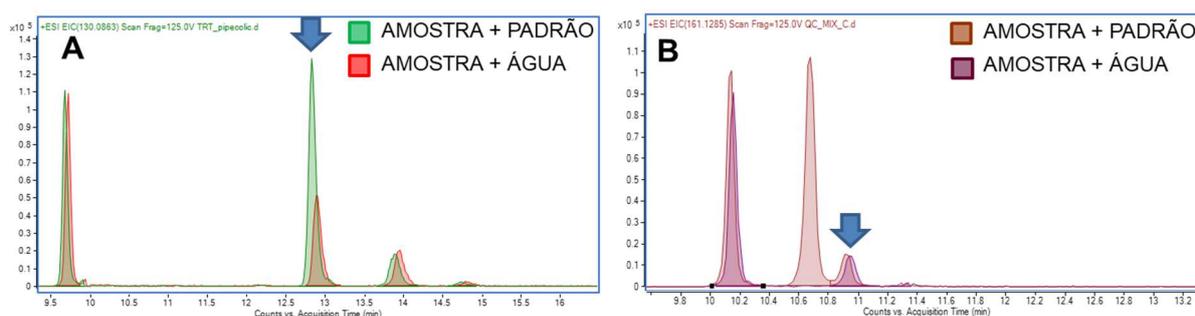
<sup>b</sup> Variâncias das populações de cada grupo são as mesmas

**Tabela 3-** Heatmap dos resultados da Análise Univariada (ANOVA medidas repetidas com um fator) das análises de plasma dos pacientes por GC-MS

Metabólito	Classe	% de alteração*		
		CS-t vs CS-b	TR-t vs TR-b	TR-t vs CS-t
Pirranose	Sacarídeo	-16%	-12%	14%
Glicerol	Poliol	-29%	-18%	28%
Catecol	Composto fenólico	<b>103%</b>	<b>161%</b>	11%
N-metilalanina	Aminoácido e derivados	-48%	-19%	<b>57%</b>
Ácido piperídico	Aminoácido e derivados	<b>220%</b>	102%	-31%
Ácido 2-hidroxi-3-metilbutírico	Ácido orgânico	-68%	-50%	<b>62%</b>
Ácido 3-hidroxi-3-metilbutírico	Ácido orgânico	-75%	-36%	122%
Ácido 2-hidroxi-3-metilbutírico	Ácido orgânico	-52%	-31%	-5%
Ácido 3-metil-2-oxobutanóico	Ácido orgânico	-20%	-13%	13%
Ácido fumárico	Ácido orgânico	<b>36%</b>	16%	10%
Ácido mirístico (C14:0)	Ácido graxo	-19%	-27%	6%
Ácido palmítico (C16:1)	Ácido graxo	-57%	-40%	27%
Ácido linoleico (C18:2)	Ácido graxo	-26%	-31%	19%
Ácido oleico (C18:1, cis 9)	Ácido graxo	-47%	-46%	25%
Ácido trans-9-octadecenoico (C18:1)	Ácido graxo	-25%	-34%	6%

\* as porcentagens de alteração em negrito representam as alterações em que a comparação dos grupos dois a dois resultou num *p*-valor menor que 0,05 após a correção post hoc de Bonferroni. C (Clopidogrel), S (Sinvastatina), T (Ticagrelor), R (Rosuvastatina), b (basal), t (trinta dias)/  Escala de cor (% de alteração): Máx Min.

Para CE-MS, 93 *molecular features* foram significativos pela ANOVA de medidas repetidas com um fator. Desses, 29 metabólitos foram identificados por um experimento de adição de padrão, em que compara-se qualitativamente a área de uma amostra em que se adiciona um volume pequeno de solução concentrada do padrão analítico, com uma amostra em que se adiciona o mesmo volume de água. Na Figura 12 A, a identificação do ácido piperídico (*m/z* 130,0863), por exemplo, foi confirmada pelo aumento expressivo na área do pico da amostra em que se adicionou o padrão analítico (indicado na figura pela seta). No entanto, a identificação do *molecular feature* de *m/z* 161,1285 indicado pela seta na Figura 12 B, como metil-lisina, foi descartada, pois, ao adicionar-se a solução de padrão analítico concentrada, o pico referente ao *molecular feature* de interesse não aumentou e observou-se o surgimento de um novo pico, esse sim referente ao padrão analítico de metil-lisina.



**Figura 12-** Cromatogramas de íons extraídos de amostra de plasma com adição de padrão ou água de  $m/z$  130,0863 (A) e 161,1285 (B) analisadas por CE-MS para confirmação das identificações.

Um *heatmap* das porcentagens de alteração foi elaborado com os 29 metabólitos confirmados por adição de padrão e estão na Tabela 4. A principal classe de compostos alterados temporalmente são aminoácidos e carnitina/acilcarnitinas. Pelo *heatmap*, pode-se observar que muitos metabólitos têm a mesma tendência de aumentar ou diminuir com o tempo de tratamento para os dois tratamentos avaliados, corroborando novamente com os modelos estatísticos da análise multivariada (PLS-DA). Além disso, poucos metabólitos são significativamente diferentes, comparando-se as amostras de um mês de tratamentos dos grupos CS e TR. O único metabólito em comum com os dados de GC-MS, o ácido pipercolico, possui a mesma tendência de aumento com o tempo de tratamento nos grupos CS e TR, corroborando os dados obtidos por GC-MS.

**Tabela 4-** *Heatmap* dos metabólitos significativos por ANOVA de medidas repetidas com um fator identificados das análises de CE-MS

Metabólito	Classe	% de alteração*		
		CS-t vs CS-b	TR-t vs TR-b	TR-t vs CS-t
Ornitina	Aminoácido e derivados	11%	40%	19%
Lisina	Aminoácido e derivados	-7%	11%	13%
Valina	Aminoácido e derivados	-13%	9%	13%
Asparagina	Aminoácido e derivados	-16%	1%	7%
Treonina	Aminoácido e derivados	-10%	23%	26%
Metionina	Aminoácido e derivados	-26%	-4%	20%
Prolina	Aminoácido e derivados	6%	23%	5%
Isoleucina/Leucina	Aminoácido e derivados	-18%	6%	13%
Triptofano	Aminoácido e derivados	-14%	9%	25%
Fenilalanina	Aminoácido e derivados	-22%	-7%	11%
Tirosina	Aminoácido e derivados	-18%	9%	23%
Ácido glutâmico	Aminoácido e derivados	-24%	-18%	5%
Dimetilarginina	Aminoácido e derivados	-12%	-5%	3%
Trans-4-hidroxiprolina	Aminoácido e derivados	62%	64%	10%

Cistina	Aminoácido e derivados	-21%	-2%	21%
Dimetilglicina	Aminoácido e derivados	7%	15%	3%
3-Metilhistidina	Aminoácido e derivados	35%	130%	18%
Creatina	Aminoácido e derivados	-35%	-25%	26%
Ácido 2-Aminobutírico	Aminoácido e derivados	-54%	-31%	37%
Quinurenina	Aminoácido e derivados	20%	44%	-1%
Ácido pipercolico	Aminoácido e derivados	186%	60%	-39%
Betaina	Amina quartenária	19%	28%	-9%
Hipoxantina	Derivado de purina	-37%	-43%	12%
Carnitina	Carnitina/acilcarnitina	-18%	-11%	6%
3-Dehidroxicarnitina	Carnitina/acilcarnitina	-14%	2%	11%
Acetilcarnitina	Carnitina/acilcarnitina	-26%	-6%	13%
Propionilcarnitina	Carnitina/acilcarnitina	-90%	-38%	235%
Isobutirilcarnitina	Carnitina/acilcarnitina	14%	40%	12%
Isovalerilcarnitina	Carnitina/acilcarnitina	-26%	-4%	17%

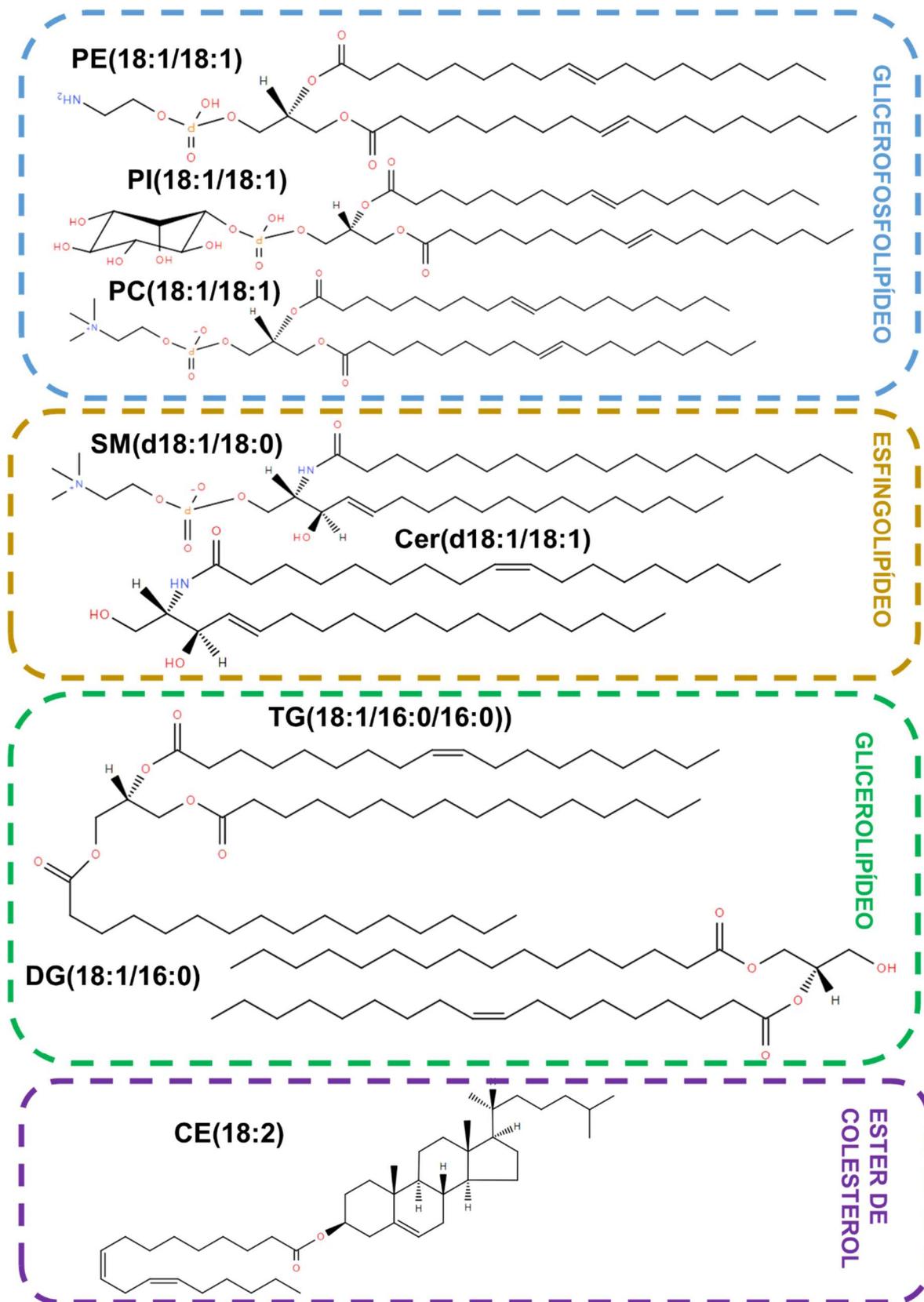
\* as porcentagens de alteração em negrito representam as alterações em que a comparação dos grupos dois a dois resultou num p-valor menor que 0,05 após a correção post hoc de Bonferroni. C (Clopidogrel), S (Sinvastatina), T (Ticagrelor), R (Rosuvastatina), b (basal), t (trinta dias).

Escala de cor (% de alteração): Máx  Min.

As análises univariadas (ANOVA de medidas repetidas) dos dados de RPLC-MS resultaram em 250 e 339 *molecular features* significativos, para os modos de ionização positivo e negativo, respectivamente.

Para a identificação dos *molecular features* significativos das análises de RPLC-MS, experimentos de MS/MS no modo de aquisição dependente de dados (DDA, do inglês *data dependent acquisition*) foram realizados para algumas amostras ao final das análises metabolômicas, com energia de colisão de 20 V e 40 V. Esse experimento consiste na fragmentação dos íons mais intensos em um ciclo de scans (MS e MS/MS). Por ser um experimento dependente dos dados, nem todos os *molecular features* significativamente alterados no estudo foram identificados por MS/MS.

A análise de fase reversa privilegiou compostos mais apolares, como os lipídios, pois a extração das amostras utilizou uma mistura de metanol e éter metil-terc-butílico (um solvente mais apolar). De fato, diversas classes de lipídios foram identificados alterados neste trabalho por RPLC-MS, como ésteres de colesterol (CE), ceramidas (Cer), esfingomielinas (SM), fosfatidilinositois (PI), fosfatidil-etanolaminas (PE), liso e fosfatidilcolinas (LPC/PC), diacilglicerois (DG) e triacilglicerois (TG). Na Figura 13, pode-se ver um exemplo da estrutura de cada classe de lipídios identificados nesse trabalho.



**Figura 13-** Exemplo de lipídios das classes identificadas e significativamente alteradas no presente trabalho nas análises de plasma por RPLC-MS.

Alguns desses compostos foram identificados no software MS-DIAL pela comparação do espectro de massas experimental com um banco de dados de fragmentação de lipídeos *in silico*<sup>10</sup>. Outros compostos foram identificados pelo padrão de fragmentação característico da classe do lipídio como descrito na literatura e mostrado na Tabela 5 para as classes identificadas neste trabalho.

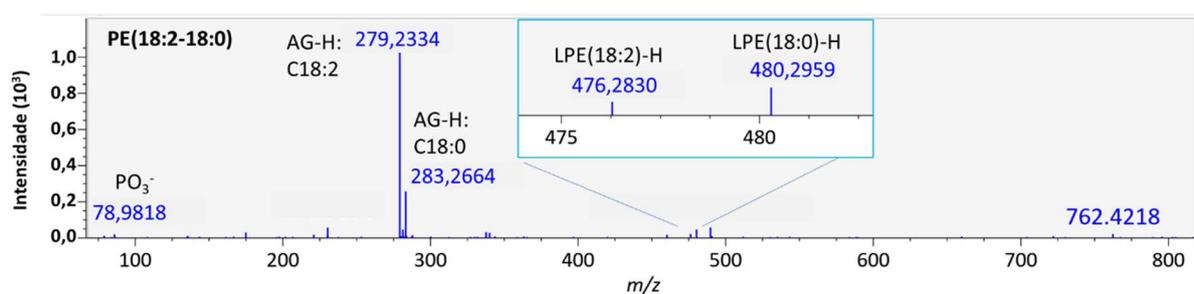
**Tabela 5-** Fragmentação característica dos lipídios identificados

Classe	Modo	Fragmentos: classe (m/z)	Fragmentos: cadeias de ácido graxo	Perdas neutras (Da)
PE <sup>11,12,13</sup>	ESI-	140,0118, 196,0380	AG-H, LPE-H, LPE-H-H <sub>2</sub> O	
PI <sup>12,13</sup>	ESI-	<b>241,0119</b> ; 297,0381; 259,0224;152,9958	AG-H, LPI-H, LPI-H-H <sub>2</sub> O	
PC/LPC <sup>11,12,13</sup>	ESI-	168,0431; 224,0693, 152,9958, 78.9591	AG-H, LPC-CH <sub>3</sub> , LPC-CH <sub>3</sub> -H <sub>2</sub> O	[M+Cl] <sup>-</sup> : <b>CH<sub>3</sub>Cl (49,9995)</b> , [M+HCOOH-H] <sup>-</sup> : <b>CH<sub>3</sub>COOH (60,0222)</b>
LPC <sup>11,12,13</sup>	ESI+	<b>184,0733; 104,1070</b> ; 60,0808; 86,0964; 258,1101		H <sub>2</sub> O(18,0106)
PC <sup>11,12,13</sup>	ESI+	[M+H] <sup>+</sup> : <b>184,0733</b> , 104,1070; 60,0808; 86.0964; 124,9998/ M+Na:146,9818	LPC+H, LPC+H-H <sub>2</sub> O, AG+H-H <sub>2</sub> O	
SM <sup>11,12,13</sup>	ESI-	168,0431, 78,9591		[M+Cl] <sup>-</sup> : <b>CH<sub>3</sub>Cl (49,9995)</b> , [M+HCOOH-H] <sup>-</sup> : <b>CH<sub>3</sub>COOH (60,0222)</b>
SM <sup>11,12,13</sup>	ESI+	[M+H] <sup>+</sup> : <b>184,0733</b> ; 104,1070; 60,0808, 86,0964; 124.9998/ [M+Na] <sup>+</sup> :146,9817	Base esfingoide+H-2H <sub>2</sub> O, Base esfingoide+H-H <sub>2</sub> O, Base esfingoide+H-H <sub>2</sub> O- CH <sub>2</sub> O	
Cer <sup>14,12,13</sup>	ESI-		Da base esfingoide: AG-H-H <sub>2</sub> O (R), AG-H-C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> OH (P)/ Da cadeia de amida: 3 frag característicos (S, T, U) e AG-H-H <sub>2</sub> O (V)*	[M+HCOOH-H] <sup>-</sup> : HCOOH(46,0055), HCOOH+ CH <sub>2</sub> O (76,0160), HCOOH+ CH <sub>2</sub> O+H <sub>2</sub> O (94,0266)
Cer <sup>15,12,13</sup>	ESI+		<b>Base esfingoide+H-2H<sub>2</sub>O</b> , Base esfingoide+H-H <sub>2</sub> O, Base esfingoide+H-H <sub>2</sub> O- CH <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O (18,0106), 2H <sub>2</sub> O (36,0211), H <sub>2</sub> O+CH <sub>2</sub> O (48,0211)
TG <sup>16</sup>	ESI+		AG+H-H <sub>2</sub> O	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> : NH <sub>3</sub> (17,0265), <b>AG+NH<sub>3</sub></b> / [M+Na] <sup>+</sup> : AG+Na

DG <sup>16</sup>	ESI+		AG+H-H <sub>2</sub> O	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> : NH <sub>3</sub> (17,0265), <b>AG+NH<sub>3</sub></b>
CE <sup>17,18</sup>	ESI+	<b>369,3516</b> (alto para <b>[M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>)</b>	<b>[M+Na]<sup>+</sup>: FA+Na</b>	

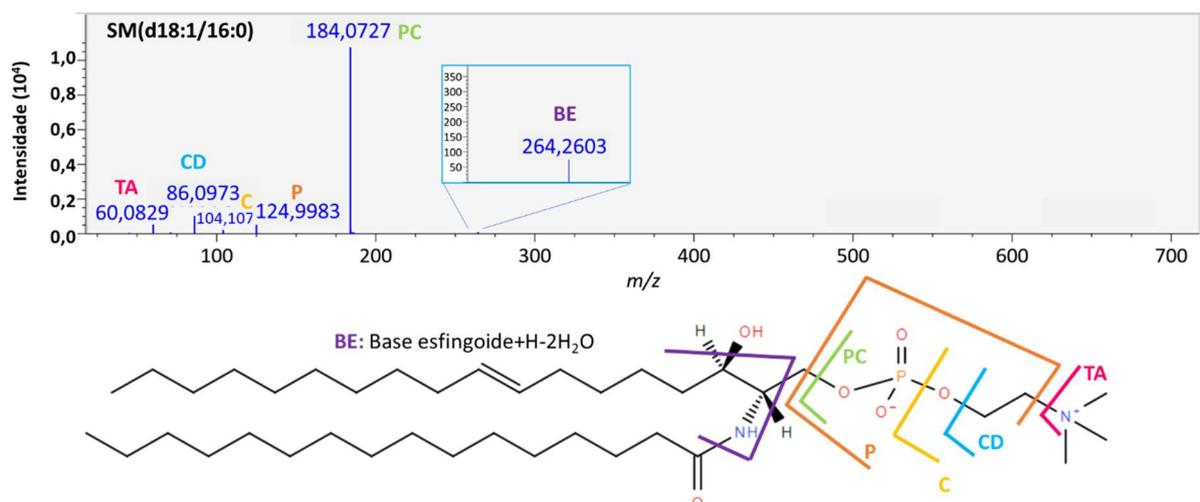
AG: ácido graxo, L:liso, MG: monoacilglicerol. Os fragmentos em negrito representam o fragmento mais intenso no espectro de massas. A tabela descreve os fragmentos possíveis, mas nem sempre todos são observados devido a intensidade do sinal nos espectros.\* Descritos a seguir

A fragmentação dos glicerofosfolipídios (PE/PI/PC) no modo negativo geralmente apresenta sinais altos a moderados das cadeias de ácidos graxos desprotonadas (Figura 14). Já no modo positivo, sinais referente aos ácidos graxos geralmente são baixos ou inexistentes e muitas vezes, apenas observa-se sinais relativos a cabeça polar do glicerofosfolipídio.



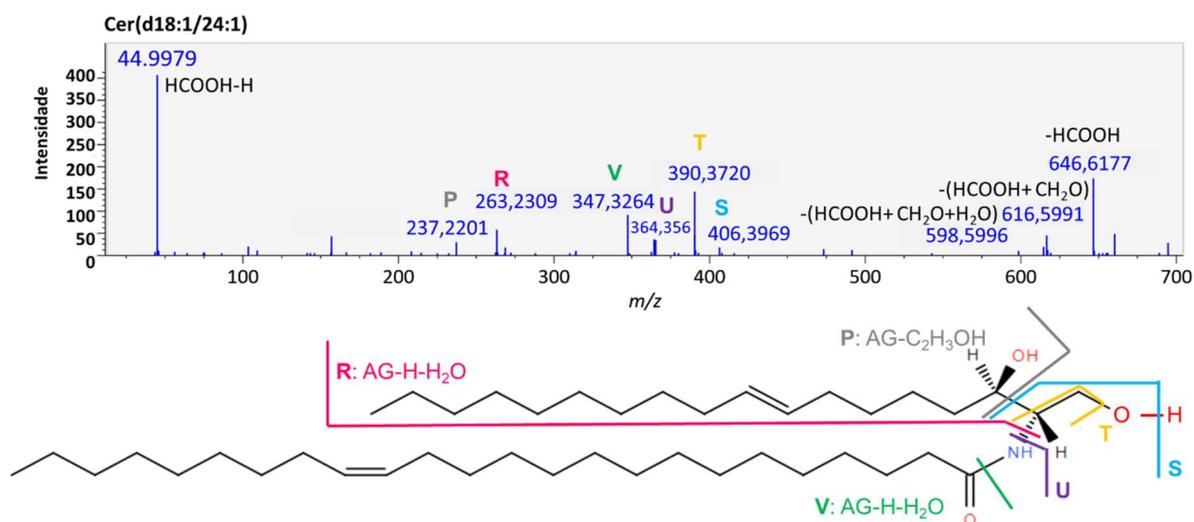
**Figura 14-** Espectro de fragmentação do PE(18:2-18:0) em amostra de plasma analisada por RPLC-MS/MS no modo negativo.

As esfingomielinas e fosfatidilcolinas geralmente perdem um grupo metila (CH<sub>3</sub>) durante a fragmentação no modo negativo e geralmente são ionizadas como [M+Cl]<sup>-</sup> e [M+HCOOH-H]<sup>-</sup>, devido à presença de colina (uma amina quaternária) neste tipo de lipídio. Também podem apresentar fragmentos similares da classe nesse modo de ionização, como o *m/z* 168,0431 (fosfocolina-CH<sub>3</sub>-H) e o 78,9591 (PO<sub>3</sub><sup>-</sup>). No modo positivo ionizam mais facilmente como [M+H]<sup>+</sup> devido à amina quaternária presente em sua estrutura e podem ionizar também como [M+Na]<sup>+</sup>. Assim como no modo negativo, as SM e PC apresentam fragmentos similares referentes à classe do lipídio como *m/z* 184,0733 (fosfocolina+H), 104,1070 (colina), 60,0808 (trimetilamina+H), entre outros (Figura 15).



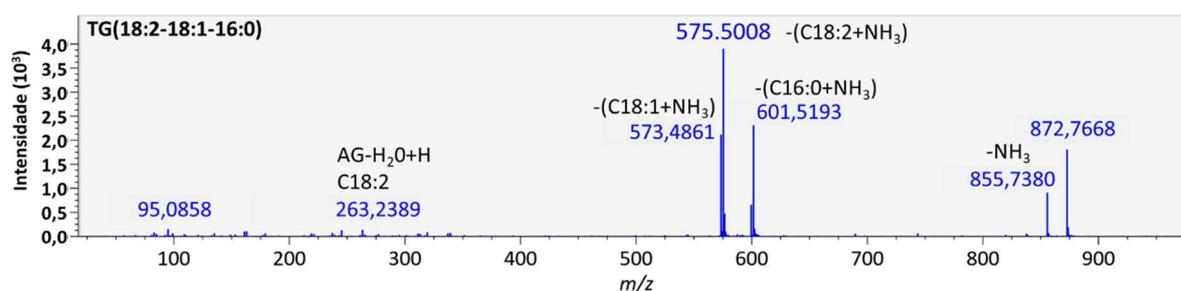
**Figura 15-** Espectro de fragmentação em amostra de plasma analisada por RPLC-MS/MS no modo positivo e estrutura da SM(d18:1/16:0). Com fragmentos da cabeça polar referentes a TA: Trimetilamina, CD: Colina desidratada, P: Fragmento fosfatado e PC: fosfocolina e fragmento da base esfingóide com perda neutra de duas água (BE).

As ceramidas podem ser ionizadas no modo positivo, geralmente como  $[M+H]^+$ . Nesse modo de ionização, os fragmentos característicos são provenientes da base esfingóide. No modo negativo é predominantemente ionizada como  $[M+HCOOH-H]^-$ , e sofre uma extensa fragmentação, com fragmentos característicos da base esfingóide e do ácido graxo da cadeia de amida, como exemplificado na Figura 16.



**Figura 16-** Espectro de fragmentação e estrutura da Cer(d18:1/24:1) com fragmentos referentes à base esfingóide (R e P) e à cadeia de amida (S, T, U e V) em amostra de plasma analisada por RPLC-MS/MS no modo negativo de ionização.

Os diacilgliceróis, triacilgliceróis e ésteres de colesterol geralmente são observados apenas no modo de ionização positivo e a adição de amônio à fase móvel facilita sua ionização como  $[M+NH_4]^+$ . Ainda sim também podem ser ionizados como  $[M+Na]^+$ . Os diacilgliceróis e triacilgliceróis quando ionizados com amônia apresentam como sinais mais intensos do espectro de massas de fragmentação, perdas neutras da cadeia de ácido graxo +  $NH_3$  (Figura 17). Os ésteres de colesterol quando estão ionizados com amônia, geralmente apresentam praticamente apenas um fragmento de colesterol com perda de água ( $m/z$  369,3516). Já quando estão ionizados com sódio, esse fragmento é baixo e pode-se observar o ácido graxo sodiado como fragmento mais intenso.



**Figura 17-** Espectro de fragmentação do TG(18:2-18:1-16:0) em amostra de plasma analisada por RPLC-MS/MS no modo positivo.

A aquisição dos espectros de MS/MS por DDA não fragmentou todos os *molecular features* significativos, e alguns espectros obtidos foram de má qualidade, impossibilitando a identificação desses compostos. Ainda sim, o experimento possibilitou a identificação de 117 *molecular features* (Tabela 6), sendo a maioria lipídios. Além dos lipídios foi possível identificar dois compostos polares que eluíram no início da cromatografia, a betaína e a carnitina, que também foram significativas pela análise de CE-MS.

**Tabela 6-** Heatmap dos metabólitos significativos por ANOVA de medidas repetidas com um fator identificados das análises de plasma por RPLC-MS e caracterizados por MS/MS

$m/z$ / $t_R$ (min)	Aduto	Erro ppm	Metabólito	Modo de ionização/ Energia de colisão: Fragmentos	Classe	% de alteração*		
						CS-t x CS-b	TR-t x TR-b	TR-t x CS-t
764,5261/ 18,9	$[M-H]^-$	3	PE(38:5)/ PE(18:1-20:4)	(-)/20V: 478,2874; 303,2309;281,2467; 140,0021	PE	-5%	33%	28%
722,5112/ 19,8	$[M-H]^-$	3	PE(O-36:5)/ PE(O-16:1-20:4)	(-)/40V:436,2761; 303,2313; 259,2441; 196,0491; 140,0208	PE	41%	59%	22%

742,5375/ 21,1	[M-H] <sup>-</sup>	1	PE(36:2)/ PE(18:0-18:2)	(-)/40V:480,2959; 476,2830; 279,2334; 283,2664;78,9818	PE	-28%	-26%	6%
750,5426/ 22,2	[M-H] <sup>-</sup>	2	PE(O-38:5)/ PE(O-18:1-20:4)	(-)/40V:464,3089; 446,2917;303,2305; 259,2363; 196,0324; 140,0153	PE	25%	50%	37%
835,5338/ 25,3	[M-H] <sup>-</sup>	0	PI(34:1)/ PI(16:0-18:1)	(-)/40V:597,3301; 579,2834; 571,2729; 553,2692; 297,0438; 281,2474; 255,2259; 241,0068; 152,9958	PI	-20%	-35%	-23%
861,5482/ 26,3	[M-H] <sup>-</sup>	2	PI(36:2)/ PI(18:0-18:2)	(-)/40V:599,3275; 581,3037; 577,2757; 297,0483; 283,2645; 279,2322; 259,0091; 241,0093; 152,9947	PI	-24%	-40%	-15%
556,3129/ 1,3	[M+Cl] <sup>-</sup>	9	LPC(18:1)	(-)/40V:281,2469; 224,0718; 78,9597	LPC	27%	19%	1%
558,3295/ 1,4	[M+Cl] <sup>-</sup>	7	LPC(18:0)	(-)/40V:283,2661; 224,0685; 168,0415; 78,9601	LPC	49%	15%	-11%
524,3716/ 1,5	[M+H] <sup>+</sup>	1	LPC(18:0)	(+)/20V:506,3598; 258,1046; 184,0726; 124,9975; 104,1078; 86,0973; 60,0828	LPC	30%	-8%	-14%
778,5602/ 19,7	[M+HCOOH-H] <sup>-</sup>	0	PC(32:0)/ PC(16:0/16:0)	(-)/40V:718,5425; 480,3062; 462,3124; 255,2324; 224,0630; 168,0429; 44,9951	PC	-13%	-13%	-5%
734,5702/ 19,4	[M+H] <sup>+</sup>	1	PC(32:0)/ PC(16:0/16:0)	(+)/20V:496,3379; 184,0726; 124,9950	PC	-16%	-36%	-15%
730,5386/ 15,3	[M+H] <sup>+</sup>	1	PC(32:2)/ PC(18:2-14:0)	(+)/40V:468,3084; 184,0730; 125,0015; 104,1050; 86,0972; 60,0788	PC	-6%	-42%	-13%
774,529/ 15,7	[M+HCOOH-H] <sup>-</sup>	0	PC(32:2)/ PC(14:0-18:2)	(-)/40V:714,49,27; 504,2962; 452,2647; 279,2314; 227,2023; 168,0807	PC	-3%	-36%	-11%
756,5524/ 16,3	[M+H] <sup>+</sup>	2	PC(34:3)/ PC(16:1-18:2)	(+)/40V:502,3335; 184,0722; 125,0000; 86,0975; 60,0808	PC	-27%	-44%	-9%

800,5434/ 16,6	[M+HCOOH-H] <sup>-</sup>	2	PC(34:3)/ PC(16:1-18:2)	(-)/40V:740,5166; 504,3195; 478,2924; 460,2896; 279,2356; 253,2143; 168,0486; 45,0015	PC	-22%	-32%	-5%
744,5544/ 16,5	[M+H] <sup>+</sup>	1	PC(33:2)	(+)/40V:184,0728; 104,1033; 86,0974; 60,0942	PC	-20%	-45%	-6%
788,5429/ 16,9	[M+HCOOH-H] <sup>-</sup>	2	PC(33:2)/ PC(15:0-18:2)	(-)/40V:728,5163; 486,2758; 466,2985; 448,2830; 279,2333; 241,2149; 168,0459; 44,9980	PC	-15%	-37%	-7%
732,5534/ 17,1	[M+H] <sup>+</sup>	1	PC(32:1)	(+)/40V:184,0736; 104,1055; 86,0959; 60,0805	PC	-30%	-41%	-15%
940,5248/ 17,6	[M+2(HCOONa) +Na] <sup>+</sup>	2	PC(36:4)	(+)/40V:804,5568; 745,4836; 621,4866; 146,9783; 86,0954	PC	9%	29%	14%
962,5333/ 18	[M+2(HCOONa) +HCOOH-H] <sup>-</sup>	2	PC(36:4)/ PC(16:0-20:4)	(-)/40V:766,5568; 480,3142; 303,2260; 180,9687; 112,9855; 44,9963	PC	7%	21%	10%
816,5347/ 18	[M+Cl] <sup>-</sup>	4	PC(36:4)/ PC(16:0-20:4)	(-)/40V:766,5457; 480,2695; 303,2349; 255,2316; 224,0675; 168,0467	PC	0%	26%	20%
894,5459/ 18	[M+HCOONa+ HCOOH-H] <sup>-</sup>	2	PC(36:4)/ PC(16:0-20:4)	(-)/40V:766,5405; 303,2357; 255,2384; 112,9848; 44,9980	PC	3%	21%	13%
826,5608/ 18	[M+HCOOH-H] <sup>-</sup>	1	PC(36:4)/ PC(16:0-20:4)	(-)/40V:766,5457; 480,3169; 462,3037; 303,2332; 255,2343; 224,0636; 168,0400; 44,9992	PC	3%	22%	15%
758,5705/ 18	[M+H] <sup>+</sup>	1	PC(34:2)/ PC(16:0-18:2)	(+)/20V:520,3314; 502,3352; 496,3346; 184,0732; 125,0001; 104,1071; 86,0979; 60,0803	PC	-34%	-48%	-4%
916,5246/ 18,2	[M+2(HCOONa) +Na] <sup>+</sup>	2	PC(34:2)	(+)/40V:780,5518; 721,4772; 597,4820; 146,9812; 86,0993	PC	-13%	-23%	-7%
802,5609/ 18,4	[M+HCOOH-H] <sup>-</sup>	1	PC(34:2)/ PC(16:0-18:2)	(-)/40V:742,5367; 504,3132; 480,3154; 462,3045; 279,2322; 255,2320; 168,0425; 44,9983	PC	-20%	-31%	-9%

792,5325/ 18,4	[M+Cl] <sup>-</sup>	1	PC(34:2)/ PC(16:0-18:2)	(-)/40V:742,5339; 480,3029; 279,2315; 255,2296; 224,0676; 168,0490	PC	-17%	-26%	-6%
742,5382/ 18,4	[M-CH <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	1	PC(34:2)/ PC(16:0-18:2)	(-)/20V:480,328; 279,2283; 255,2275	PC	-13%	-16%	-4%
870,5487/ 18,4	[M+HCOOH+H COONa-H] <sup>-</sup>	1	PC(34:2)/ PC(16:0-18:2)	(-)/40V:742,5681; 279,2368; 224,0691; 112,9861; 44,9982	PC	-19%	-29%	-7%
938,5355/ 18,4	[M+2(HCOONa) +HCOOH-H] <sup>-</sup>	1	PC(34:2)/ PC(16:0-18:2)	(-)/40V:742,5432; 279,2259; 255,2372; 112,9858; 45,0015	PC	-14%	-25%	-8%
808,5845/ 18,4	[M+H] <sup>+</sup>	1	PC(38:5)	(+)/40 V:184,0723; 124,9999; 104,1053; 86,0949; 60,0816	PC	-7%	-20%	-5%
852,5744/ 18,9	[M+HCOOH-H] <sup>-</sup>	2	PC(38:5)/ PC(18:1-20:4)	(-)/40V:792,5442; 528,2885; 506,3188; 488,3131; 303,2316; 281,2464; 224,0682; 168,0381; 44,9979	PC	6%	15%	4%
784,5845/ 19	[M+H] <sup>+</sup>	1	PC(36:3)	(+)/ 40V:184,0731; 125,0011; 104,1067; 86,0962; 60,0833	PC	-19%	-33%	-3%
896,5611/ 19,3	[M+HCOONa+ HCOOH-H] <sup>-</sup>	3	PC(36:3)/ PC(16:0-20:3)	(-)/40V:768,5479; 305,2429; 112,9866; 44,9983	PC	-7%	-13%	-2%
828,5752/ 19,4	[M+HCOOH- H] <sup>-</sup>	1	PC(36:3)/ PC(16:0-20:3)	(-)/40V:768,5590; 480,2922; 462,3186; 305,2476; 255,2334; 224,0714; 168,0420; 44,9967	PC	-12%	-21%	-3%
772,5844/ 19,6	[M+H] <sup>+</sup>	1	PC(35:2)	(+)/40V:184,0730; 124,9971; 86,0956; 60,0770	PC	-16%	-34%	1%
816,5718/ 19,9	[M+HCOOH-H] <sup>-</sup>	5	PC(35:2)/ PC(17:0-18:2)	(-)/40V:756,5449; 494,3226; 279,2320; 269,2530; 168,0381; 44,9980	PC	-2%	-21%	-1%
760,5858/ 19,9	[M+H] <sup>+</sup>	1	PC(34:1)/ PC(18:1-16:0)	(+)/20V:522,3509; 496,3441; 478,3256; 184,0732; 124,9969; 104,1022; 86,0965; 60,0795	PC	-28%	-32%	3%
918,5409/ 20	[M+2(HCOONa) +Na] <sup>+</sup>	2	PC(34:1)	(+)/40V:782,5551; 723,4922; 599,4980; 146,9807; 86,0979	PC	-26%	-26%	10%

804,5762/ 20,3	[M+HCOOH-H] <sup>-</sup>	0	PC(34:1)/ PC(16:0-18:1)	(-)/40V:744,5524; 506,3398; 488,3076; 480,2999; 462,3132; 281,2487; 255,2330; 224,0674; 168,0402; 44,9975	PC	-20%	-14%	7%
794,5482/ 20,3	[M+Cl] <sup>-</sup>	1	PC(34:1)/ PC(16:0-18:1)	(-)/40V:744,5529; 480,3059; 462,3037; 281,2492; 255,2320; 224,0739	PC	-13%	-5%	9%
940,5489/ 20,3	[M+HCOOH+ 2(HCOONa)-H] <sup>-</sup>	2	PC(34:1)/ PC(16:0-18:1)	(-)/20V:804,5486; 744,5451; 281,2399; 180,9721; 112,9866; 45,0009	PC	-15%	-12%	5%
872,5623/ 20,3	[M+HCOOH+H COONa-H] <sup>-</sup>	1	PC(34:1)/ PC(16:0-18:1)	(-)/40V:744,5472; 281,2365; 112,9846; 44,9980	PC	-17%	-14%	6%
922,5773/ 20,9	[M+HCOONa+ HCOOH-H] <sup>-</sup>	2	PC(38:4)/ PC(18:0-20:4)	(-)/40V:794,5999; 303,2274; 112,9850; 44,9998	PC	8%	29%	20%
854,5935/ 20,9	[M+HCOOH-H] <sup>-</sup>	2	PC(38:4)/ PC(18:0-20:4)	(-)/40V:794,5786; 528,3021; 508,3431; 490,3210; 303,2303; 283,2624; 224,0756; 168,0452; 44,9971	PC	17%	39%	27%
786,6022/ 20,8	[M+H] <sup>+</sup>	2	PC(36:2)/ PC(18:0-18:2)	(+)/20V:524,3708; 520,3456; 184,0729; 124,9994; 104,1097; 86,0969	PC	-14%	-36%	-5%
944,5564/ 20,9	[M+2(HCOONa) +Na] <sup>+</sup>	2	PC(36:2)	(+)/40V:808,5739; 749,5031; 625,5143; 146,9810; 86,0947	PC	-18%	-31%	-3%
898,5794/ 21,2	[M+HCOONa+ HCOOH-H] <sup>-</sup>	0	PC(36:2)/ PC(18:0-18:2)	(-)/40V:770,5269; 283,2568; 279,2389; 168,0406; 112,9864; 44,9992	PC	-9%	-24%	-4%
830,5915/ 21,2	[M+HCOOH-H] <sup>-</sup>	0	PC(36:2)/ PC(18:0-18:2)	(-)/40V:770,5718; 508,3323; 504,3098; 486,2884; 283,2626; 279,2334; 224,0678; 168,0513; 45,0006	PC	-10%	-26%	-6%
836,614/ 21,1	[M+H] <sup>+</sup>	3	PC(40:5)/ PC(18:0-22:5)	(+)/40V:552,3549; 524,3660; 184,0725; 125,0007; 104,0997; 86,0974; 60,0829	PC	4%	-22%	-10%
719,5331/ 13,4	[M+HCOOH-H] <sup>-</sup>	2	SM(d32:1)	(-)/40V:659,5114; 168,0415; 78,9632 44,9996	SM	-20%	-27%	-8%

675,5425/ 13,5	[M+H] <sup>+</sup>	2	SM(d32:1)	(+)/40V:184,0732; 86,0979; 60,0813; 125,0024	SM	-21%	-40%	-18%
745,5482/ 13,5	[M+HCOOH-H] <sup>-</sup>	3	SM(d34:2)	(-)/40V:685,5206; 168,0431; 78,9620	SM	-31%	-14%	19%
701,5586/ 13,9	[M+H] <sup>+</sup>	1	SM(d34:2)	(+)/40V:184,0719; 86,0971; 60,0800; 124,9966	SM	-32%	-46%	0%
745,5495/ 14,8	[M+HCOOH-H] <sup>-</sup>	1	SM(d34:2)	(-)/40V:685,5269; 168,0401; 78,9641	SM	-8%	5%	15%
813,5359/ 14,8	[M+HCOONa+ HCOOH-H] <sup>-</sup>	2	SM(d34:2)	(-)/40V:685,5241; 112,9861; 44,9967	SM	-8%	4%	18%
689,5572/ 14,7	[M+H] <sup>+</sup>	3	SM(d33:1)	(+)/40V:184,0730; 124,9976; 86,0952; 60,0810	SM	-15%	-39%	-16%
733,5491/ 15	[M+HCOOH-H] <sup>-</sup>	1	SM(d33:1)	(-)/40V:673,5225; 168,0420; 78,9542; 45,0019	SM	-10%	-15%	-6%
801,5371/ 15	[M+HCOONa+ HCOOH-H] <sup>-</sup>	0	SM(d33:1)	(-)/20V:741,4932; 733,5436; 673,5322; 112,9854; 44,9884	SM	-4%	-10%	-9%
737,5354/ 16,2	[M+Cl] <sup>-</sup>	2	SM(d34:1)	(-)/40V:687,5408; 168,0429; 78,9604	SM	-16%	-18%	0%
687,5432/ 16,2	[M-CH <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	1	SM(d34:1)	(-)/40V:687,5444; 168,0421; 78,9589	SM	-14%	-19%	-3%
815,5524/ 16,3	[M+HCOONa+ HCOOH-H] <sup>-</sup>	1	SM(d:34:1)	(-)/20V:755,5171; 747,5604; 687,5440; 112,9847; 45,0019	SM	-12%	-17%	-3%
883,5385/ 16,3	[M+ 2(HCOONa)+ HCOOH-H] <sup>-</sup>	2	SM(d34:1)	(-)/20V:815,5622; 747,5751; 687,5589; 180,9716; 112,9859; 44,9985	SM	-9%	-13%	-2%
747,5662/ 16,3	[M+HCOOH-H] <sup>-</sup>	1	SM(d34:1)/ SM(d18:1/16:0)	(-)/40V:687,5416; 449,3181; 255,2360; 168,0411; 78,9591; 44,9984	SM	-15%	-21%	-4%
951,5252/ 16,3	[M+3(HCOONa) +HCOOH-H] <sup>-</sup>	3	SM(d34:1)/ SM(d18:1/16:0)	(-)/40V:747,5667; 687,5490; 112,9858; 180,9791; 248,9587; 44,9988	SM	-8%	-12%	-1%
861,5311/ 16	[M+2(HCOONa) +Na] <sup>+</sup>	7	SM(d34:1)/ SM(d18:1/16:0)	(+)/40 V:725,5566; 666,4828; 542,4869; 146,9820; 86,0960	SM	-26%	-41%	-13%
703,5743/ 16	[M+H] <sup>+</sup>	1	SM(d34:1)/ SM(d18:1/16:0)	(+)/40V:264,2603; 184,0727; 124,9983; 104,1072; 86,0973; 60,0829	SM	-17%	-36%	-9%

773,58/ 17,2	[M+HCOOH-H] <sup>-</sup>	2	SM(d36:2)	(-)/40V:713,5591; 168,0406; 78,9636	SM	-24%	-8%	29%
729,5882/ 16,9	[M+H] <sup>+</sup>	3	SM(d36:2)/ SM(d18:2/18:0)	(+)/40V:262,2498; 184,0730; 124,9968; 104,1025; 86,0965; 60,0795	SM	-24%	-25%	21%
761,5804/ 17,8	[M+HCOOH-H] <sup>-</sup>	1	SM(d35:1)	(-)/40V:701,5648; 168,0404; 78,9586	SM	-5%	-15%	-7%
731,6045/ 19,2	[M+H] <sup>+</sup>	2	SM(d36:1)	(+)/40V:184,0730; 125,0015; 86,0972; 60,0788	SM	-23%	-33%	3%
775,5956/ 19,5	[M+HCOOH-H] <sup>-</sup>	2	SM(d36:1)/ SM(d18:1/18:0)	(-)/40V:715,5767; 449,3316; 168,0425; 78,9574; 44,9957	SM	-18%	-13%	11%
801,6102/ 20,1	[M+HCOOH-H] <sup>-</sup>	3	SM(d38:2)	(-)/40V:741,5902; 168,0431; 78,9567	SM	-7%	0%	21%
855,6545/ 22,9	[M+HCOOH-H] <sup>-</sup>	6	SM(d42:3)	(-)/40V:795,6394; 168,0377; 78,9581; 44,9994	SM	-13%	-5%	26%
923,6423/ 22,9	[M+HCOOH+H COONa-H] <sup>-</sup>	5	SM(d42:3)	(-)/20V:863,6362; 855,6594; 795,6402; 180,9731; 112,9849; 44,9974	SM	-12%	-5%	22%
817,6378/ 23,5	[M+HCOOH-H] <sup>-</sup>	8	SM(d39:1)	(-)/40V:757,6260; 168,0484; 78,9608; 44,9970	SM	-17%	-24%	11%
787,6663/ 24	[M+H] <sup>+</sup>	3	SM(d40:1)	(+)/40V:184,0729; 125,0011; 104,1035; 86,0954; 60,0803	SM	-23%	-39%	-1%
831,6569/ 24,2	[M+HCOOH-H] <sup>-</sup>	4	SM(d40:1)	(-)/40V:771,6378; 168,0427; 78,9550	SM	-26%	-33%	2%
899,6451/ 24,2	[M+HCOONa+ HCOOH-H] <sup>-</sup>	2	SM(d40:1)	(-)/20V:839,6405; 831,6570; 771,6234; 112,9847; 44,9974	SM	-22%	-29%	0%
829,638/ 22,7	[M+HCOOH-H] <sup>-</sup>	8	SM(d40:2)	(-)/40V:769,6202; 168,0405; 78,9572	SM	-19%	-13%	21%
799,6667/ 23,7	[M+H] <sup>+</sup>	3	SM(d41:2)	(+)/40V:184,0725; 86,0962; 60,0805	SM	-12%	-27%	7%
843,6567/ 24	[M+HCOOH-H] <sup>-</sup>	4	SM(d41:2)	(-)/40V:783,6354; 168,0440; 78,9520; 44,9969	SM	-14%	-18%	18%
857,6738/ 24,3	[M+HCOOH-H] <sup>-</sup>	2	SM(d42:2)	(-)/40V:797,6532; 168,0405; 78,9582	SM	-20%	-21%	8%
925,6613/ 24,3	[M+HCOONa+ HCOOH-H] <sup>-</sup>	2	SM(d42:2)	(-)/40V:797,6532; 168,0405; 78,9582	SM	-16%	-16%	7%

993,6483/ 24,4	[M+HCOOH+2( HCOONa)-H] <sup>-</sup>	2	SM(d42:2)	(-)/20V:925,6604; 857,6643; 797,6498; 180,9716; 112,9865	SM	-14%	-13%	9%
801,6829/ 25,2	[M+H] <sup>+</sup>	2	SM(d41:1)	(+)/40V:264,2687; 184,0729; 124,9959; 104,1062; 86,0986; 60,0773	SM	-22%	-40%	-16%
845,6732/ 25,6	[M+HCOOH-H] <sup>-</sup>	3	SM(d41:1)	(-)/40V:785,6547; 168,0442; 78,9577	SM	-21%	-32%	-4%
815,699/ 26,1	[M+H] <sup>+</sup>	1	SM(d42:1)	(+)/40 V:184,0732; 124,9956; 86,0976; 60,0809	SM	-16%	-42%	-12%
859,6882/ 26,3	[M+HCOOH-H] <sup>-</sup>	3	SM(d42:1)	(-)/40V:799,6674; 168,0420; 78,9590	SM	-25%	-31%	-4%
927,6769/ 26,3	[M+HCOONa+ HCOOH-H] <sup>-</sup>	2	SM(d42:1)	(-)/40V:859,7006; 799,6782; 112,9854; 44,9976	SM	-16%	-26%	-6%
666,6021/ 24,9	[M+HCOOH-H] <sup>-</sup>	3	Cer(d40:1)/ Cer(d18:1/22:0)	(-)/40V:620,5929; 590,6071; 588,5467; 572,5505; 380,3551; 364,3600; 338,3208; 321,3064; 263,2429; 237,2162; 44,9994	Cer	-27%	-33%	0%
692,6183/ 25,1	[M+HCOOH-H] <sup>-</sup>	2	Cer(d42:2)/ Cer(d18:1/24:1)	(-)/ 40V:646,6177; 616,5991; 614,5836; 598,5996; 406,3969; 390,3772; 364,3506; 347,3264; 263,2379; 237,2201; 44,9990	Cer	-23%	-23%	4%
856,6846/ 25,3	[M+HCOOH-H] <sup>-</sup>	5	HexCer(d42:1)	(-)/40V:648,6348; 392,3959; 349,3520; 179,0588	Cer	-28%	-46%	-26%
680,6184/ 25,7	[M+HCOOH-H] <sup>-</sup>	2	Cer(d41:1)/ Cer(d18:1/23:0)	(-)/40V:634,6118; 604,5445; 586,5831; 394,3663; 378,3750; 352,3510; 335,3260; 263,2324; 237,2150	Cer	-19%	-33%	-11%
632,6328/ 26,2	[M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	2	Cer(d42:1)/ Cer(d18:1/24:0)	(+)/ 20V: 614,618; 602,6097; 282,2783; 264,2679; 252,2693	Cer	-17%	-47%	-18%
694,634/ 26,5	[M+HCOOH-H] <sup>-</sup>	2	Cer(d42:1)/ Cer(d18:1/24:0)	(-)/40V:648,6226; 618,6104; 616,5961; 600,5869; 392,3886; 366,3775; 349,3481; 263,2372; 237,2165; 44,9997	Cer	-23%	-33%	-7%

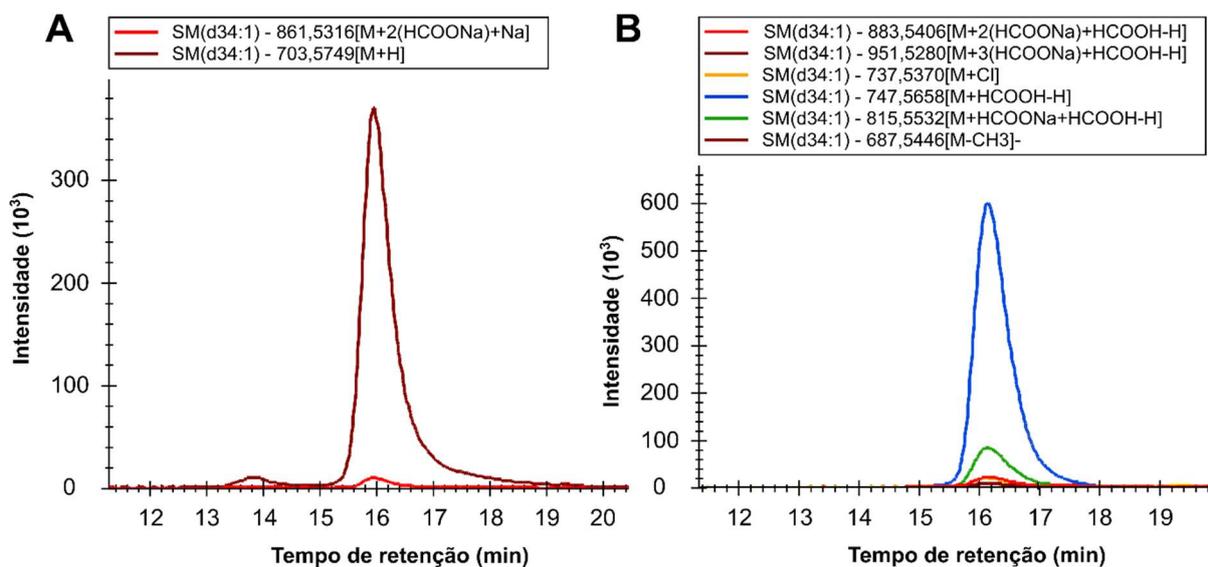
708,6486/ 27	[M+HCOOH-H] <sup>-</sup>	4	Cer(d43:1)/ Cer(d19:1/24:0)	(-)/40V:662,6392; 632,6281; 630,6345; 408,3692; 392,3972; 366,3686; 251,2402; 44,9989	Cer	-17%	-30%	-11%
634,5395/ 20,5	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	2	DG(36:4)/ DG(18:2-18:2)	(+)/20V:617,5123; 599,5035; 337,2729	DG	-14%	-40%	-27%
575,5013/ 21,5	[M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	4	DG(34:2)/ DG(18:2-16:0)	(+)/20V:313,2746; 263,2227; 239,2330; 125,1241; 109,0995; 95,0853; 67,0535	DG	-37%	-58%	-37%
577,5171/ 23	[M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	3	DG(34:1)/ DG(16:0-18:1)	(+)/20 V:265,2514; 239,2404; 151,1485; 123,1168; 109,1009; 95,085; 71,0844; 57,0703	DG	-41%	-57%	-35%
603,5333/ 23,4	[M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	2	DG(36:2)/ DG(18:1/18:1)	(+)/20V:265,2497; 135,1156; 121,1012; 109,1060; 97,1023; 83,0872; 67,0542	DG	-46%	-46%	-10%
601,5173/ 22	[M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	3	DG(36:3)/ DG(18:2-18:1)	(+)/20V:265,2491; 263,2326; 175,1478; 135,1183; 121,1038; 95,0851; 81,0686; 65,0720; 55,0547	DG	-35%	-53%	-17%
842,721/ 31	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	3	TG(50:5)/ TG(16:1-16:1- 18:3)	(+)/ 20V:825,7330; 571,4612; 547,4226; 545,4698; 261,2197	TG	43%	-18%	-38%
851,7098/ 34,3	[M+Na] <sup>+</sup>	0	TG(50:3)/ TG(16:0-16:1- 18:2)	(+)/40V:597,4800; 595,4786; 571,4713; 239,2373	TG	-20%	-32%	-28%
846,7555/ 34,3	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	1	TG(50:3)/ TG(16:0-16:1- 18:2)	(+)/20V:829,7266; 575,5001; 573,4825; 549,4915; 237,2218	TG	-22%	-44%	-33%
946,7835/ 34,5	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	2	TG(58:9)/ TG(20:4-20:4- 18:1)	(+)/20V:647,4990; 625,5162; 287,2381	TG	56%	41%	-7%
877,7266/ 34,7	[M+Na] <sup>+</sup>	1	TG(52:4)/ TG(16:0-18:2- 18:2)	(+)/40V:621,4915; 597,4832	TG	-19%	-24%	-12%
872,7714/ 34,7	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	1	TG(52:4)/ TG(16:1-18:1- 18:2)	(+)/40V:601,5170; 575,5029; 573,4897; 265,2473; 263,2338; 237,2188	TG	-22%	-36%	-17%

848,7709/ 35,3	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	1	TG(50:2)/ TG(16:0-16:1- 18:1)	(+)/40V:577,5190; 575,5051; 549,4877; 339,2894; 313,2789; 265,2555; 239,2388; 237,2206	TG	-32%	-48%	-39%
879,7380/ 35,7	[M+H] <sup>+</sup>	6	TG(54:6)/ TG(16:0-20:5- 18:1)	(+)/40V:623,4890; 597,4840; 577,5070; 265,2519	TG	-36%	-10%	-25%
369,3522/ 34,8	[M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	1	Frag Ester de colesterol (Colesterol-H <sub>2</sub> O)	(+)/20V:369,3507; 287,2724; 259,2409; 175,1466; 161,1327; 147,1164; 135,1158; 121,1000; 109,1015; 95,0857; 81,0697	CE	-17%	-32%	-15%
669,558/ 33,4	[M+Na] <sup>+</sup>	0	CE(18:3)	(+)/20V:301,2065; 369,3504; 135,1163	CE	-21%	-47%	-30%
666,6189/ 34,8	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	1	CE(18:2)	(+)/20V:369,3517; 175,1473; 161,1277; 147,1139; 135,1156	CE	-24%	-39%	-15%
671,5746/ 34,8	[M+Na] <sup>+</sup>	1	CE(18:2)	(+)/20V:303,2269; 369,3524	CE	-19%	-25%	-6%
692,6336/ 35,2	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	1	CE(20:3)	(+)/20V:369,3515; 175,1527; 161,1381; 147,1202; 135,1232	CE	-11%	-41%	-23%
118,0864/ 1,1	[M+H] <sup>+</sup>	1	Betaina	(+)/40V:59,0709; 58,0668; 43,0385; 42,0335	Amina Quart.	40%	46%	-9%
162,1125/ 1,1	[M+H] <sup>+</sup>	0	Carnitina	(+)/20V:102,0914; 103,0382; 85,0285; 60,0809; 58,0653; 43,0182	Carn./ Acilcarn.	-14%	-10%	9%

\* as porcentagens de alteração em negrito representam as alterações em que a comparação dos grupos dois a dois resultou num p-valor menor que 0,05 após correção post hoc de Bonferroni. C (Clopidogrel), S (Sinvastatina), T (Ticagrelor), R (Rosuvastatina), b (basal), t (trinta dias).  Escala de cor (% de alteração): Máx Min.

Alguns compostos foram identificados como diferentes adutos e/ou nos dois modos de ionização, sendo que no total, 61 compostos significativos únicos foram identificados. Em geral, os diferentes adutos do mesmo composto apresentam a porcentagem de alteração similar nas três comparações. Para compostos que ionizaram nos dois modos, também observou-se que muitos compostos apresentaram a porcentagem de alteração similar, exceto para alguns casos, que tiveram pelo menos a mesma tendência de alteração nas diferentes comparações (de aumento ou diminuição em relação ao controle).

Alguns adutos incomuns foram detectados para compostos que estavam abundantes, como no caso da SM(d34:1), em que encontrou-se 6 adutos no modo negativo e 2 no modo positivo (Figura 18). Os *molecular features* relacionados ao mesmo composto devem apresentar mesmo tempo de retenção e formato de pico, como se observa na Figura 18, além disso, o aduto mais provável deve apresentar a maior área, como o  $[M+H]^+$  no modo positivo e o  $[M+HCOOH-H]^-$  no modo negativo.



**Figura 18-** Cromatogramas de íon extraídos dos adutos de SM(d34:1) encontrados nas amostras de plasma analisadas por RPLC-MS nos modos positivo (A) e negativo (B) de ionização.

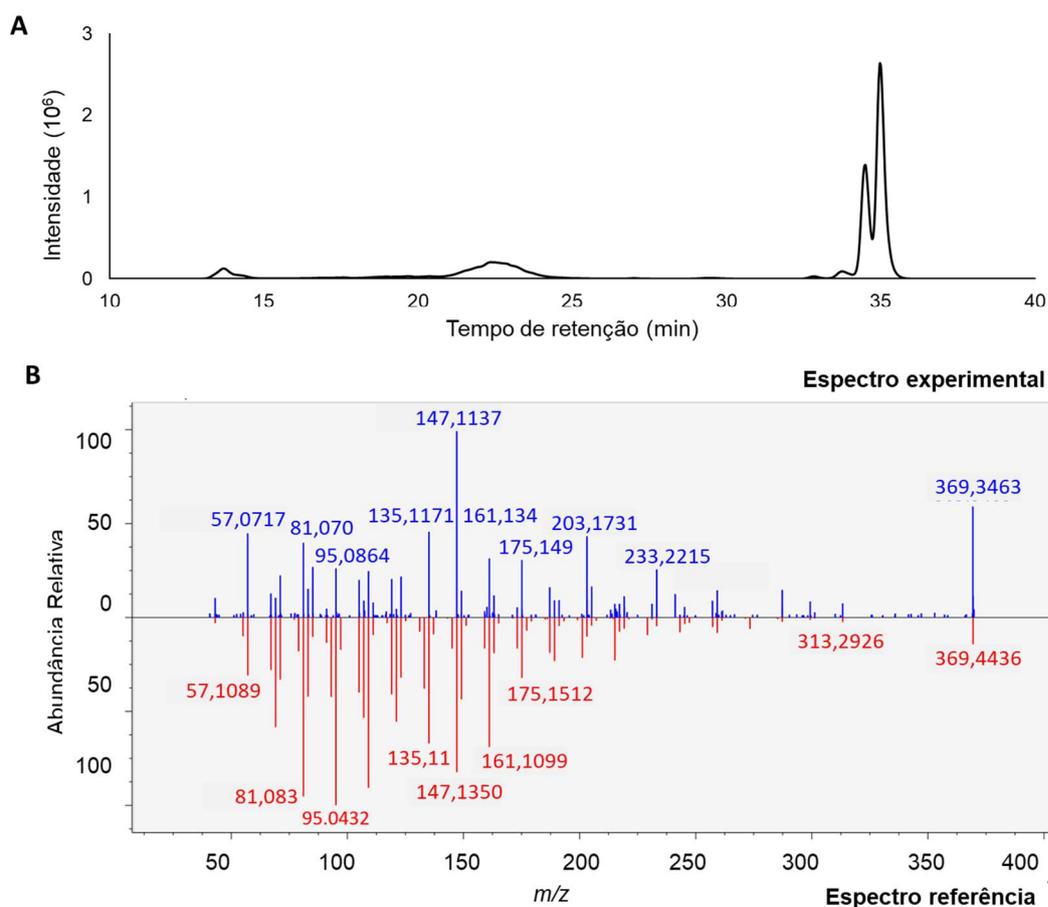
No modo negativo, para os adutos com ácido fórmico e formiato de sódio, foi possível verificar um sinal bem alto de  $m/z$  112,9851 atribuído possivelmente ao agregado iônico  $[HCOOH+HCOONa-H]^-$  e um sinal de  $m/z$  44,9977 atribuído ao ácido fórmico desprotonado. Os adutos com dois ou mais formiatos de sódio ainda apresentaram o sinal de  $m/z$  180,9725,  $[(HCOOH+2(HCOONa)-H)]^-$ . Todos os adutos do modo negativo apresentaram o sinal de  $m/z$  687,5446, referente a demetilação da esfingomielina.

No modo positivo foi possível observar, além da molécula protonada de SM(d34:1), um aduto de  $[M+HCOONa+Na]^+$ . No espectro de MS/MS desse aduto, observou-se um sinal de SM(d34:1) sodiada ( $m/z$  755,5566), a perda neutra de trimetilamina da esfingomielina ( $m/z$  666,4828), a perda neutra de fosfocolina da SM ( $m/z$  542,4869), além dos sinais de  $m/z$  146,9820 ( $NaC_2H_3PO_4$ ), característico de SM/PC sodiada, e o  $m/z$  86,0960 referente à colina desidratada, característico de SM/PC<sup>11</sup>.

No modo positivo a maioria dos DG significativos foram ionizados como  $[M+H-H_2O]^+$  e foram confirmados pela análise do perfil de fragmentação, apresentando fragmentos relacionados às cadeias de ácido graxo, como  $[AG+H-H_2O]^+$ , além de fragmentos relacionados

à quebra desses ácidos graxos. Ainda, observou-se a presença do aduto  $[M+NH_4]^+$  no mesmo tempo de retenção, que também apresentou espectro de MS/MS com padrão de fragmentação característico dos compostos. Apesar desses adutos com amônio confirmarem a identificação, eles não aparecem na lista de significativos.

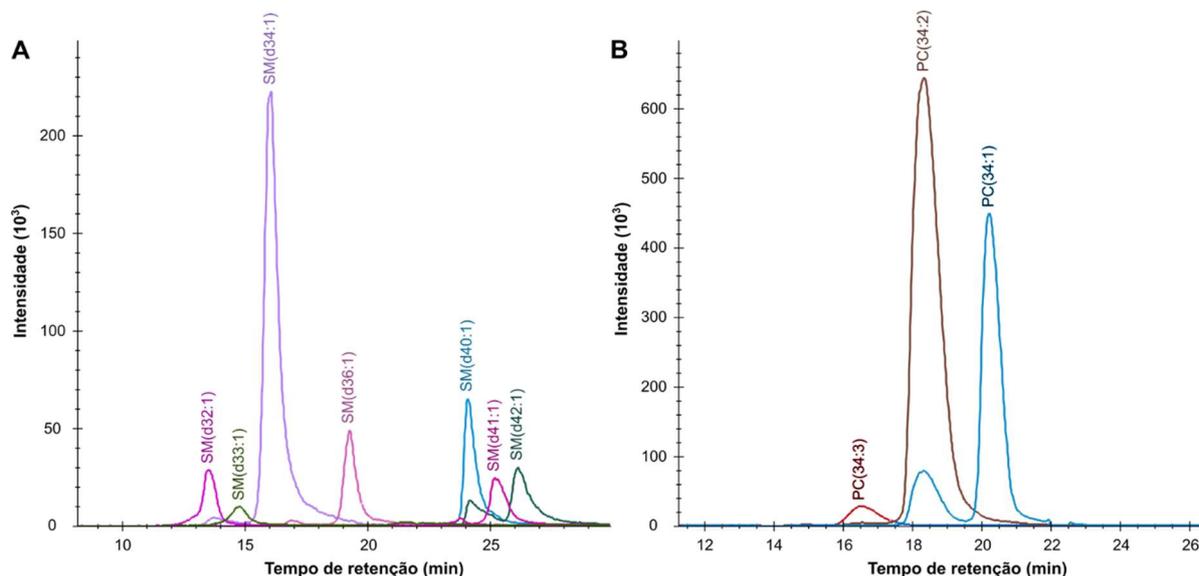
Na Tabela 6, pode-se observar a identificação de um fragmento formado na fonte de ionização referente ao colesterol (ionizado como  $[M+H-H_2O]^+$ ). A identificação do pico como colesterol livre foi descartada devido à incompatibilidade do tempo de retenção, que deve ser muito menor para o colesterol livre do que para os ésteres de colesterol, devido a menor polaridade da forma livre. No cromatograma do íon extraído de  $m/z$  369,35 há muitos picos, em que os espectro de MS/MS são compatíveis com o do colesterol, e então o pico referente ao colesterol livre, provavelmente é o primeiro pico, em 13,6 min e os picos subsequentes possivelmente são fragmentos formados na fonte de ésteres de colesterol (Figura 19). O resultado é compatível com o que foi observado por Gallego *et al.*, em que descrevem uma extensa fragmentação na fonte dos adutos de amoniados de ésteres de colesterol, resultando no framento de  $m/z$  369,3516<sup>19</sup>.



**Figura 19-** Cromatograma do íon extraído de  $m/z$  369,3515 (A) e espectro MS/MS desse íon no tempo de retenção de 13,6 min de amostras de plasma analisadas por RPLC-MS/MS no modo positivo.

A aquisição de dados no modo de DDA não foi suficiente para a identificação de uma grande parte de *molecular features* significativamente alterados, assim os demais compostos foram putativamente identificados pela busca do *m/z* com 10 ppm de erro na plataforma CEU Mass Mediator, que realiza a busca em diversos bancos de dados simultaneamente<sup>20</sup> (**Tabela Suplementar 1 em Apêndices**). A busca resulta em uma tabela com muitas identificações para um mesmo *molecular feature*, assim a identificação é refinada manualmente. São descartadas identificações que são biologicamente improváveis ou impossíveis, como pesticidas, por exemplo. A estrutura química também foi levada em consideração, como por exemplo a identificação de compostos muito apolares, como triacilglicerídeos em tempos de retenção muito baixos foram descartados.

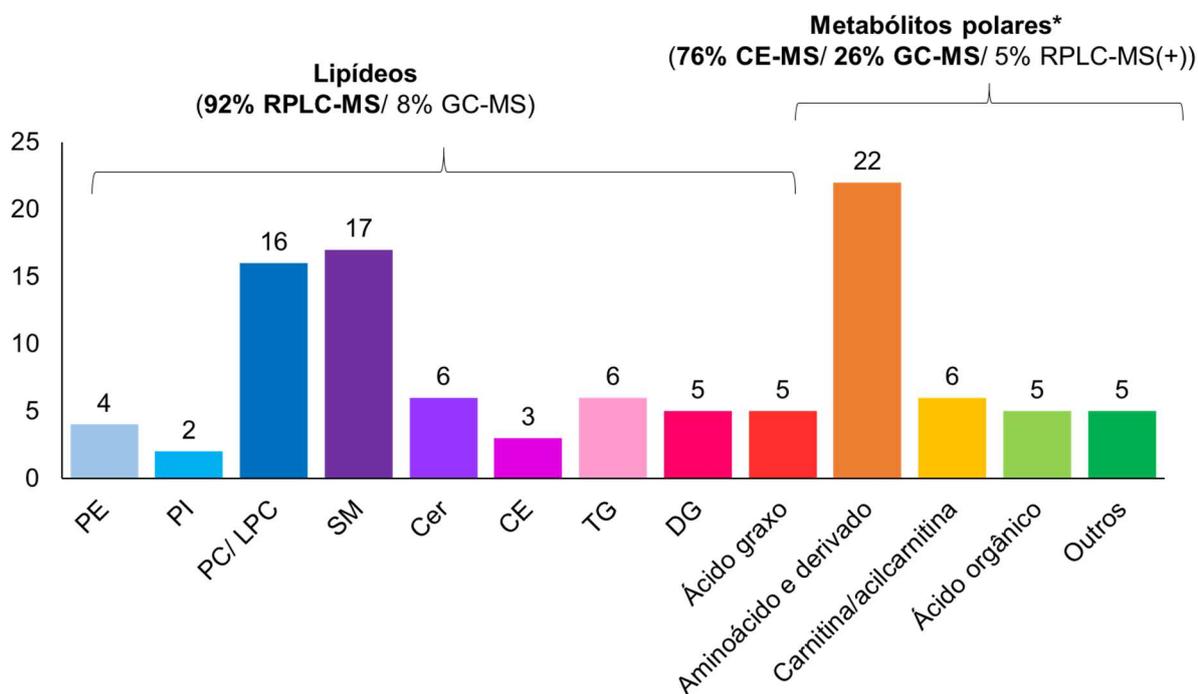
Além disso, em fase reversa os lipídios da mesma classe que foram previamente identificados por MS/MS serviram de base para descartar identificações baseadas no tempo de retenção. Os lipídios de mesma classe com o mesmo número de saturações eluem em ordem crescente de acordo com o número de carbonos, devido a menor polaridade de lipídios de cadeia mais longa (Figura 20 A). Já os lipídios de mesma classe com o mesmo número de carbonos que possuem mais insaturações eluem em menores tempos de retenção, devido a maior polaridade dos lipídios conferida pelas insaturações (Figura 20 B).



**Figura 20-** Cromatograma do íon extraído de lipídeos da classe SM identificados por MS/MS na análise de plasma por RPLC-MS no modo positivo com uma insaturação (A) e da classe PC identificados por MS/MS nas amostras de plasma analisadas por RPLC-MS no modo negativo com 34 carbonos referentes aos resíduos de ácidos graxos (B).

A análise metabolômica multiplataforma possibilitou a identificação de compostos polares detectados principalmente pela técnica de CE-MS (76% dos compostos polares) e de lipídios de diversas classes diferentes detectados principalmente pelas análises de RPLC-MS

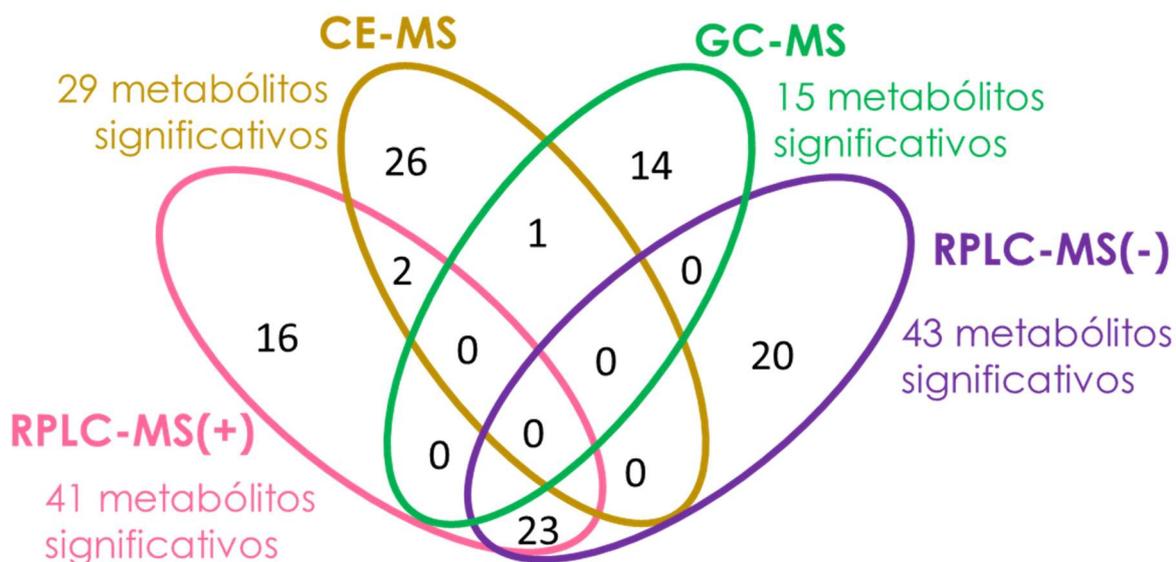
no modo positivo e negativo de ionização (92% dos lipídios identificados) (Figura 21), o que comprova a importância da análise de amostras biológicas por mais de uma plataforma analítica.



**Figura 21-** Gráfico de barras das classes de compostos significativamente alterados pela análise univariada, identificados por adição de padrão (CE-MS) ou pelo padrão de fragmentação (GC-MS ou RPLC-MS/MS) em amostras de plasma de pacientes analisadas por GC-MS, CE-MS e RPLC-MS com a porcentagem de metabólitos polares e apolares identificados por cada plataforma analítica.

\* metabólitos identificados por mais de uma técnica analítica foram contabilizados apenas uma vez, por isso a soma da porcentagem de analitos polares obtidos por cada técnica analítica resulta num valor maior que 100%.

Muitos metabólitos identificados como alterados neste estudo foram identificados por experimentos de adição de padrão ou pelo padrão de fragmentação (GC-MS ou RPLC-MS/MS) apenas por uma das plataformas analíticas (76 metabólitos ou 40% do total de metabólitos identificados), sendo que a análise de RPLC-MS, nos modos positivo e negativo, proporcionou o maior número de metabólitos identificados (41 e 43, respectivamente), como pode-se observar no Diagrama de Venn esquematizado na Figura 22. Esses resultados demonstram a importância e o valor de aplicar diferentes técnicas analíticas a mesma amostra em estudos metabolômicos.

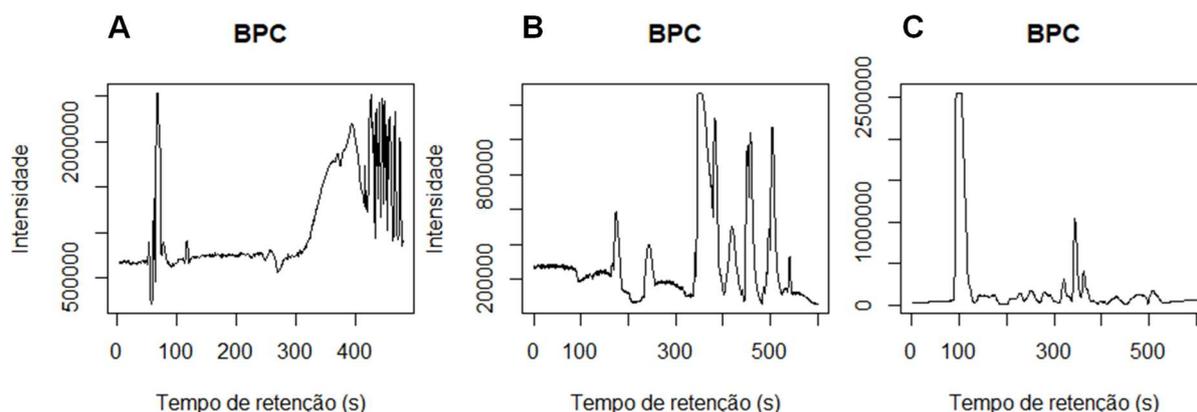


**Figura 22-** Diagrama de Venn dos metabólitos significativos pela análise univariada identificados por adição de padrão ou pelo padrão de fragmentação, provenientes da análise de plasma de pacientes por CE-MS, GC-MS e RPLC-MS no modo positivo e negativo.

## 2 - Análise metabolômica global multiplataforma de urina

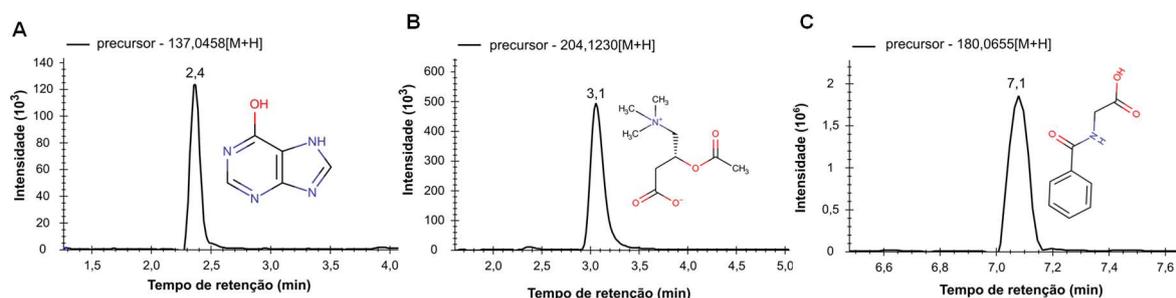
As amostras de urina utilizadas nesta análise foram dos mesmos pacientes das amostras de plasma analisadas anteriormente porém, pacientes que não tinham amostras nos três tempos de coleta (basal (**b**), após trinta dias (**t**) e após 6 meses (**s**) de tratamento) foram excluídos dessa análise. Para completar um número de 20 pacientes do grupo tratado com clopidogrel e sinvastatina (**CS**), um paciente a mais, cuja amostra de plasma não foi analisada, foi incluído. No grupo tratado com ticagrelor e rosuvastatina (**TR**) amostras de 22 pacientes foram analisadas.

A urina é um biofluido composto por muitas moléculas hidrofílicas, alta concentração de sais e concentrações muito baixas de lipídios<sup>21</sup>. Dessa forma, optou-se pela análise das amostras de urina por cromatografia de fase reversa (RPLC-MS) e de interação hidrofílica (HILIC-MS, no modo positivo e negativo), como mostrado na Figura 23.



**Figura 23-** Cromatogramas do pico base das análises de urina por RPLC-MS (A) e HILIC-MS no modo positivo (B) e negativo (C).

A coluna utilizada neste trabalho para a cromatografia de fase reversa tem recheio de partículas de sílica com grupamentos pentafluorofenil (PFP), o que proporciona uma maior retenção de compostos polares do que a típica coluna C18<sup>22</sup>, como pode ser visto na Figura 24, que mostra retenção de compostos polares, como hipoxantina, acetilcarnitina e ácido hipúrico.



**Figura 24-** Cromatograma de íons extraídos da hipoxantina de  $m/z$  137,0458 (A), acetilcarnitina de  $m/z$  204,1230 (B) e ácido hipúrico de  $m/z$  180,0655 (C) de amostra de urina de paciente infartado, por cromatografia de fase reversa (RPLC-MS).

Além disso, tanto a coluna utilizada na fase reversa quanto a usada em HILIC são colunas com partículas de núcleo sólido, que proporcionam maior eficiência, evitando alta pressão no sistema cromatográfico, como no caso de partículas sub-2  $\mu\text{m}$ , obtendo-se tempos de análise relativamente curtos com 17,5 min para RPLC-MS e 18,5 min para HILIC-MS, considerando o tempo de condicionamento da coluna, que é relativamente alto nos dois casos (9,4 min e 8,4 min, respectivamente).

Para as análises por HILIC-MS, o preparo de amostra foi otimizado antes das análises. A acetonitrila é um solvente comumente utilizado para o preparo de amostras de fluidos biológicos em estudos de metabolômica, principalmente quando as amostras são analisadas por HILIC-MS, pois a acetonitrila também é o solvente orgânico mais empregado na composição

da fase móvel orgânica, como o solvente fraco de HILIC, uma vez que outros habituais solventes podem causar baixa retenção dos analitos, além de picos largos e assimétricos nesse modo cromatográfico<sup>23,24,25</sup>. Geralmente, no início do gradiente, a porcentagem da acetonitrila é alta e seu uso no preparo de amostras é recomendável para evitar alargamento de pico devido a incompatibilidade do solvente da amostra com as condições cromatográficas iniciais. Entretanto, o uso de acetonitrila para precipitação de proteínas e extração de metabólitos não se mostrou tão eficiente quanto o de isopropanol, em experimentos realizados anteriormente a esta tese<sup>26</sup>. Em experimentos anteriores a esta tese de extração de metabólitos da urina com isopropanol, foi necessária uma etapa de secagem e ressuspensão da amostra em solução a 50% acetonitrila, devido a distorção de alguns picos.

Então, a fim de evitar a etapa de secagem e ressuspensão, testou-se o uso de isopropanol, acetonitrila ou uma mistura de 1:1 isopropanol:acetonitrila para a remoção de proteínas e extração de metabólitos da amostra de urina, com injeção direta do sobrenadante com volumes de injeção relativamente baixos (5  $\mu$ L e 3  $\mu$ L para o modo negativo e positivo, respectivamente), para diminuir o efeito de distorção de picos, pela incompatibilidade do solvente da amostra com o solvente inicial na fase móvel cromatográfica.

Assim, um *pool* de urina de três voluntários saudáveis e água ultrapura foram preparados e analisados em triplicata com os diferentes solventes, como está descrito com mais detalhes na parte experimental (**Capítulo 3 – item 2.6.2**). Brevemente, adicionou-se uma solução contendo fluorofenilalanina (padrão interno) e solvente gelado (acetonitrila, isopropanol ou 1:1 acetonitrila:isopropanol) à amostra de urina. A mistura foi homogeneizada e permaneceu sob -20 °C por 30 min. Após centrifugação, foi adicionada uma solução contendo um segundo padrão interno (modo positivo: clorocolina e modo negativo: ácido 4-bromobenzóico) ao sobrenadante. Essa mistura foi homogeneizada e analisada por HILIC-MS no modo positivo e negativo.

Para a comparação dos métodos de preparo de amostra, primeiramente os *molecular features* (*mf*) foram obtidos empregando-se o software de acesso livre XCMS<sup>27</sup>. Os *molecular features* encontrados no branco de preparo foram removidos da tabela de dados, pois não são provenientes da amostra biológica. Dessa forma, obteve-se o número total de *molecular features* que foram detectados nas 3 réplicas de preparo do *pool* de urina para os solventes examinados, computou-se apenas o número desses *mf* com coeficiente de variação (CV) menor que 30% e calculou-se a mediana do coeficiente de variação para as condições examinadas.

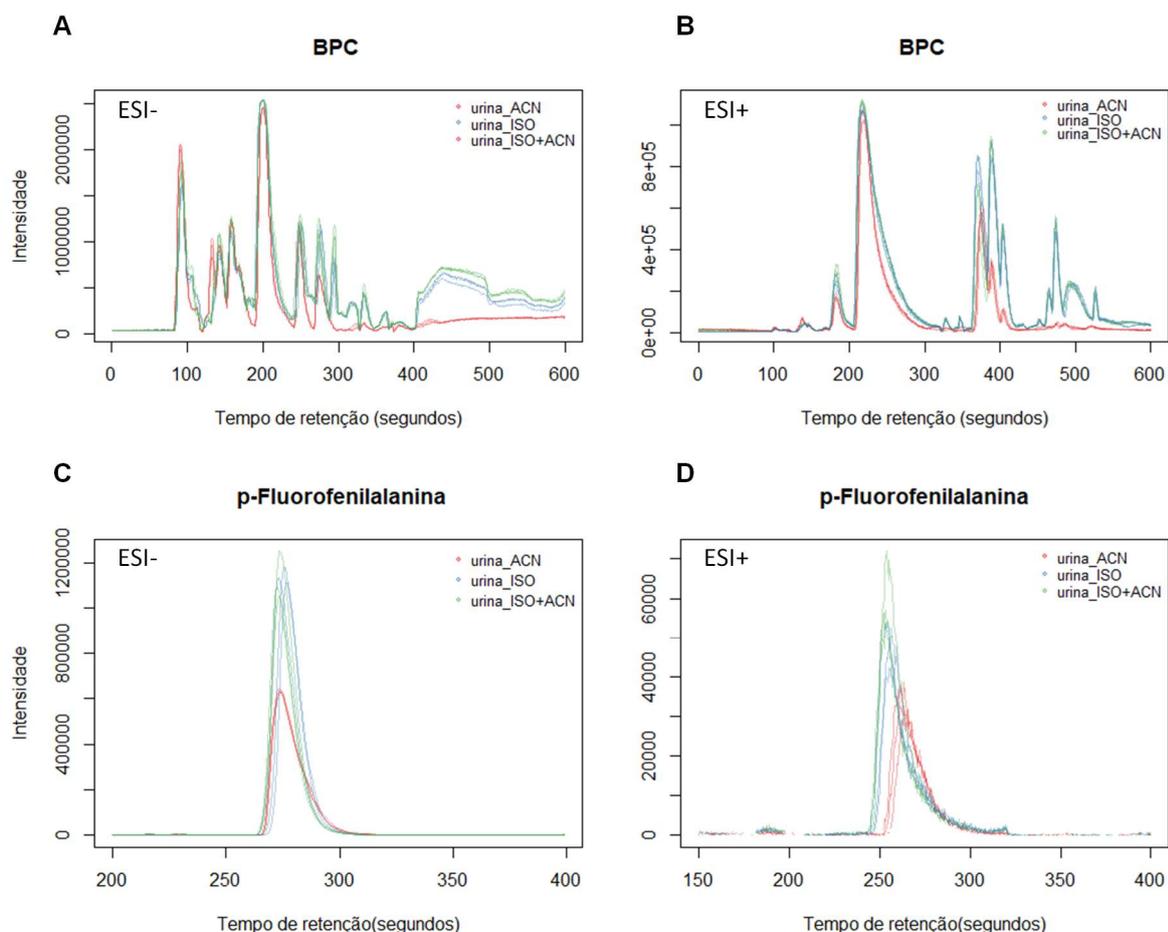
Um total de 600 e 221 *molecular features* foram extraídos pelos três solventes (acetonitrila, isopropanol, 1:1 isopropanol:acetonitrila) no modo negativo e positivo de ionização, respectivamente, para HILIC-MS. Para esses *molecular features*, presentes nas três condições avaliadas, calculou-se a mediana do CV das intensidades, além do número desses *molecular features* com CV menor que 30% para cada solvente testado (Tabela 7).

**Tabela 7** - Resultados obtidos da otimização do preparo de amostras de urina para análise por HILIC-MS no modo negativo e positivo

		Acetonitrila*	Isopropanol*	1:1 Acetonitrila:Isopropanol*
<i>mf</i> da triplicata	N° total	(-) 759 (+) 243	(-) 993 (+) 361	(-) 1043 (+) 406
	N° total de <i>mf</i> com CV <30% (% <i>mf</i> )	(-) 657 (87%) (+) 220 (91%)	(-) 907 (91%) (+) 327 (91%)	(-) 910 (87%) (+) 356 (88%)
	Mediana do CV da área dos picos	(-) 8% (+) 8%	(-) 7% (+) 9%	(-) 11% (+) 11%
<i>mf</i> de todas as condições	N° total de <i>mf</i> com CV <30% (% <i>mf</i> )	(-) 527 (88%) (+) 210 (95%)	(-) 559 (93%) (+) 202 (91%)	(-) 553 (92%) (+) 210 (95%)
	Mediana do CV da área dos picos	(-) 8% (+) 8%	(-) 5% (+) 7%	(-) 9% (+) 10%

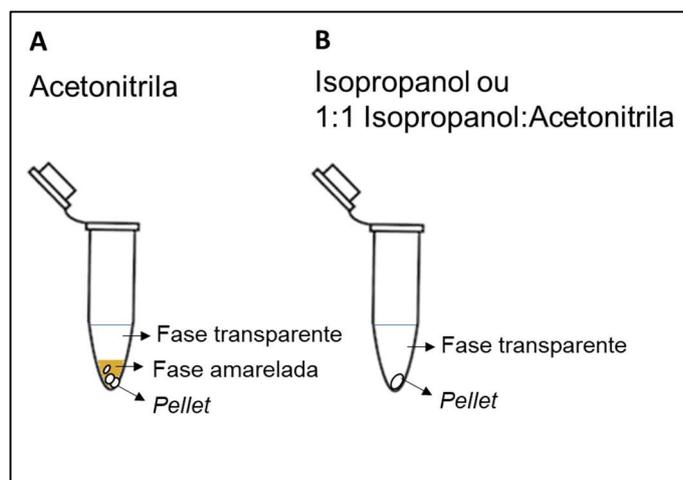
\*resultados do modo negativo (-) e positivo (+) de ionização. *mf*: *molecular feature*

A condição de preparo de amostra com um menor número de *molecular features* extraídos foi a que utilizou acetonitrila para a precipitação de proteínas nos dois modos de ionização, confirmando o que foi observado nos experimentos anteriores a esta tese<sup>26</sup>. Ainda, pode-se observar pelo cromatograma do pico base (BPC, do inglês *base peak chromatogram*) que após cerca de 200-300 s de análise, onde eluem os compostos de maior polaridade, há nitidamente um menor sinal comparado ao sinal dos outros métodos de preparo de amostra (Figura 25 A e B). Além disso, pode-se observar que a área de pico do padrão interno adicionado no início do preparo de amostra (p-fluorofenilalanina) está muito mais baixa nas amostras tratadas com acetonitrila, indicando que a acetonitrila é menos eficiente na extração de metabólitos polares (Figura 25 C e D).



**Figura 25-** Cromatograma do pico base (A e B) e do íon extraído do padrão interno p-fluorofenilalanina (C e D) para amostras de urina preparadas utilizando acetonitrila (•), isopropanol (•) ou 1:1 isopropanol:acetonitrila (•) analisadas por HILIC-MS no modo negativo(-) e positivo(+) de ionização por electro spray (ESI).

As amostras de urina precipitadas com acetonitrila apresentaram três fases aparentes, uma fase líquida transparente, uma fase líquida amarelada e *pellets* de proteínas, que aparentaram ser menores do que nas amostras precipitadas com isopropanol ou mistura de isopropanol e acetonitrila, em que se observa apenas um *pellet* mais compactado, como ilustrado na Figura 26.



**Figura 26-** Representação gráfica de amostras de urina precipitadas com acetonitrila (A), com isopropanol ou isopropanol:acetonitrila 1:1 (B).

Assim, para melhorar a repetibilidade de extração, coletou-se o sobrenadante apenas da fase líquida superior, de coloração transparente, para as amostras extraídas com acetonitrila. Os demais solventes apresentaram apenas duas fases, uma líquida transparente e o *pellet* de proteína (Figura 26 B). A hipótese para esse resultado é de que provavelmente deve ocorrer a partição dos compostos mais polares da urina (mais retidos por HILIC) entre as fases transparentes e amarela que se formam durante o preparo de amostras utilizando acetonitrila.

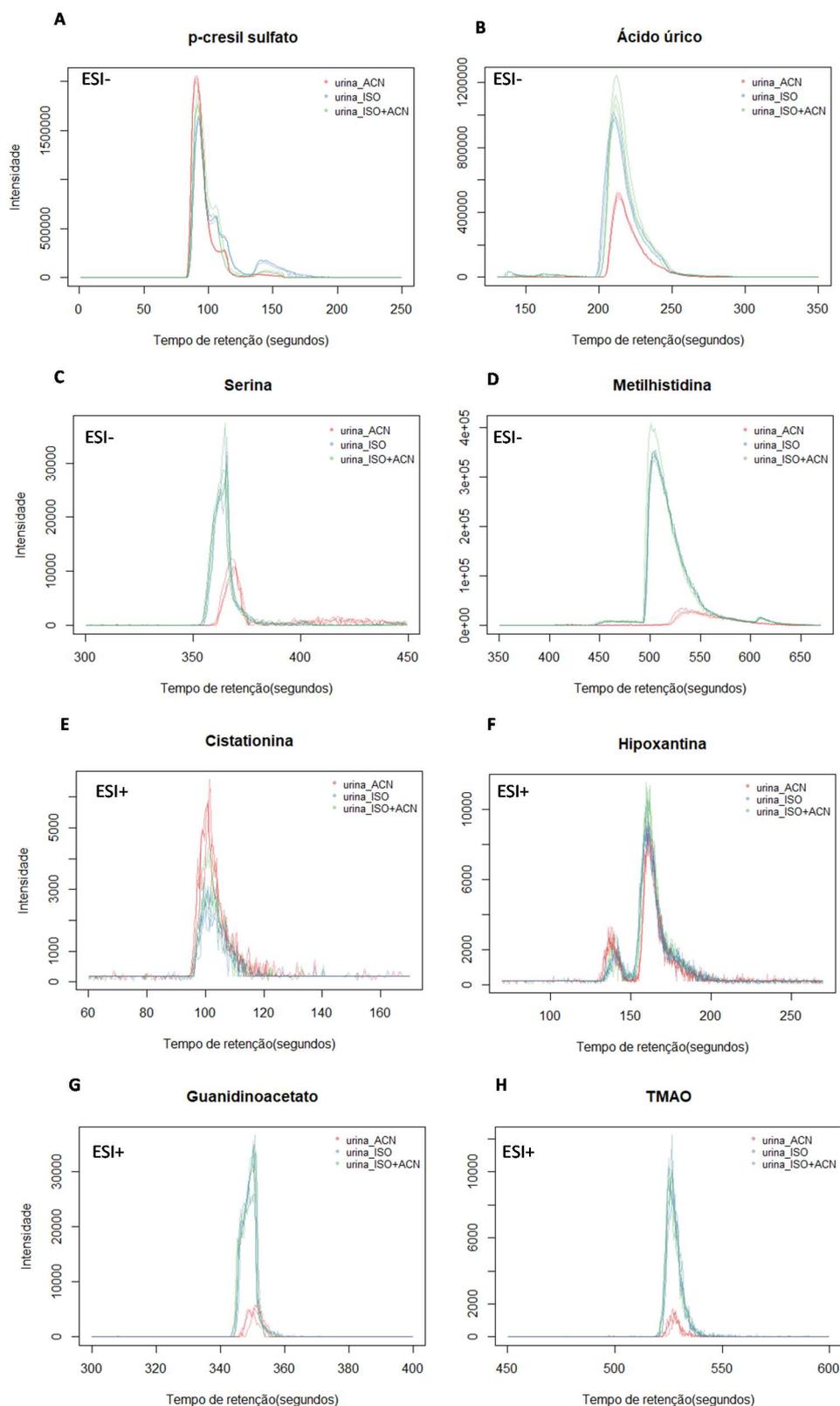
No entanto, no início do cromatograma do pico base do modo negativo, observa-se que as amostras de urina tratadas com acetonitrila possuem sinal analítico ligeiramente maior. Assim, observa-se pelo *heatmap* construído com alguns *molecular features* presentes em todas as condições de preparo de amostras e que eluem no início, meio e final da análise cromatográfica, que em geral, no início da análise (compostos mais apolares) as áreas dos picos são maiores para as amostras extraídas com acetonitrila, mas no meio e no final da análise (compostos mais polares), as amostras extraídas com acetonitrila apresentam o menor sinal (Figura 27). A mesma tendência de picos mais intensos para acetonitrila no início da análise cromatográfica e menos intensos no meio e no final das análises também se observa no modo positivo (dados não mostrados).

m/z	RT (min)	urina_ACN1	urina_ACN2	urina_ACN3	urina_ISO1	urina_ISO2	urina_ISO3	urina_I+A1	urina_I+A2	urina_I+A3
252.0058	1.37	63042	65567	64596	48604	47929	45009	60867	56303	56050
253.5119	1.37	6916	8456	7003	6333	5957	5132	7186	7544	6592
236.0239	1.40	74149	80547	69325	61187	62003	59036	77361	67135	69328
222.0107	1.41	11740	14546	6793	12554	10600	12480	11401	18018	12210
336.9225	1.42	2948	12638	1292	4823	3896	5985	4594	4726	5003
238.0782	1.45	121243	121458	118849	115534	123919	120334	150982	127742	139743
238.5812	1.46	31092	30524	26016	32683	29937	34031	33722	31623	37072
245.5705	1.47	16546	19956	17535	10016	17556	14443	18741	16182	14150
205.9862	1.50	248641	243265	225202	212414	199398	208647	231820	305177	222774
204.9829	1.50	2825345	3074456	2971615	2496385	2620176	2531998	2841015	2907154	2897497
165.0438	2.13	3414362	3426402	3371762	2589455	2597084	2625321	2831213	2576948	2531962
305.1834	2.28	71213	78941	68316	48186	46237	48592	43515	41574	37174
139.0273	2.52	547016	470185	508532	266064	243666	243964	204392	235378	205340
277.0049	2.93	41496	37319	34438	216133	202776	189937	186775	175766	171912
308.0806	2.95	31379	31162	29774	59382	54821	65286	62439	53654	51989
361.1488	2.97	35814	48442	50567	90545	110997	107977	120680	73682	110204
330.0302	2.97	45375	38237	35986	178011	170735	177522	169502	155225	149933
159.0314	2.98	252789	215243	203809	450744	441333	433264	451119	431119	415422
220.0852	3.01	162871	158365	146818	242605	225696	232810	276335	254008	249962
184.9974	3.04	26475	33316	37109	314827	286774	304434	291035	263332	249386
285.0636	3.05	62716	80491	86770	208650	202575	200401	291098	248910	245176
190.0351	3.06	130545	130862	112870	5218	440933	338279	362037	355706	356441
124.0077	4.23	1227928	1200626	1214629	1684624	1646482	1640252	1738494	1482796	1494426
249.0221	4.24	44108	46564	39210	312327	293323	299750	316676	263650	265643
219.0778	5.04	67334	17271	78448	95077	81691	85814	102585	77441	82895
270.0638	5.07	88773	85607	75803	130381	125594	116994	104061	101988	100661
186.0397	5.89	29114	31851	25296	152112	150984	153131	169135	153328	152486
248.0589	6.05	27386	25922	24336	60685	62653	58584	64159	66100	63803
174.9485	7.26	1679040	2642189	1559284	5006595	4851273	4869443	3767194	2421493	2492556
187.1069	7.54	101210	94368	106658	256787	223686	227091	201389	210987	202286
216.098	7.57	42288	52953	37746	181894	176139	177247	162209	167894	160068
234.9143	7.71	2259663	2930517	2259708	2025990	5720397	5927138	2892580	5273711	5037919
252.923	7.73	1165171	1805670	969355	2221854	1991325	1991978	1354729	1713248	1583816
294.8856	7.85	5922148	641154	5739483	3370002	405778	423701	597196	364257	320958
213.1202	7.86	43286	41667	37373	241637	230151	230366	227564	209892	193182
372.8641	7.87	1749739	805740	1713099	75912	130992	3596	92794	96161	89257
201.1235	7.95	98543	157058	205455	441209	407751	400467	422648	386128	385564
227.1033	7.99	367460	319195	241969	1850657	1836067	1849782	1865747	1712002	1736466
293.8897	8.09	6428289	6083307	1927080	527533	428101	409174	343880	389938	431217
371.8677	8.16	1841243	533629	1712932	121235	94977	79988	71015	79887	64453
370.8679	8.17	5252436	6465764	6799634	385583	319644	316161	252561	279543	288771
206.102	8.41	7427	12165	7876	66775	64352	69101	74985	70238	71072
168.0789	8.43	1178617	1098237	1007766	9194587	9529318	9399209	9928570	9179180	9408783
311.8997	8.91	250454	172345	219235	279461	269958	258376	130943	253600	232809
215.1391	8.93	38287	41295	32772	317184	323596	315951	376654	295257	293637
225.0989	9.23	142249	181258	141859	1591937	1624113	1602197	1835831	1607491	1607966
226.1006	9.23	17230	25568	17679	191742	182965	183221	211131	182864	179451
312.8946	9.89	186210	155191	242616	399338	377862	223326	259004	364113	392980

**Figura 27-** Heatmap da intensidade de molecular features ao longo da análise cromatográfica por HILIC-MS no modo negativo para as amostras de urina de pacientes infartados, extraídas com acetonitrila (ACN), isopropanol (ISO) e 1:1 isopropanol:acetonitrila (I+A).

Heatmap: máximo  mínimo.

Para observar o efeito da distorção nos picos, que pode ser causado pela injeção da amostra num solvente mais forte que o solvente da condição inicial do gradiente (condições de preparo de amostra com isopropanol, solvente mais forte que acetonitrila para HILIC<sup>28</sup>), foram computados cromatogramas de íon extraído para alguns compostos presentes na urina que apareceram em todas as condições de extração, com tempos de retenção diferentes (Figura 28). Os compostos foram identificados putativamente por massa exata, utilizando o banco de dados HMDB<sup>29</sup>. Para o pico que elui no início da análise, p-cresil sulfato, observa-se um ombro mais acentuado no pico das amostras extraídas com isopropanol ou 1:1 isopropanol:acetonitrila, já para a cistationina, que elui num tempo de retenção parecido, não se observa distorção dos picos de amostras extraídas com isopropanol ou da sua mistura com acetonitrila, observa-se apenas picos menos intensos para esse composto nesse tipo de extração. Os picos dos compostos metilhistidina, ácido úrico, trimetilamina n-óxido e hipoxantina apresentam um bom formato de pico para as amostras tratadas com isopropanol ou 1:1 isopropanol:acetonitrila, além de intensidades maiores ou comparáveis às amostras extraídas com acetonitrila. Para as amostras tratadas com acetonitrila, observa-se um sinal muito menor para os compostos que eluem após 3,3 min (200 s), como já foi observado no BPC. Os picos de serina e guanidinoacetato apresentam leve distorção no topo do pico para amostras tratadas com solvente contendo isopropanol, mas que não comprometem a análise.



**Figura 18** - Cromatograma do ion extraído dos compostos p-cresil sulfato de  $m/z$  187,01 (A), ácido úrico de  $m/z$  167,02 (B), serina de  $m/z$  104,03 (C), metilhistidina de  $m/z$  168,08 (D), cistationina de  $m/z$  223,07 (E), hipoxantina de  $m/z$  137,04 (F), guanidinoacetato de  $m/z$  118,06 (G) e trimetilamina N-óxido (TMAO) de  $m/z$  76,07 (H) de amostras de urina preparadas com acetonitrila (•), isopropanol (•) e 1:1 isopropanol:acetonitrila (•) analisadas por HILIC-MS no modo negativo(-) e positivo(+) de ionização por electrospray (ESI).

Dessa maneira, optou-se por empregar a mistura 1:1 isopropanol:acetonitrila, pois fornece o maior número *mf* detectados na triplicata, apesar de valores levemente maiores de CV da intensidade, mas ainda muito baixos, resultados adequados de formato de pico, maior intensidade de área de compostos polares quando comparado à acetonitrila e similaridade de composição da fase móvel inicial do que a que empregava o isopropanol puro, minimizando efeitos de incompatibilidade da amostra com as condições cromatográficas iniciais.

A cromatografia de amostras de urina por HILIC-MS foi brevemente otimizada. Para cada modo de ionização duas fases móveis diferentes foram testadas. No modo negativo, foram avaliadas fases móveis contendo formiato de amônio ou acetato de amônio e no modo positivo, formiato de amônio com pH ajustado para 3 com ácido fórmico, ou sem ajuste de pH (pH em torno de 6,4) com a análise de amostras de urina extraídas injetadas pelo menos 5 vezes em cada condição. Em relação ao número de *molecular features* (*mf*) e de repetibilidade, avaliado pelo coeficiente de variação, as duas fases móveis testadas apresentaram resultados similares nos dois modos de ionização (Tabela 8). No modo negativo, a fase móvel contendo acetato de amônio gerou picos mais intensos do que a fase móvel contendo formiato de amônio. No modo positivo, as fases resultaram em picos de altura semelhante (no geral). Assim, apesar do sinal maior obtido com acetato de amônio no modo negativo, optou-se por empregar a fase móvel de formiato de amônio sem ajuste de pH nos dois modos de ionização e com o mesmo gradiente, para auxiliar na identificação de metabólitos comuns ao modo de ionização positivo e negativo.

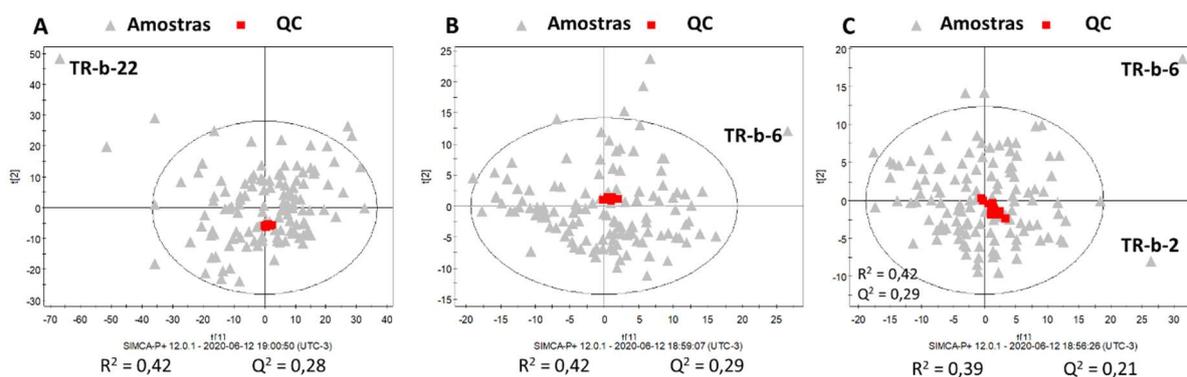
**Tabela 8-** Resultados obtidos para diferentes fases móveis testadas para análise de urina por HILIC-MS

Modo de ionização	Modo negativo		Modo positivo	
	HCOONH <sub>4</sub> (sem ajuste de pH)	CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> (sem ajuste de pH)	HCOONH <sub>4</sub> (sem ajuste de pH)	HCOONH <sub>4</sub> (pH 3, ajustado)
Nº total de <i>mf</i>	902	965	533	522
Mediana do CV de intensidade	12%	12%	9%	10%
Nº de <i>mf</i> com CV menor que 30%	884	882	475	458

Dessa forma, as amostras de urina dos pacientes do presente estudo foram analisadas por RPLC-MS e por HILIC-MS no modo positivo e negativo, após breve otimização do preparo de amostra e das condições cromatográficas. Empregou-se a p-fluoro-fenilalanina, um análogo

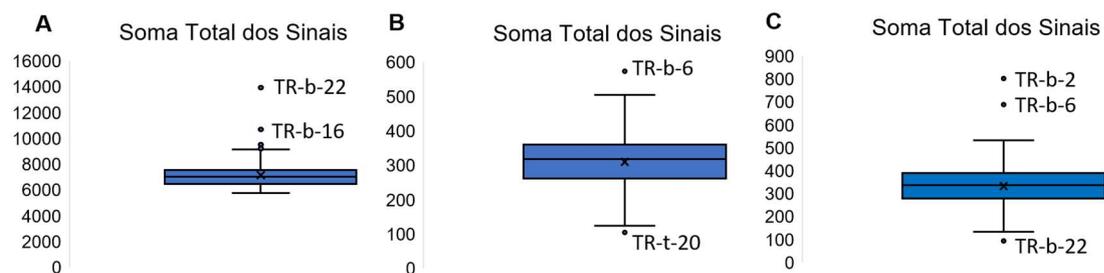
do aminoácido fenilalanina, capaz de ionizar nos dois modos de ionização e que não está presente nas amostras, como padrão interno em todas as amostras de urina analisadas por RPLC-MS no modo positivo e HILIC-MS no modo positivo e negativo. A retenção do padrão interno em RPLC e HILIC foi adequada com tempo de retenção de 5,3 min e 6,1 min, respectivamente. O padrão interno foi avaliado durante as análises e as amostras com sinal muito baixo foram re-injetadas. Para algumas amostras re-injetadas observou-se a presença de microbolhas no *insert*, responsável pela falha na injeção. Após as análises, verificou-se o coeficiente de variação da área do padrão interno de todas as amostras (incluindo QC), obtendo-se valores de 7,0%, 6,9% e 13,6% para RPLC-MS, e HILIC-MS no modo positivo e negativo, respectivamente. Esses valores de coeficiente de variação são um primeiro indicativo de que as amostras foram analisadas com qualidade.

Os dados brutos gerados pela análise das amostras de urina dos pacientes foram pré-processados utilizando o software XCMS<sup>27</sup>, que extrai, alinha e agrupa os *molecular features*. Os *molecular features* que apareceram na maioria dos brancos analisados, e que não tiveram o coeficiente de variação maior que 30% nas amostras de controle de qualidade (após normalização pela mediana para RPLC-MS e por LOESS para HILIC-MS no modo positivo e negativo), foram removidos e a tabela remanescente foi submetida à análise multivariada. Primeiramente, obteve-se o modelo de componentes principais (PCA), utilizando o auto-escalamento para monitorar novamente a estabilidade analítica. Verificou-se a presença de um *outlier* forte nas análises por RPLC-MS e HILIC-MS no modo positivo e dois na análise de HILIC-MS no modo negativo (Figura 29).



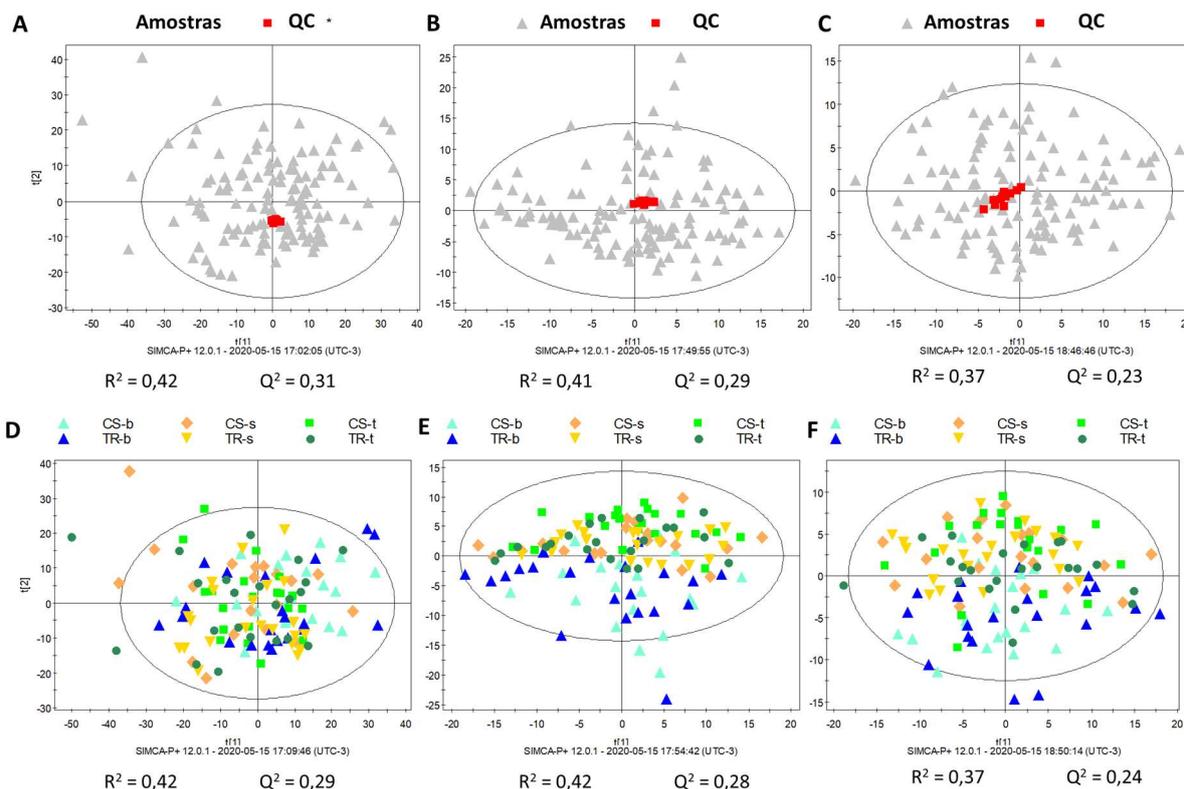
**Figura 29-** Gráfico de escores do modelo de PCA construídos com os dados obtidos pela análise de urina por RPLC-MS (A) e HILIC-MS no modo positivo (B) e negativo (C) na presença de *outliers* fortes indicados na figura pela identificação da amostra com os códigos TR-b-22, TR-b-6 e TR-b-2. (TR-b: indica o grupo de pacientes tratados com ticagrelor e rosuvastatina amostrados no tempo basal, o número após “-“ é o código do paciente).

Os dados foram revisados para encontrar um possível motivo para o comportamento anômalo dessas amostras. A injeção do padrão interno foi verificada e para todas as amostras, o padrão interno foi injetado corretamente. Então, verificou-se a soma de todos os sinais analíticos após a normalização e construiu-se gráficos de box plot dessa soma para cada uma das análises (Figura 30). O gráfico de box plot indica que essas amostras apresentam a soma de todos os sinais muito maior do que nas demais amostras, o que pode explicar o comportamento dessas amostras como anômalo nas análises de PCA.



**Figura 30-** Box plot da soma total dos sinais das análises de urina por RPLC-MS (A) e HILIC-MS no modo positivo (B) e negativo (C). Os outliers estão indicados na figura pela identificação da amostra com os códigos TR-b-22, TR-b-16, TR-b-6, TR-t-20 e TR-b-2. (TR-b: indica o grupo de pacientes tratados com ticagrelor e rosuvastatina amostrados no tempo basal; TR-t: indica o grupo de pacientes tratados com ticagrelor e rosuvastatina após trinta dias de tratamento; o número após “-“ é o código do paciente).

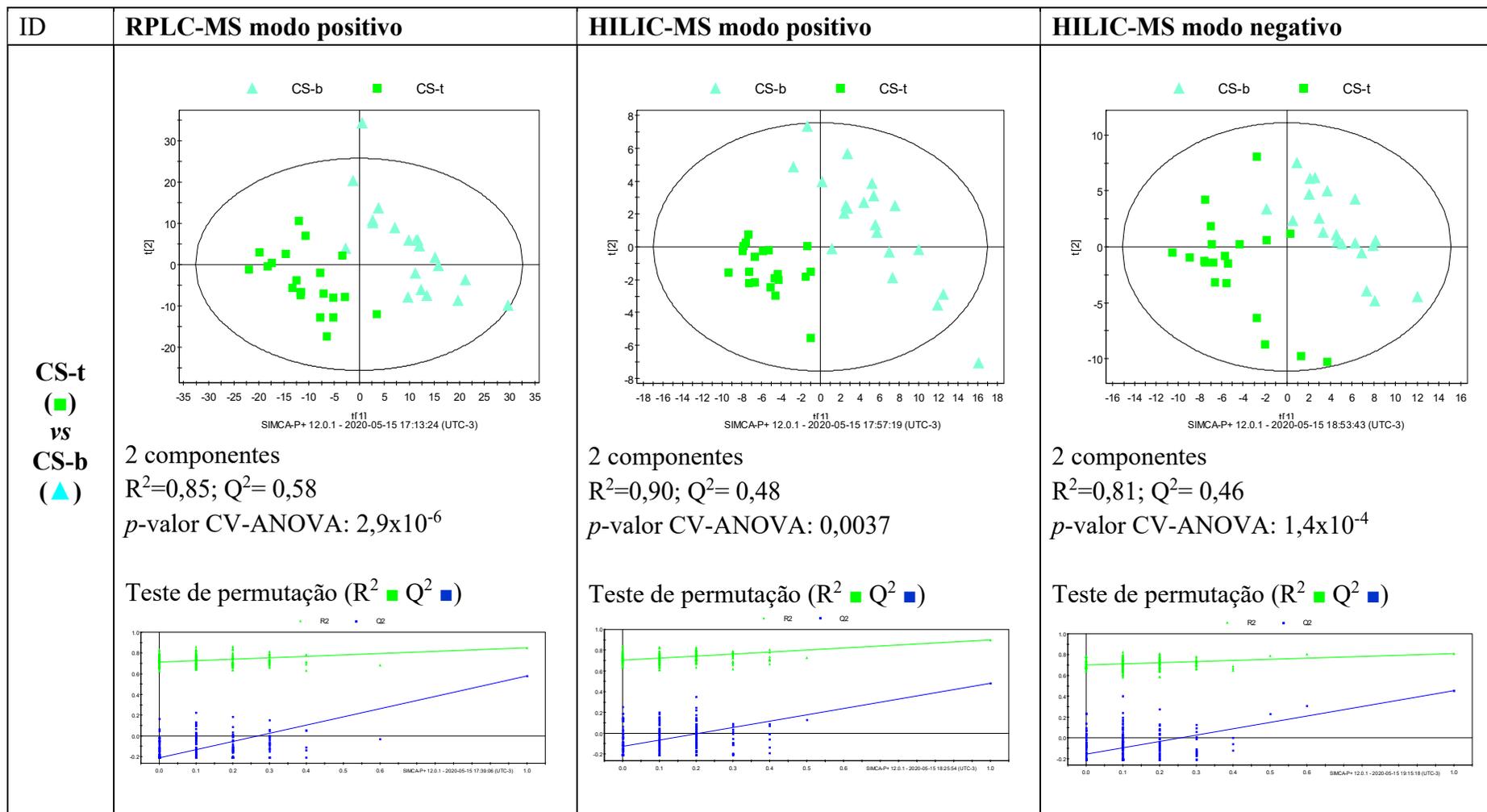
Modelos multivariados podem ser bastante impactados pela presença de *outliers* fortes. A alta variabilidade dos *outliers* fortes pode levar a um agrupamento tendencioso das amostras de QC. Assim, após a remoção dos *outliers* fortes (amostras de código TR-b-22, TR-b-6 e TR-b-2), novos modelos de PCA foram construídos com amostras de QC para verificar a qualidade das análises, e sem amostras de QC, para verificar possíveis tendências nos dados (Figura 31). Nos modelos de PCA com QC, pode-se verificar que as amostras de QC encontram-se agrupadas, demonstrando que a variação analítica é menor do que a variação biológica (Figura 31 A, B e C). Nos modelos de PCA sem as amostras de QC, construídos com os dados de HILIC-MS, pode-se observar uma tendência de separação temporal do tempo basal dos tempos posteriores (trinta dias e seis meses), como pode-se observar nas Figuras 31 E e F. No entanto nenhuma tendência óbvia (separação temporal ou dos tratamentos) se observa no gráfico de escores do modelo de PCA construído com os dados de RPLC-MS.

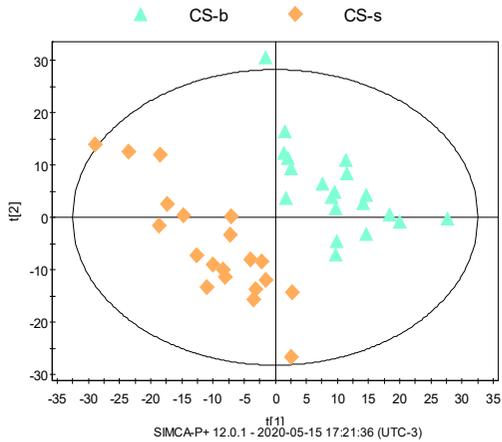
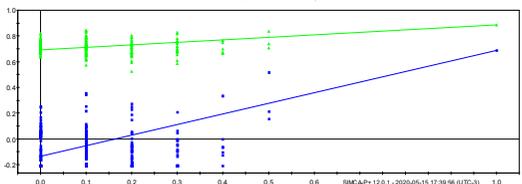
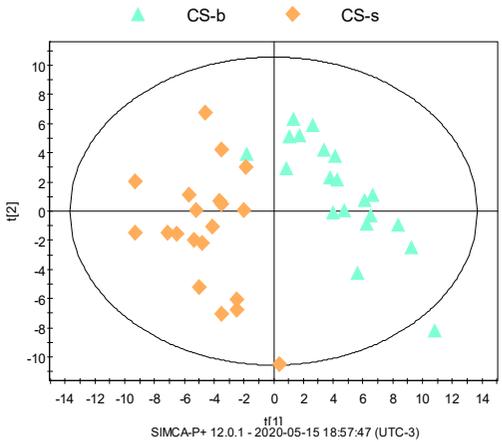
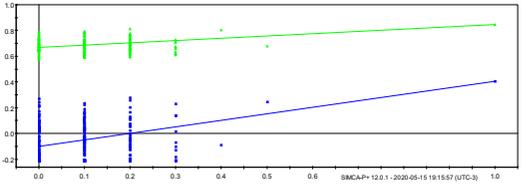


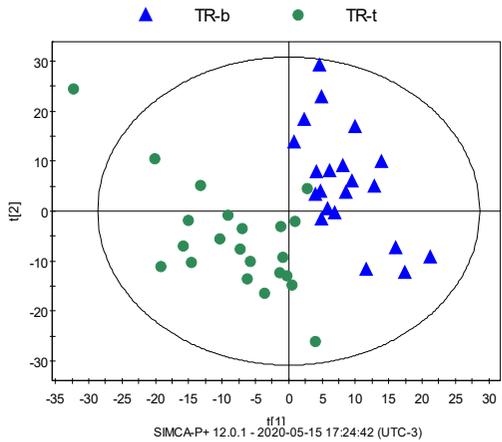
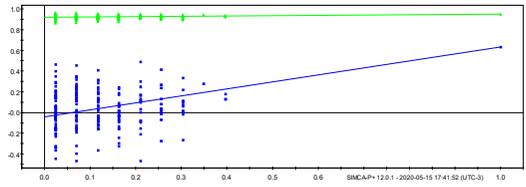
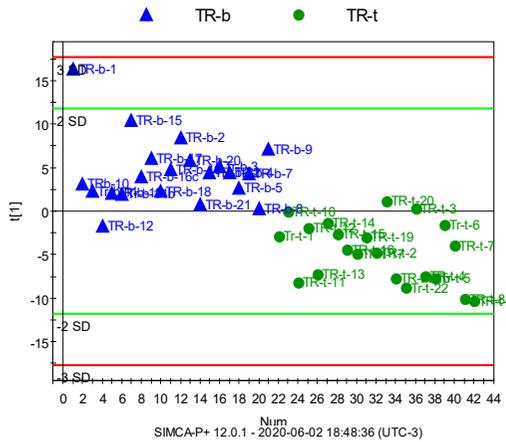
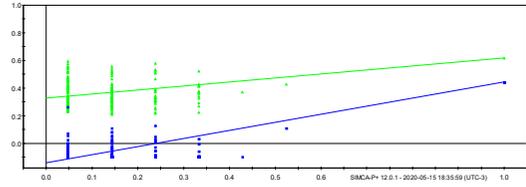
**Figura 31-** Gráfico de escores do modelo de PCA sem *outliers* fortes construídos com os dados obtidos pela análise de amostras de urina dos pacientes por RPLC-MS (A) e HILIC-MS no modo positivo (B) e negativo (C) com amostras de QC (■), e sem amostras de QC, com indicação dos grupos CS-b (▲), CS-t (■), CS-s (◆), TR-b (▲), TR-t (●) e TR-s (▼) dos dados de RPLC-MS (D) e HILIC-MS no modo positivo (E) e negativo (F).

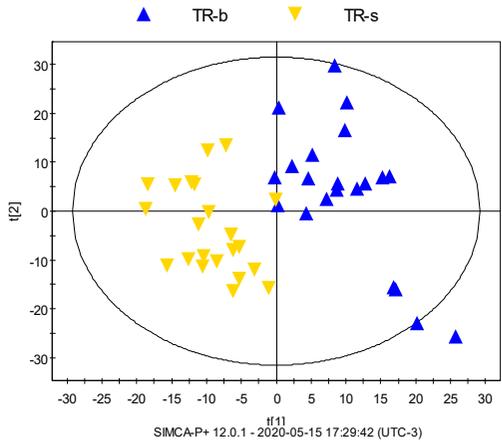
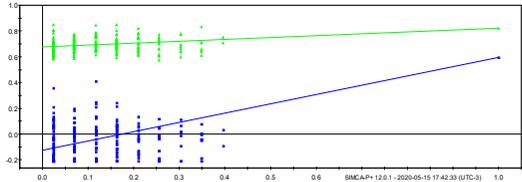
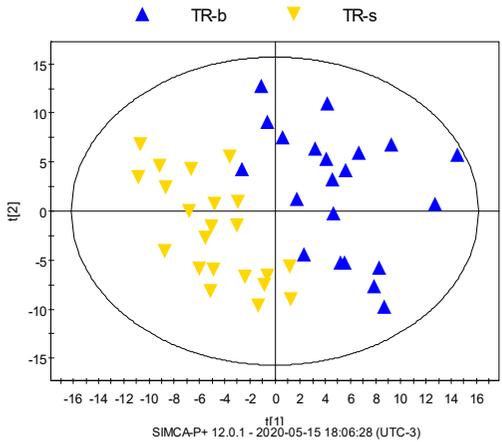
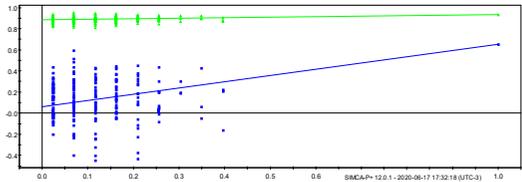
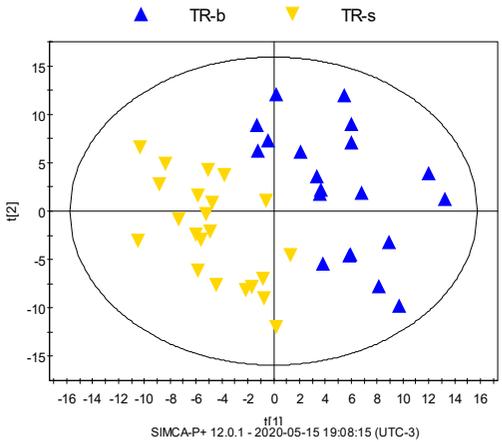
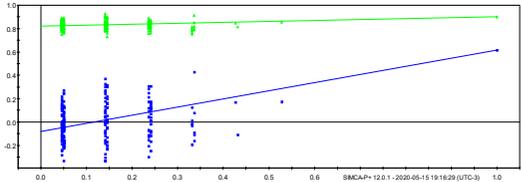
Posteriormente, foram construídos modelos de PLS-DA para as comparações dois a dois, temporais e entre os grupos (com mesmo tempo de tratamento), que foram validados pelo teste de permutação e CV-ANOVA. Os gráficos e parâmetros dos modelos de PLS-DA validados estão na Tabela 9.

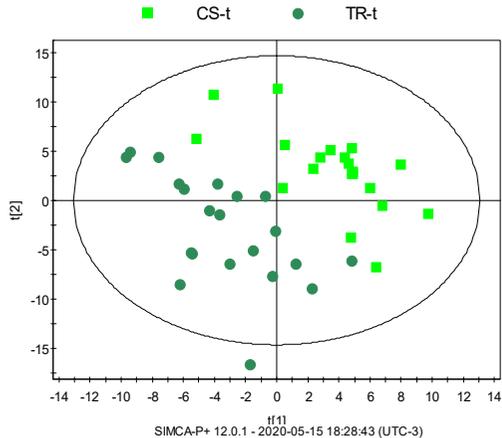
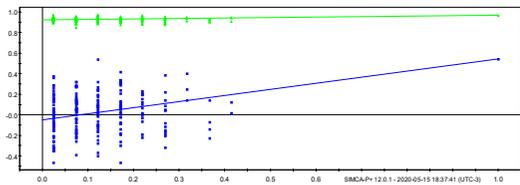
**Tabela 9-** Modelos de PLS-DA de comparações de tratamento e temporais de dados de urina dos pacientes adquiridos por RPLC-MS e HILIC-MS no modo positivo e negativo

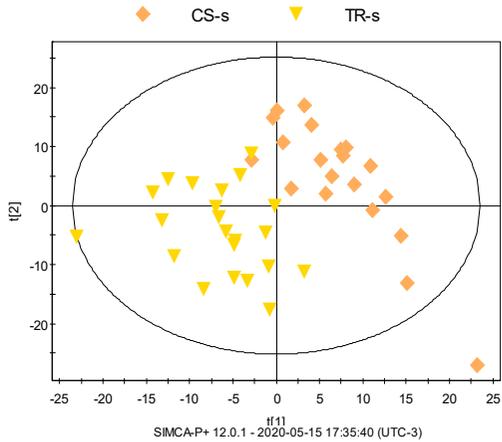
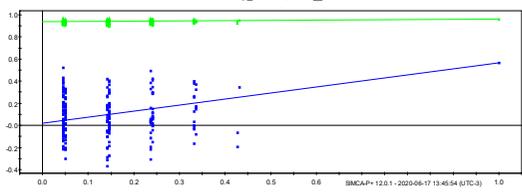


ID	RPLC-MS modo positivo	HILIC-MS modo positivo	HILIC-MS modo negativo
<p>CS-s (◆) vs CS-b (▲)</p>	 <p>2 componentes  <math>R^2=0,89</math>; <math>Q^2=0,69</math>  <math>p</math>-valor CV-ANOVA: <math>1,3 \times 10^{-7}</math></p> <p>Teste de permutação (<math>R^2</math> ■ <math>Q^2</math> ■)</p> 	<p>Não houve separação por PLS-DA  <math>(Q^2 &lt; 0,4)</math></p>	 <p>2 componentes  <math>R^2=0,84</math>; <math>Q^2=0,41</math>  <math>p</math>-valor CV-ANOVA: 0,0016</p> <p>Teste de permutação (<math>R^2</math> ■ <math>Q^2</math> ■)</p> 

ID	RPLC-MS modo positivo	HILIC-MS modo positivo	HILIC-MS modo negativo
<p>TR-t (●) vs TR-b (▲)</p>	 <p>4 componentes  <math>R^2=0,95</math>; <math>Q^2= 0,63</math>  <math>p</math>-valor CV-ANOVA: <math>1,1 \times 10^{-5}</math></p> <p>Teste de permutação (<math>R^2</math> ■ <math>Q^2</math> ■)</p> 	 <p>1 componente  <math>R^2=0,62</math>; <math>Q^2= 0,446</math>  <math>p</math>-valor CV-ANOVA: <math>9,8 \times 10^{-6}</math></p> <p>Teste de permutação (<math>R^2</math> ■ <math>Q^2</math> ■)</p> 	<p>Não houve separação por PLS-DA  <math>(Q^2 &lt; 0,4)</math></p>

ID	RPLC-MS modo positivo	HILIC-MS modo positivo	HILIC-MS modo negativo
<p>TR-s (▼) vs TR-b (▲)</p>	 <p>2 componentes  <math>R^2=0,82</math>; <math>Q^2= 0,60</math>  <math>p</math>-valor CV-ANOVA: <math>1,1 \times 10^{-6}</math></p> <p>Teste de permutação (<math>R^2</math> ■ <math>Q^2</math> ■)</p> 	 <p>4 componentes  <math>R^2=0,93</math>; <math>Q^2= 0,65</math>  <math>p</math>-valor CV-ANOVA: <math>1,7 \times 10^{-6}</math></p> <p>Teste de permutação (<math>R^2</math> ■ <math>Q^2</math> ■)</p> 	 <p>3 componentes  <math>R^2=0,90</math>; <math>Q^2= 0,62</math>  <math>p</math>-valor CV-ANOVA: <math>4,7 \times 10^{-6}</math></p> <p>Teste de permutação (<math>R^2</math> ■ <math>Q^2</math> ■)</p> 

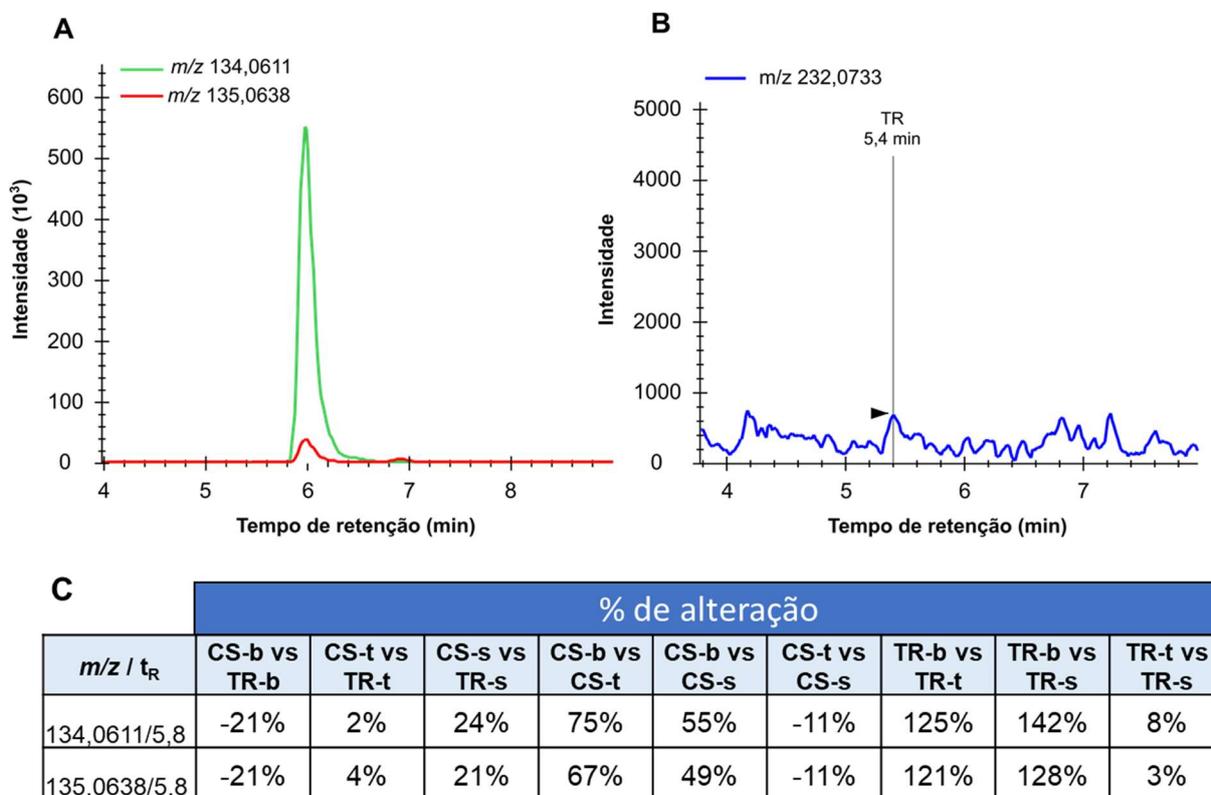
ID	RPLC-MS modo positivo	HILIC-MS modo positivo	HILIC-MS modo negativo
<p>TR-t ● vs CS-t ■</p>	<p>Não houve separação por PLS-DA (<math>Q^2 &lt; 0,4</math>)</p>	 <p>4 componentes <math>R^2=0,97</math>; <math>Q^2=0,54</math> <math>p</math>-valor CV-ANOVA: 0,017</p> <p>Teste de permutação (<math>R^2</math> ■ <math>Q^2</math> ■)</p> 	<p>Não houve separação por PLS-DA (<math>Q^2 &lt; 0,4</math>)</p>

ID	RPLC-MS modo positivo	HILIC-MS modo positivo	HILIC-MS modo negativo
<p>TR-s (▼) vs CS-s (◆)</p>	 <p>4 componentes  <math>R^2=0,96</math>; <math>Q^2= 0,57</math>  <i>p</i>-valor CV-ANOVA: 0,012            Teste de permutação (<math>R^2</math> ■ <math>Q^2</math> ■)</p> 	<p>Não houve separação por PLS-DA  <math>(Q^2 &lt; 0,4)</math></p>	<p>Não houve separação por PLS-DA  <math>(Q^2 &lt; 0,4)</math></p>

Ao contrário do que se observou com as análises de plasma dos pacientes, para os dados obtidos pela análise de urina dos pacientes, observou-se alguns modelos de PLS-DA em que houve separação entre os grupos após 30 dias de tratamento (para o modelo de HILIC-MS modo positivo,  $R^2=0,97$ ;  $Q^2= 0,54$ ), e após 6 meses de tratamento (para o modelo de RPLC-MS,  $R^2=0,96$ ;  $Q^2= 0,57$ ).

Também observou-se que muitas comparações temporais resultaram em modelos com previsibilidade baixa a moderada ( $Q^2$  entre 0,41 e 0,69), que podem ser observados em estudos com humanos em que há maior variabilidade.

A seguir, aplicou-se o teste de ANOVA de medidas repetidas para verificar os *molecular features* significativos. Os *molecular features* significativos foram inspecionados no software Skyline<sup>30</sup> com algumas amostras de cada grupo (inclusive QC), para verificar casos de ruídos, identificados como picos pelo algoritmo do XCMS e presença de picos isotópicos (M+1, M+2, M+3, etc.) pela diferença de massa exata, tempo de retenção, formato de pico e pela similaridade das porcentagens de alteração nas diferentes comparações, como exemplificado na Figura 32.



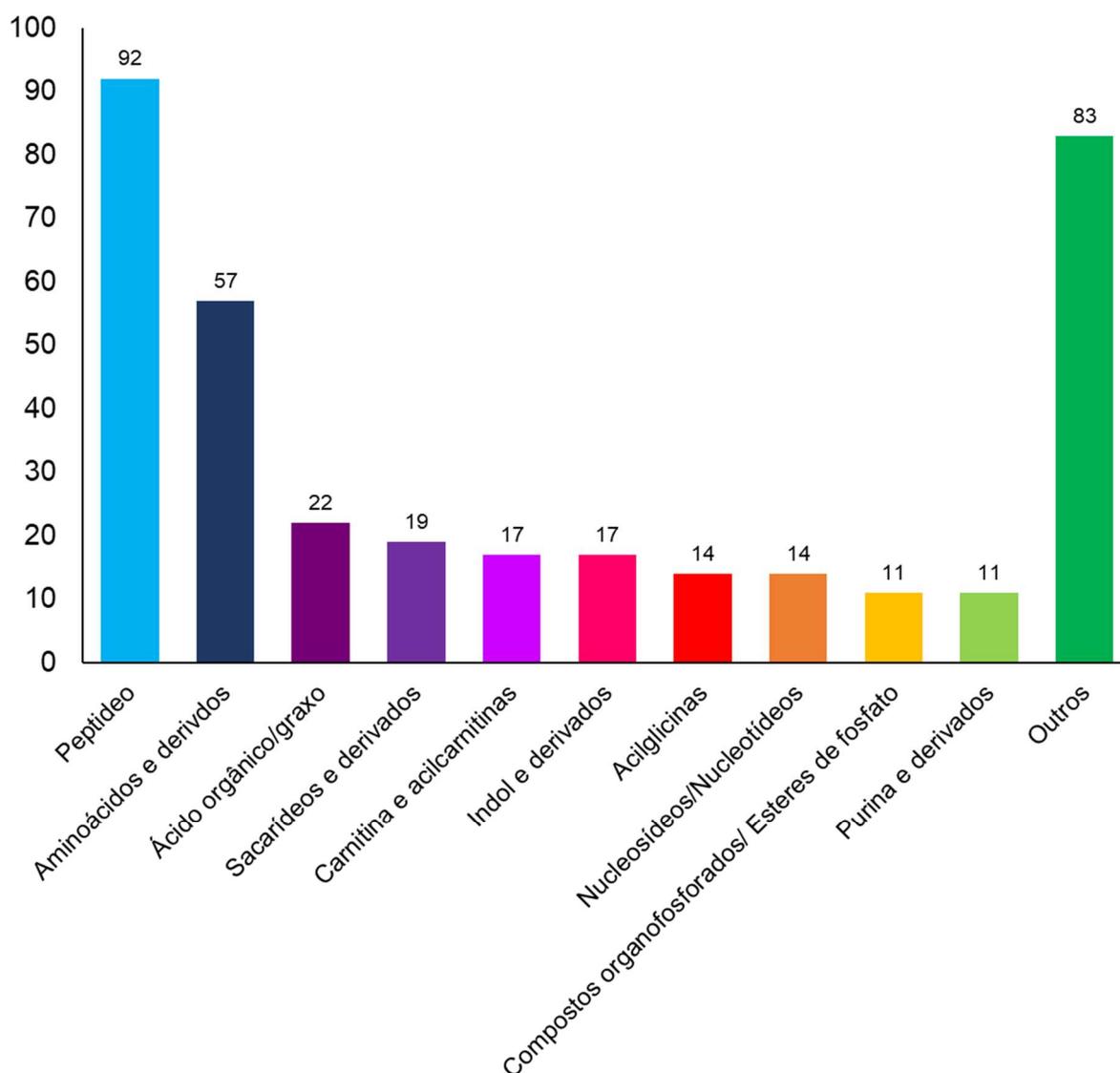
**Figura 32-** Cromatogramas do íon extraído de  $m/z$  134,0611 e  $m/z$  135,0638 sobrepostos (A) e de  $m/z$  232,0733 (B) da análise de urina por HILIC-MS no modo negativo. Porcentagens de alteração calculadas para os *molecular features* de  $m/z$  134,0611 e  $m/z$  135,0638 com tempo de retenção ( $t_R$ ) de 5,8 min para diferentes comparações.

Para os *mf* de  $m/z$  134,0611 e 135,0638 e tempo de retenção 5,8 min, observa-se que possuem formato de pico similar, e uma diferença de  $m/z$  de 1,0027 Da, próxima à diferença de massa observada para um átomo carbono 12 (12,000 Da) e 13 (13,0034 Da) de 1,0034, indicando que o *mf* de  $m/z$  135 é provavelmente um pico isotópico ( $1\text{ C}^{13}$ , M+1) do *mf* de  $m/z$  134. Além disso, as porcentagens de alteração calculadas para as diferentes comparações são muito similares, outro bom indicativo de *mf* relacionados ao mesmo composto, assim manteve-se na lista de *mf* significativos, apenas o *mf* de  $m/z$  134. Esse raciocínio foi aplicado para os *mf* significativos das análises de RPLC-MS, HILIC-MS no modo negativo e positivo, eliminando *mf* que são provavelmente relacionados ao mesmo composto, além de ruídos extraídos como *mf* pelo algoritmo do XCMS.

Após a inspeção dos *mf* significativos, os metabólitos foram identificados putativamente pela comparação de  $m/z$  exato experimental com bancos de dados de metabólitos com um erro permitido de 10 ppm, empregando a plataforma CEU MassMediator<sup>31</sup>, que realiza a consulta em diferentes bancos de dados simultaneamente.

Dessa forma foram identificados putativamente 172, 42 e 42 metabólitos pelas técnicas de RPLC-MS e HILIC-MS no modo positivo e negativo de ionização, respectivamente (**Tabela Suplementar 2 em Apêndices**). Alguns *molecular features* não foram identificados nos bancos de dados, resultando em 205, 51 e 47 *molecular features* denominados como desconhecidos pelas técnicas de RPLC-MS e HILIC-MS no modo positivo e negativo, respectivamente.

Muitas classes de metabólitos foram encontradas alteradas na urina de pacientes tratados com CS e TR empregando três plataformas analíticas complementares (RPLC-MS modo positivo e HILIC-MS modo positivo e negativo), como peptídeos, aminoácidos e derivados, ácidos orgânicos e graxos, sacarídeos e derivados, carnitina e acilcarnitinas, indol e derivados, acilglicinas, nucleosídeos, nucleotídeos, compostos organofosforados, ésteres de fosfato, purina e derivados, entre outros (Figura 33).



**Figura 33-** Classe de compostos identificados putativamente em bancos de dados, encontrados significativamente alterados por análise estatística univariada (ANOVA de medidas repetidas) da análise de amostras de urina de pacientes tratados com CS ou TR pelas técnicas de RPLC-MS (modo positivo) e HILIC-MS (modo positivo e negativo).

### 3 - Discussão biológica

#### 3.1 - Ésteres de colesterol

No plasma, os lipídios, moléculas muito apolares, são transportados principalmente por lipoproteínas, que são compostas por um núcleo contendo ésteres de colesterol e triglicerídeos envoltos por colesterol livre, fosfolipídios e apolipoproteínas<sup>32</sup>. A composição e características das lipoproteínas está descrita abaixo (Tabela 10). Os quilomícrons são responsáveis pelo transporte dos lipídios provenientes da dieta, enquanto que as lipoproteínas de densidade muito

baixa (VLDL, do inglês *very low-density lipoprotein*), de densidade intermediária (IDL, do inglês *intermediate-density lipoprotein*), de baixa densidade (LDL, do inglês *low-density lipoprotein*), de alta densidade (HDL) e a lipoproteína(a) (Lp(a)) transportam lipídios produzidos pelo organismo.

**Tabela 10-** Características de lipoproteínas

<b>Lipoproteína</b>	<b>Densidade (g/ml)</b>	<b>Tamanho (nm)</b>	<b>Lipídios majoritários</b>	<b>Apolipoproteínas majoritárias</b>
<b>Quilomícrons</b>	<0,930	75-1200	TG	Apo B-48, Apo C, Apo E, Apo A-I, A-II, A-IV
<b>Quilomícrons remanescentes</b>	0,930-1,006	30-80	TG/ Colesterol*	Apo B-48, Apo E
<b>VLDL</b>	0,930-1,006	30-80	TG	Apo B-100, Apo E, Apo C
<b>IDL</b>	1,006-1,019	25-35	TG/ Colesterol*	Apo B-100, Apo E, Apo C
<b>LDL</b>	1,019-1,063	18- 25	Colesterol*	Apo B-100
<b>HDL</b>	1,063-1,210	5- 12	Colesterol*/ fosfolipídios	Apo A-I, Apo A-II, Apo C, Apo E
<b>Lp (a)</b>	1,055-1,085	~30	Colesterol*	Apo B-100, Apo (a)

\* Colesterol livre, mas principalmente na forma de éster de colesterol. Tabela adaptada de Feingold *et al.*<sup>32</sup>

As lipoproteínas VLDL, IDL, LDL, Lp(a) e os quilomícrons remanescentes são pró-aterogênicas, enquanto que a HDL é anti-aterogênica. As estatinas atuam na inibição da síntese de colesterol, inibindo a enzima HMG-CoA redutase e reduzem o nível de LDL ricas em colesterol, contribuindo no tratamento da aterosclerose<sup>33</sup>. No soro, o colesterol está majoritariamente esterificado na forma de ésteres de colesterol (75%-80%)<sup>34</sup>. Dessa forma, como esperado, o uso de estatinas diminui os níveis de alguns ésteres de colesterol, sendo que a diminuição utilizando rosuvastatina foi mais acentuada do que com o uso de sinvastatina, com 3 e 6 espécies diferentes de CE significativamente diminuídos para o grupo medicado com rosuvastatina e sinvastatina respectivamente e com uma maior diminuição, com média de redução de -32% e -20% para o grupo TR e CS respectivamente.

**Tabela 11** - Ésteres de colesterol diminuídos no plasma de pacientes que sofreram AMI após trinta dias de tratamento

m/z	tr (min)	Aduto	ppm	Metabólito	ID	% de alteração		
						CS-t vs CS-b	TR-t vs TR-b	Tr-t vs CS-t
669,5580	33,4	M+Na	0	CE(18:3)	MS/MS	-21%	<b>-47%</b>	-30%
685,5309	33,4	M+K	2	CE(18:3)	m/z	<b>-23%</b>	<b>-29%</b>	-12%
735,5474	33,7	M+K	0	CE(22:6)	m/z	<b>-19%</b>	-9%	8%
619,5382	34,0	M+Na	7	CE(14:0)	m/z	-8%	<b>-40%</b>	<b>-36%</b>
645,5573	34,4	M+Na	1	CE(16:1)	m/z	<b>-34%</b>	<b>-40%</b>	-24%
661,5334	34,4	M+K	2	CE(16:1)	m/z	-24%	<b>-31%</b>	-17%
666,6180	34,8	M+NH <sub>4</sub>	1	CE(18:2)	MS/MS	-24%	<b>-39%</b>	-15%
671,5746	34,8	M+Na	1	CE(18:2)	MS/MS	<b>-19%</b>	<b>-25%</b>	-6%
687,5470	34,8	M+K	1	CE(18:2)	m/z	<b>-12%</b>	<b>-14%</b>	1%
739,5625	34,8	M+H+HCOONa	1	CE(20:5)	m/z	-22%	<b>-32%</b>	-10%
692,6336	35,2	M+NH <sub>4</sub>	1	CE(20:3)	MS/MS	-11%	<b>-41%</b>	-23%

\* as porcentagens em negrito representam alterações estatisticamente significativas pela análise univariada dos dados provenientes das análises de amostras de plasma dos pacientes por RPLC-MS no modo positivo. ID: tipo de identificação do metabólito, por experimentos de MS/MS ou pela busca de m/z em bancos de dados.

No estudo populacional prospectivo de Bruneck, os autores encontraram algumas espécies de éster de colesterol associadas a doenças cardiovasculares num período de 10 anos de observação. Uma das espécies de éster de colesterol com maior associação foi o CE(16:1), que foi diminuído pelos dois tratamentos aqui estudados (CS e TR)<sup>35</sup>.

### 3.2 - Metabolismo de glicerolípídios e glicerofosfolípídios

O metabolismo dos glicerolípídios (GL) e glicerofosfolípídios (PL, do inglês *phosphatidyl lipids*) está amplamente interconectado e foi bastante alterado pelos dois tratamentos. A Tabela 12, mostra a alteração das diferentes classes de glicerolípídios e glicerofosfolípídios no plasma de pacientes tratados com CS e TR após 30 dias de tratamento.

**Tabela 12**- GL e PL significativamente alterados por ANOVA de medidas repetidas no plasma de pacientes que sofreram AMI após 30 dias de tratamento

Classe	Clopidogrel + Sinvastatina n sig.(média % de alteração)		Ticagrelor + Rosuvastatina n sig. (média % de alteração)		Identificação
	Diminuição	Aumento	Diminuição	Aumento	
MG	↓ 1 (-40%)		↓ 3 (-53%)		m/z
DG	↓ 10 (-20%)		↓ 19 (-39%)		MS/MS e m/z
TG	↓ 6 (-22%)	↑ 6 (53%)	↓ 9 (-27%)	↑ 5 (33%)	MS/MS e m/z
CDP-DG	↓ 2 (-15%)		↓ 2 (-20%)	↑ 3 (23%)	m/z
PA	↓ 13 (-17%)		↓ 17 (-27%)		m/z
PC	↓ 11 (-15%)	↑ 8 (29%)	↓ 28 (-31%)	↑ 7 (23%)	MS/MS e m/z

PE	↓ 8 (-16%)	↑ 8 (32%)	↓ 22 (-30%)	↑ 9 (34%)	MS/MS e m/z
PG	↓ 13 (-16%)		↓ 16 (-20%)		m/z
PS	↓ 21 (-18%)	↑ 4 (18%)	↓ 28 (-27%)	↑ 6 (30%)	m/z
PI	↓ 16 (-19%)		↓ 23 (-29%)		MS/MS e m/z
LPC		↑ 5 (35%)		↑ 1 (19%)	MS/MS e m/z
LPE		↑ 2 (38%)			m/z

n sig: número de lipídios da classe significativamente alterados pelo tratamento após um mês. No caso de duplicidade de uma identificação para o mesmo lipídio, apenas um *molecular feature* foi considerado para o cálculo do n e da média da porcentagem de alteração. No caso de um *molecular feature* apresentar mais de uma identificação para a mesma classe de lipídio, uma das identificações foi desconsiderada no cálculo do n e da média da porcentagem de alteração. DG: diacilglicerol. PA: ácido fosfatídico. PC: fosfatidilcolina. PE: fosfatidiletalamina. PG: lisofosfatidilglicerol. PI: fosfatidilinositol. PS: fosfatidilserina.. L: forma liso dos glicerofosfolipídios.

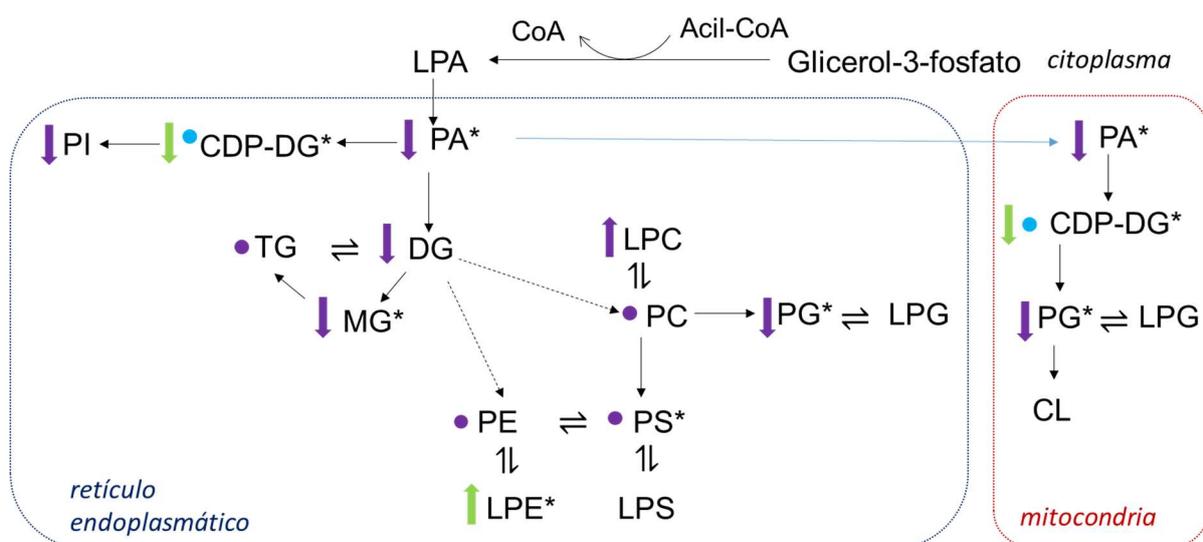
A maioria dos glicerolipídios e glicerofosfolipídios diminuíram após os dois tratamentos, exceto no caso de alguns lisofosfolipídios (LPC e LPE), e para algumas classes de lipídios, em que observou-se uma tendência de diminuição para alguns compostos da classe e aumento para outros (TG, PC, PE, PS), como pode ser observado na Tabela 12. O efeito de diminuição dos GL e PL foi maior para o tratamento de rosuvastatina e ticagrelor, com uma maior média da porcentagem de alteração para as diferentes classes (CS: média de -27,3% para GL e -16,6% para PL/ TR: média de -39,7% para GL e -26,3% para PL), além de apresentar um maior número de lipídios das diferentes classes significativamente alterados (CS: 17 GL↓ e 84 PL↓; TR: 31 GL↓ e 136 PL↓).

Em mamíferos, os triacilgliceróis (TGs) são produzidos no retículo endoplasmático e na mitocôndria e então são armazenados para uso intracelular em gotículas de lipídios (compostas principalmente de colesterol e TG), ou em lipoproteínas para secreção. O papel principal dos TGs é o armazenamento e liberação de ácido graxo para produção de energia via oxidação dos ácidos graxos<sup>36</sup>. A liberação de ácido graxo por TG pode ocasionar também na produção de monoacilglicerol (MG) e diacilglicerol (DG). Em pacientes com significativa hipertrigliceridemia, os níveis de TG na forma de VLDL podem ser reduzidos em 35-45% com o uso de estatinas<sup>37</sup>. Assim, já esperava-se que os pacientes apresentassem redução nos níveis de alguns TGs como ocorreu nesse estudo.

No estudo Bruneck, TGs com baixo número de carbonos e ligações duplas foram associados com maior risco de doenças cardiovasculares<sup>35</sup>. No presente estudo as espécies de TG que apresentaram aumento apresentam no mínimo 5 insaturações (5 a 14 insaturações), enquanto há resultados conflitantes de espécies de TG diminuídas (com 0 a 14 insaturações). A identificação da maior parte dos TGs encontrados nesse estudo foi feita pela identificação

putativa por *m/z* exato, assim para uma melhor interpretação dos resultados obtidos a composição dos TGs por MS/MS deve ser realizada.

Os glicerofosfolipídios são componentes da membrana celular e sua síntese se inicia a partir da conversão de glicerol-3-fosfato em ácido lisofosfatídico (LPA, do inglês *lysophosphatidic acid*), que é convertido em ácido fosfatídico (PA, do inglês *phosphatidic acid*). A maioria dos glicerolipídios é sintetizado no retículo endoplasmático. O PA pode gerar espécies de diacilglicerol (DG) e citidina-difosfato-diacilglicerol (CDP-DG), que por sua vez podem ser convertidos nas demais espécies de glicerolipídios, como triacilglicerol (TG), monoacilglicerol (MG), fosfatidilcolina (PC), fosfatidilinositol (PI), fosfatidiletaloamina (PE) e fosfatidilglicerol (PG, do inglês *phosphatidylglycerol*). A PC pode ser convertida em fosfatidilserina (PS, do inglês *phosphatidylserine*) ou PG e a PE também pode gerar espécies de PS. O PG pode ainda ser convertido em cardiolípinas (CL) (Figura 34). As cadeias acil dos glicerofosfolipídios são remodeladas no ciclo de Land pela ação das fosfolipases, acil-CoA sintases, transacilases e lisofosfolipídio aciltransferases.



**Figura 34-** Metabolismo dos fosfolipídios, adaptado do *Reactome* para humanos<sup>38</sup>. As setas para cima representam o aumento da classe do lipídio no plasma dos pacientes após 30 dias de tratamento, enquanto as setas para baixo representam a diminuição. O círculo representa que alguns lipídios da classe aumentaram, enquanto que outros diminuíram. A cor roxa representa que a alteração foi observada com os dois tratamentos, a azul representa a alteração no tratamento com TR e a verde no tratamento com CS.\* Apenas identificação putativa por *m/z* para essa classe. CDP-DG: citidina-difosfato-diacilglicerol. CL: cardiolípinas. DG: diacilglicerol. PA: ácido fosfatídico. PC: fosfatidilcolina. PE: fosfatidiletaloamina. PG: fosfatidilglicerol. PI: fosfatidilinositol. PS: fosfatidilserina.. L: forma liso dos glicerofosfolipídios.

Em mamíferos, diferentes células, organelas e membranas possuem diferentes composições de glicerofosfolipídios que são importantes para diversas funções celulares, como transdução de sinais e fluidez de membrana<sup>39</sup>.

As PCs são os fosfolipídios mais abundantes e possuem um papel essencial na secreção hepática de VLDL, contribuindo na distribuição de colesterol e outros lipídios, a órgãos e tecidos. Além disso, contribuem na absorção de lipídios no lúmen intestinal. A segunda classe de glicerofosfolipídios mais abundantes são as PEs, que representam cerca de 20-30% dos lipídios da membrana celular. Na mitocôndria, as PEs são importantes em processos de crescimento e estabilidade<sup>40</sup>.

As PSs constituem cerca de 5-10% das membranas celulares e são encontradas majoritariamente na sua parte interior. No entanto, quando localizadas no folheto externo da membrana possuem atividades importantes em sinalização celular em processos como coagulação e apoptose pelo estímulo da proteína quinase C. As PI também estão relacionadas a diversos mecanismos de sinalização celular<sup>40</sup>.

Na revisão bibliográfica do emprego de lipidômica no estudo de doenças cardiovasculares, diversos estudos com grande número de pacientes encontraram associação positiva de fosfatidilcolinas com cadeias acil graxas saturadas ou monossaturadas com risco de desfechos cardiovasculares, enquanto as PC com cadeias acil poliinsaturadas tiveram efeito contrário<sup>41</sup>. Nesse estudo, todas fosfatidilcolinas saturadas ou monossaturadas significativamente alteradas pelos tratamentos (CS e TR) foram encontradas diminuídas, indicando um efeito protetor dos tratamentos nos pacientes. Entretanto, para fosfatidilcolinas poliinsaturadas observou-se algumas com tendência de aumento e outras de diminuição após 30 dias de tratamento.

No estudo LURIC (*Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health*) a PC(32:0) foi o glicerofosfolipídio que teve maior associação com mortalidade do estudo. No presente estudo, essa espécie foi encontrada diminuída pelos dois tratamentos (CS e TR), sendo a identificação da mesma feita por MS/MS. Além disso, a PC(32:1) também associada a um maior risco de mortalidade no estudo LURIC, também foi diminuída pelos tratamentos com estatinas e anti-coagulantes (TR e CS)<sup>42</sup>.

O tratamento de clopidogrel e simvastatina provocaram o aumento de cinco espécies de LPC, enquanto que o tratamento de ticagrelor e rosuvastatina aumentou o nível apenas de uma espécie de LPC. As LPC são provenientes especialmente da atividade das fosfolipases

(A1/A2), da lipase endotelial e da leticina-colesterol aciltransferase<sup>42</sup>. As fosfolipases A1 e A2 quebram a ligação éster na posição sn-1 ou sn-2 das fosfatidilcolinas, gerando uma espécie de LPC e uma de ácido graxo. A atividade de algumas fosfolipases A<sub>2</sub> e espécies de LPC são associadas a processos ateroscleróticos e inflamatórios<sup>43,44,45</sup>. O estudo de Alshehry *et al.* associa espécies de LPC de cadeia alquil com ligação do tipo éter a eventos cardiovasculares em diabetes do tipo 2<sup>46</sup>.

No entanto, estudos de lipidômica recentes associam o aumento de algumas espécies de LPC a um efeito protetor em doenças cardiovasculares<sup>42,35,47</sup>. A revisão bibliográfica feita por Ding *et al.* cita que as lisofosfatidilcolinas LPC(16:0), LPC(18:0), LPC(18:1), LPC(18:2), e LPC (20:4) mostraram uma associação negativa com eventos cardiovasculares em três estudos de lipidômica diferentes<sup>41</sup>. Os dois tratamentos aqui estudados promoveram a diminuição da LPC(18:1), identificada por MS/MS. Além disso, o tratamento com clopidogrel e sinvastatina também diminuiu os níveis de LPC(18:0). No trabalho de Ward-Caviness *et al.*, os autores sugerem que baixos níveis de LPC podem contribuir para o aumento o estresse oxidativo e promover inflamação, e ainda podem estar associados a disfunção endotelial<sup>48</sup>.

Assim, mais estudos devem ser realizados com a identificação e quantificação de glicerolipídios específicos com a determinação da composição das cadeias de ácidos graxos para compreender melhor seu papel na aterosclerose.

### 3.3 - Ácido araquidônico

Dentre os fosfolipídios identificados por MS/MS que apresentaram uma elevação após o tratamento, a maioria apresenta em sua composição o ácido araquidônico (C20:4). Essa análise só foi realizada com os lipídios identificados por MS/MS, devido a identificação dos ácidos graxos que compõem os fosfolipídios ser essencial para essa análise. Enzimas da família fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>, do inglês *phospholypase A2*) são responsáveis pela quebra de fosfolipídios de membranas de bicamada de células ou de lipoproteínas, liberando os ácidos graxos e/ou lisofosfolipídios. Diferentes tipos de PLA<sub>2</sub> tem maior afinidade por diferentes fosfolipídios.

O ácido araquidônico é produzido pela quebra de lipídios da membrana celular pela atividade de uma enzima da família PLA<sub>2</sub>. O ácido araquidônico liberado é instável, e rapidamente convertido em lipídios inflamatórios<sup>49</sup>. O aumento de fosfolipídios com ácido araquidônico em sua composição pode indicar uma menor atividade de enzimas PLA<sub>2</sub> com

afinidade para ácido araquidônico, indicando um efeito protetor dos tratamentos estudados, porém mais estudos devem ser realizados para se chegar a conclusão definitiva.

No estudo de Krauss e colaboradores, os autores verificaram um aumento de lipídios de diferentes classes contendo cadeias de ácido araquidônico com o uso de sinvastatina. Os pacientes associados a boa resposta terapêutica em relação à redução dos níveis de lipoproteínas de baixa densidade ricas em colesterol, apresentaram um aumento ainda mais pronunciado de lipídios contendo ácido araquidônico<sup>49</sup>.

O grupo de pacientes utilizando rosuvastatina e ticagrelor tiveram um aumento mais pronunciado e com mais metabólitos significativos do que os pacientes que tomaram sinvastatina e clopidogrel (CS: 2 PL com média de aumento de 18,4% ; TR: 5 PL com média de aumento de 36,3%), como pode ser visto na Tabela 13.

**Tabela 13-** Alterações do nível plasmático de PL contendo ácido araquidônico na composição após 30 dias de tratamento

<i>m/z</i> / <i>tr</i>	Metabólito	Classe	% de alteração		
			CS-b x CS-t	TR-b x TR-t	CS-t x TR-t
764,5261/ 18,9	PE(38:5)/PE(18:1- <b>20:4</b> )	PE	-5%	<b>33%</b>	28%
722,5112/ 19,8	PE(O-36:5)/PE(O-16:1- <b>20:4</b> )	PE	<b>41%</b>	<b>59%</b>	22%
750,5426/ 22,2	PE(O-38:5)/PE(O-18:1- <b>20:4</b> )	PE	25%	<b>50%</b>	<b>37%</b>
826,5608/ 18,0	PC(36:4)/ PC(16:0- <b>20:4</b> )	PC	3%	<b>22%</b>	<b>15%</b>
852,5744/ 18,9	PC(38:5)/ PC(18:1- <b>20:4</b> )	PC	6%	<b>15%</b>	4%
854,5935/ 20,9	PC(38:4)/ PC(18:0- <b>20:4</b> )	PC	<b>17%</b>	<b>39%</b>	<b>27%</b>

As porcentagens de alteração em negrito são significativas pela estatística univariada ( $p < 0,05$ ). A cadeia do ácido araquidônico está destacada. *tr*: tempo de retenção.

A aterosclerose é uma doença associada a dislipidemia, mas também a processos inflamatórios. No estudo de Kleemann *et al.* o uso de rosuvastatina reduziu o processo de aterosclerose independentemente da redução de níveis de colesterol em modelos de camundongos APOE\*3-Leiden transgênicos<sup>50</sup>. Os autores atribuem essa melhora à atividade anti-inflamatória da rosuvastatina reduzindo a expressão de citocinas pró-aterogênicas MCP-1 e TNF- $\alpha$ , além de marcadores gerais de inflamação no sangue (amilóide sérico A e fibrinogênio). As citocinas estão relacionadas com o aumento da atividade de PLA<sub>2</sub>, que gera um aumento de ácido araquidônico livre, além da atividade de esfingomielinases neutras e ácidas. O aumento das concentrações de lipídios com ácido araquidônico na composição corroboram esse mecanismo de ação anti-inflamatória da rosuvastatina.

Na revisão bibliográfica de estudos de lipidômica realizada por Ding e Rexrode, três estudos populacionais (LURIC, ADVANCE e LIPID) mostraram espécies de PCs contendo ácido araquidônico inversamente associadas a eventos cardiovasculares, após ajuste da análise pelos níveis de HDL-c e LDL-c<sup>41</sup>.

### 3.4 - Metabolismo de esfingolipídios

Após um mês de tratamento com os dois tratamentos estudados, observou-se uma alteração significativa no metabolismo dos esfingolipídios, como a alteração nos níveis plasmáticos de ceramidas (Cer), esfingomielinas (SM), ceramidas monoglicosiladas (Hex-Cer) e ceramidas fosfatadas (CerP) (Tabela 14).

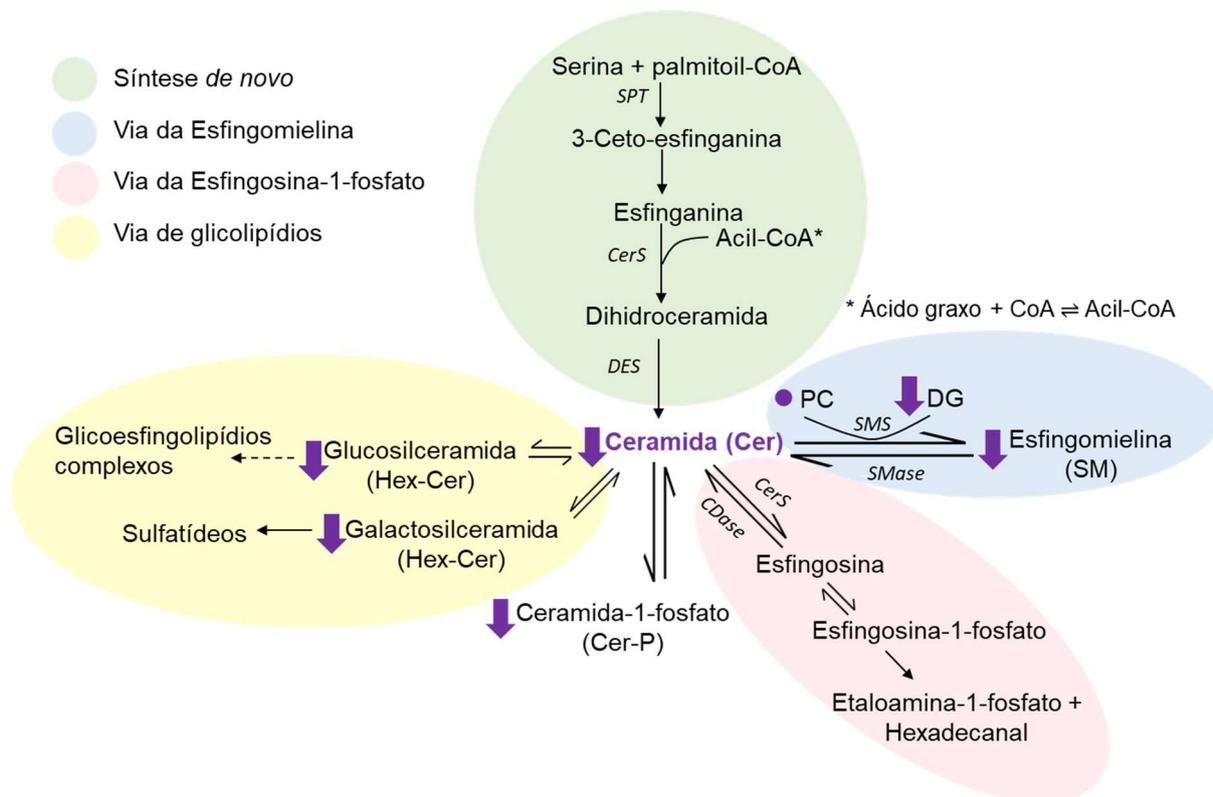
**Tabela 14-** Esfingolipídios alterados no plasma de pacientes de AMI após 30 dias de tratamento

Classe	<b>Clopidogrel + Sinvastatina</b> n sig.(média % de alteração)	<b>Ticagrelor + Rosuvastatina</b> n sig. (média % de alteração)	Identificação
Cer	↓ 9 (-24%)	↓ 12 (-30%)	MS/MS e <i>m/z</i>
SM	↓ 14 (-20%)	↓ 18 (-26%)	MS/MS e <i>m/z</i>
Hex-Cer	↓ 14 (-21%)	↓ 19 (-31%)	MS/MS e <i>m/z</i>
Cer-P	↓ 1 (-21%)	↓ 2 (-19%)	<i>m/z</i>

n sig: número de lipídios da classe significativamente alterados pelo tratamento após um mês. No caso de duplicidade de uma identificação para o mesmo lipídio, apenas um *molecular feature* foi considerado para o cálculo do n e da média da porcentagem de alteração. No caso de um *molecular feature* apresentar mais de uma identificação para a classe de lipídio, uma das identificações foi desconsiderada no cálculo do n e da média da porcentagem de alteração.

O metabolismo dos esfingolipídios é complexo e muito interconectado, e as ceramidas possuem um papel central no metabolismo desse tipo de lipídio (Figura 35). As ceramidas podem ser sintetizadas a partir de serina e palmioil-CoA na síntese *de novo*, pela hidrólise de esfingomielinas e ceramidas glicosiladas, a partir de ceramidas fosfatadas e da esfingosina<sup>51,52</sup>.

Esfingolipídios são componentes essenciais em membranas celulares e participam da regulação de muitos processos celulares importantes, como na organização de microdomínios de membrana, na modulação alostérica de proteínas de membrana, nas interações célula-célula, em processos de diferenciação, proliferação, inflamação e apoptose<sup>53</sup>.



**Figura 35-** Metabolismo dos esfingolípídios. Adaptado de Falluel-Morel *et al.* e Merscher e Fornoni<sup>51,52</sup>. As setas em roxo representam a diminuição de lipídios da classe nos dois tratamentos e o círculo representa que alguns lipídios dessa classe aumentaram, enquanto outros diminuiram nos dois tratamentos. SPT: serina palmitoiltransferase; CerS:ceramida sintase. DES: dihidroceramida desaturase. SMS: esfingomielina sintase. Smase: esfingomielinase. CDase: ceramidase.

Os esfingolípídios participam da regulação pós-transcricional das proteínas de ligação ao elemento regulador do esteroide (SREBPs, do inglês *sterol-regulatory element-binding proteins*), que regulam a transcrição de enzimas chave que sintetizam colesterol, fosfolípídios e ácidos graxos. Esse mecanismo ainda não está bem estabelecido na literatura, porém indica um papel importante dos esfingolípídios na regulação do metabolismo dos lipídios<sup>54</sup>. No presente estudo observou-se uma alteração não apenas nos níveis de esfingolípídios, mas também nos níveis de fosfolípídios, ácidos graxos e de colesterol na forma de ésteres de colesterol, corroborando a importância dos esfingolípídios na regulação do metabolismo dos lipídios.

Estudos recentes apontam que esses lipídios são importantes moléculas sinalizadoras intracelulares e intercelulares relacionadas a processos de doenças inflamatórias e cardiovasculares. Em doenças cardiovasculares, as ceramidas são encontradas em placas ateroscleróticas, onde são importantes em processos inflamatórios e apoptóticos<sup>55</sup>. Partículas de LDL agregadas de lesões ateroscleróticas possuem uma concentração 10-50 vezes maior de ceramidas do que partículas de LDL plasmáticas, indicando um papel importante das ceramidas

no processo de aterosclerose<sup>56</sup>. Ding e Rexrode sugerem que as ceramidas participam da disfunção e agregação de partículas de LDL em lesões ateroscleróticas<sup>41</sup>. Além disso, as ceramidas são biomoléculas com propriedades pró-inflamatórias, um processo também associado a aterosclerose<sup>53</sup>.

Vários estudos associam níveis altos de ceramidas com diabetes<sup>57</sup> e doenças cardiovasculares, como biomarcador de eventos cardiovasculares graves<sup>58,59,41</sup>, ou de ruptura de placas ateroscleróticas<sup>60</sup>.

No presente estudo, várias espécies de ceramidas com diferentes tamanhos de cadeia diminuíram com os tratamentos, inclusive as ceramidas utilizadas para cálculo do risco de morte por eventos cardiovasculares: Cer(d18:1/18:0), Cer(d18:1/16:0) e Cer(18:1/24:1)<sup>59</sup>. Nesse estudo, os autores utilizam a razão das ceramidas citadas acima, pela Cer(18:1/24:0), para o cálculo desse risco. Apesar dos tratamentos com rosuvastatina e ticagrelor e sinvastatina clopidogrel diminuírem as ceramidas substituídas com 18:0, 16:0 e 24:1, a razão dessas ceramidas pela Cer(18:1/24:0) não foi diminuída com os tratamentos ( $p > 0.05$ ), devido a diminuição da ceramida Cer(18:1/24:0) concomitantemente com os níveis das demais ceramidas.

Após 30 dias de tratamento, a combinação de rosuvastatina e ticagrelor resultou em mais esfingolípídios, de todas as classes (Cer, SM, CerP, Hex-Cer) diminuídos do que o tratamento com sinvastatina e clopidogrel (CS: 38 esfingolípídios ↓, TR: 51 esfingolípídios ↓). Alguns estudos associam o uso de sinvastatina<sup>61</sup> e rosuvastatina<sup>62</sup> à redução de ceramidas no plasma, então esse efeito pode ser devido ao uso das estatinas, sendo observado um efeito mais acentuado da rosuvastatina sobre a sinvastatina.

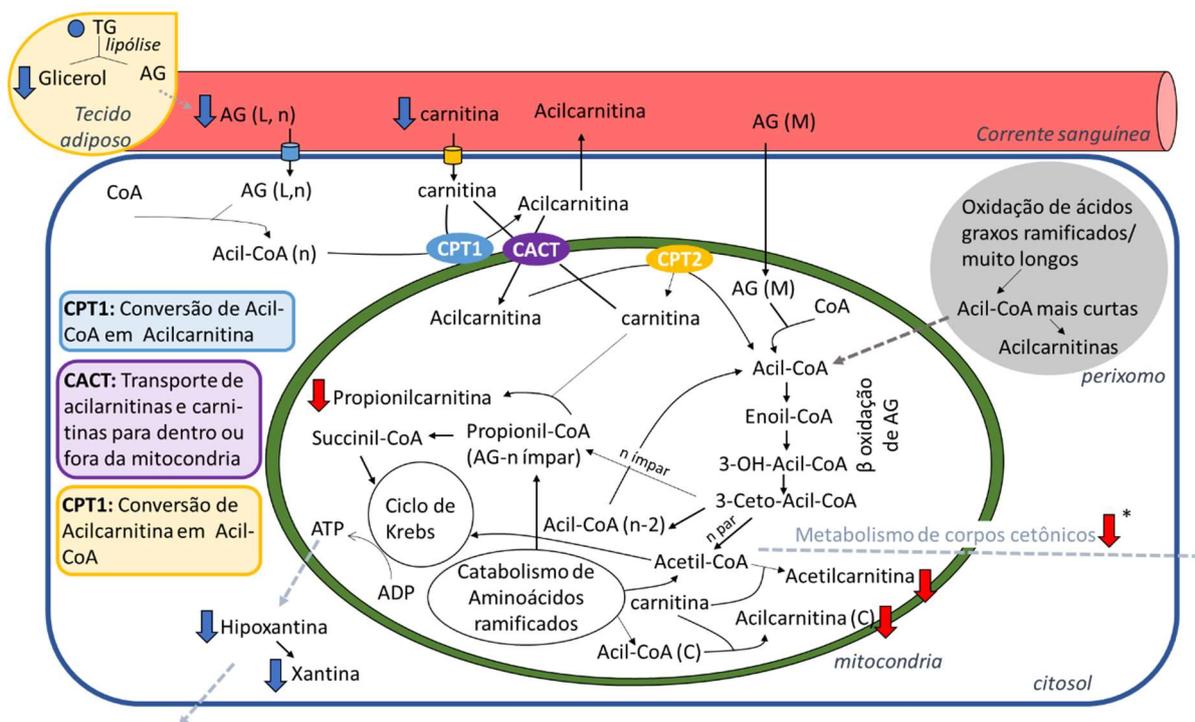
### **3.5 - Metabolismo de ácidos graxos, acilcarnitinas e aminoácidos ramificados**

Observou-se diminuição nos níveis plasmáticos de carnitina nos dois grupos após 30 dias de tratamento. Os níveis plasmáticos de algumas acilcarnitinas de cadeia curta foram também diminuídas no plasma dos pacientes tratados com clopidogrel e sinvastatina. Já na urina dos pacientes, observou-se uma queda mais acentuada de carnitina, além da queda acentuada a moderada de acilcarnitinas de cadeia curta, algumas hidroxiladas, além de uma acilcarnitina de cadeia média, principalmente no grupo tomando sinvastatina e clopidogrel. No grupo de pacientes sob uso de rosuvastatina e ticagrelor, observou-se também o aumento de uma acilcarnitina de cadeia média (C9) na urina e aumento de isobutirilcarnitina (C4, cadeia curta) no plasma.

Na literatura, encontram-se trabalhos que associam altos níveis de acilcarnitinas de cadeia curta a riscos de doenças cardiovasculares<sup>63,64</sup>. Também foi reportado aumento nos níveis de carnitina e acilcarnitinas de cadeia curta e média em pacientes que sofreram infarto do miocárdio<sup>65</sup>.

A maior parte da carnitina do nosso organismo é proveniente da dieta, mas também pode ser sintetizada no fígado, rins e no cérebro em menores quantidades a partir de proteínas com resíduos de lisina. Nos miócitos, a concentração de carnitina é cerca de 20-50 vezes maior do que a concentração plasmática, devido ao uso de ácidos graxos como a principal fonte de energia do miocárdio, pela beta oxidação de ácidos graxos na mitocôndria, dependente de carnitina para o transporte dos ácidos graxos ao interior da mitocôndria. Khan *et al.* sugerem que o infarto do miocárdio induz a perda de carnitina livre do miocárdio, que é mantida no miocárdio por um carregador específico de carnitina, além de uma impermeabilidade relativa da membrana para a carnitina<sup>65</sup>. Defeitos nesse sistema podem aumentar o fluxo de carnitina do miocárdio para a corrente sanguínea. Além disso, o estresse provocado pelo infarto pode aumentar a liberação da carnitina pelo músculo.

O metabolismo da carnitina e acilcarnitinas é complexo e está sintetizado de maneira simplificada na Figura 36. A principal função da carnitina é o transporte de ácidos graxos de cadeia longa para o interior da mitocôndria para o processo de  $\beta$ -oxidação para geração de energia. No citosol, os ácidos graxos são transformados em acil-CoA. Então, pela ação da carnitina palmitoil transferase 1 (CPT1) são convertidos nas respectivas acilcarnitinas. As acilcarnitinas podem então entrar na mitocôndria pela ação da carnitina-acilcarnitina translocase (CACT). No interior da mitocôndria as acilcarnitinas são novamente transformadas em acil-CoA, que sofrem o processo de  $\beta$ -oxidação, gerando acetil-CoA para ácidos graxos de cadeia par ou propanoil-CoA para ácidos graxos de cadeia ímpar, além de outro acil-CoA com dois carbonos a menos, que entra novamente no ciclo da  $\beta$ -oxidação. O acetil-CoA pode entrar no ciclo de Krebs para produção de ATP, pode ser convertido em corpos cetônicos, ou ainda em acetilcarnitina. Observou-se nos dois grupos diminuição dos níveis plasmáticos do corpo cetônico ácido 3-hidroxibutírico, sendo que a diminuição foi significativa apenas no grupo tratado com clopidogrel e sinvastatina. O propionil-CoA pode ser convertido em succinil-CoA e também entrar no ciclo de Krebs para produção energética.



**Figura 36-** Metabolismo simplificado de acilcarnitinas. n: número de carbonos da cadeia proveniente do ácido graxo; AG: ácido graxo livre; L: cadeia longa; M: cadeia média; C: cadeia curta; CoA: coenzima A; Seta vermelha para baixo: diminuição com Clopidogrel+Sinvastatina; Seta azul para baixo: diminuição nos dois tratamentos. Círculo azul: Alguns compostos da classe com tendência de aumento e outros com tendência de diminuição nos dois tratamentos. \* diminuição dos níveis do corpo cetônico ácido 3-hidroxibutírico.

O catabolismo de aminoácidos ramificados também produzem acetil-CoA e propionil-CoA, além de outras acil-CoA de cadeia curta. As acil-CoA podem ser convertidos em acilcarnitinas pela ação da carnitina acetiltransferase ou carnitina octanoiltransferase. Em casos em que há excesso de acil-CoA na mitocôndria, pode haver conversão dos mesmos em acilcarnitinas, que podem sair da mitocôndria, mantendo a homeostase da razão acil-CoA/CoA na organela. O desequilíbrio de acil-CoA/CoA pode ser prejudicial para o metabolismo energético da mitocôndria. O acúmulo de algumas acil-CoA podem ter um efeito tóxico no organismo, assim a conversão de acil-CoA em acilcarnitina é um mecanismo para remoção desse excesso, minimizando essa toxicidade<sup>66</sup>. As acil-CoA de cadeia curta inibem a ação do complexo piruvato desidrogenase, impactando o ciclo de Krebs<sup>67</sup>.

O catabolismo de aminoácidos ramificados (leucina, isoleucina, valina) é uma fonte de acil-CoA de cadeia curta, como propionil-CoA, acetil-CoA, isobutiril-CoA, isovaleril-CoA, entre outras. Esses acil-CoA de cadeia curta podem ser convertidos em propionilcarnitina, acetilcarnitina, isobutirilcarnitina e isovalerilcarnitina, respectivamente e, com a exceção da isobutirilcarnitina, foram encontrados diminuídos no plasma dos pacientes após tratamento com clopidogrel e sinvastatina Além disso, os aminoácidos ramificados (isoleucina, leucina e

valina) também foram encontrados diminuídos. Assim, provavelmente o metabolismo de aminoácidos ramificados foi alterado com o tratamento. Após o infarto do miocárdio, Wang *et al.* sugerem que disfunções no catabolismo de aminoácidos ramificados, resultam no acúmulo desses aminoácidos no miocárdio, que contribuem para a disfunção e remodelamento cardíaco<sup>68</sup>. Outros substratos que produzem propionil-CoA são metionina, treonina, ácidos graxos de cadeia ímpar e cadeias laterais de colesterol<sup>69</sup>. O acetil-CoA também pode ser proveniente do catabolismo de outros aminoácidos, como tirona, triptofano, fenilalanina e lisina. O tratamento com clopidogrel e sinvastatina também diminuiu os níveis plasmáticos de metionina, treonina, triptofano, tirosina e fenilalanina. Na urina esse tratamento também levou a redução nos níveis de triptofano, tirosina, fenilalanina e isoleucina/leucina (Tabela suplementar 2).

As acilcarnitinas de cadeia curta induzem o estresse oxidativo<sup>70</sup>, assim a diminuição das acilcarnitinas de cadeia curta pelo tratamento podem impactar num menor estresse oxidativo após o infarto. Além disso, o acúmulo de acilcarnitinas insaturadas, diminuídas pelo tratamento, podem contribuir para a disfunção da membrana em zonas de isquemia do miocárdio.

Na urina, acilcarnitinas de cadeia curta e hidroxiladas foram diminuídas, corroborando os achados do plasma. As acilcarnitinas hidroxiladas também podem ser produzidas pelo metabolismo de aminoácidos ramificados ou pela  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos, que possuem etapas com formação de acil-CoA hidroxiladas, que podem ser convertidas em acilcarnitinas hidroxiladas. Na urina também observou-se uma diminuição significativa dos níveis de isoleucina/leucina (Tabela Suplementar 2) dos pacientes sob tratamento de clopidogrel e sinvastatina, após 30 dias e seis meses de tratamento. Já a valina está aumentada na urina dos pacientes dos dois grupos, após 6 meses de tratamento. A identificação dos metabólitos na urina foi realizada putativamente pela massa exata e assim menos robusta que as identificações dos aminoácidos no plasma.

Ainda, o acetil-CoA pode ser convertido em corpos cetônicos, como o ácido 3-hidroxi-butírico, que também foi encontrado diminuído no plasma de pacientes tratados com sinvastatina e clopidogrel. Os corpos cetônicos também podem ser utilizados para produção de energia no coração. No trabalho de Andersson *et al.* altas concentrações do ácido 3-hidroxi-butírico foram associadas a um maior risco de insuficiência cardíaca com fração de ejeção preservada<sup>71</sup>.

Outros metabólitos envolvidos na produção energética das células, que foram encontrados alterados, são o ácido fumárico, aumentado no grupo CS, e a piranose (glicose) diminuído no grupo CS, após 30 dias de tratamento.

Alguns ácidos graxos livres foram diminuídos pelos dois tratamentos (CS e TR). Os ácidos graxos livres são liberados pelo processo de lipólise de TG, ou também pela hidrólise de fosfolipídios pela ação das fosfolipases. O excesso de ácidos graxos livres na circulação podem promover um aumento das lipoproteínas VLDL, que são pró-aterogênicas. Além disso, esse excesso de ácidos graxos livres podem induzir estresse oxidativo, inflamação e resistência à insulina pela ativação do fator de transcrição nuclear kappa B<sup>72</sup>. Os ácidos graxos livres também estão associados à disfunção endotelial, uma condição patogênica associada ao risco de desenvolver aterosclerose<sup>73</sup>. A meta análise de estudos clínicos com as estatinas atorvastatina e sinvastatina realizada por Sahebkar *et al.* concluiu que essas estatinas reduziram significativamente o nível plasmático de ácidos graxos livres independentemente da duração do tratamento, da dose e da magnitude da redução dos níveis de LDL-c<sup>72</sup>. Assim, o efeito observado pelo tratamento com clopidogrel e sinvastatina e por rosuvastatina e ticagrelor devem estar relacionados às estatinas.

Foi possível também observar a diminuição de dois produtos do catabolismo de ATP, a hipoxantina, diminuída no plasma e na urina dos pacientes após o tratamento com CS e TR e também a xantina diminuída na urina dos pacientes após seis meses de tratamento. No início da isquemia cardíaca a adenosina trifosfato (ATP) e a creatina fosfato são rapidamente consumidas, levando à acumulação celular de produtos do catabolismo dessas moléculas, como adenosina difosfato (ADP), adenosina monofosfato (AMP). O AMP é rapidamente catabolizado a adenosina, inosina, xantina e ácido úrico. Assim, Farthing *et al.* sugerem que a inosina e a hipoxantina, por serem moléculas pequenas, são rapidamente transportadas por difusão passiva para a corrente sanguínea e podem possivelmente serem biomarcadores de infarto do miocárdio<sup>74</sup>. Assim, podemos atribuir a diminuição dos níveis de hipoxantina e xantina nos pacientes após o tratamento devido à melhora da isquemia das células cardíacas.



#### 4 - Bibliografia

- <sup>1</sup> Kind, T.; Wohlgemuth, G.; Lee, D. Y.; Lu, Y.; Palazoglu, M.; Shahbaz, S.; Fiehn, O. *Anal Chem* 2009, 81(24):10038–10048.
- <sup>2</sup> Yi, L.; Shi, S.; Yi, Z.; He, R.; Lub, H.; Liang, Y. *Anal. Methods* 2014, 6:4380–4387.
- <sup>3</sup> Beale, D. J.; Pinu, F. R.; Kouremenos, K. A.; Poojary, M.M.; Narayana, V. K.; Boughton, B. A.; Kanojia, K.; Dayalan, S.; Jones, O. A.H.; Dias, D. A. *Metabolomics* 2018, 14:152.
- <sup>4</sup> Dunn, W. B.; Broadhurst, D.; Begley, P.; Zelena, E.; Francis-McIntyre, S.; Anderson, N.; Brown, M.; Knowles, J. D.; Halsall, A.; Haselden, J. N.; Nicholls, A. W.; Wilson, I. D.; Kell, D. B.; Goodacre, R.; Human Serum Metabolome (HUSERMET) Consortium *Nat Protoc* 2011, 6:060–1083.
- <sup>5</sup> Armitage, E. G.; Godzien, J.; Alonso-Herranz, V.; López-González, Á.; Barbas, C. *Electrophoresis* 2015, 36(24), 3050–3060.
- <sup>6</sup> van den Berg, R. A.; Hoefsloot, H. C.; Westerhuis, J. A.; Smilde, A. K.; van der Werf, M. J. *BMC Genomics* 2006, 7:142.
- <sup>7</sup> Godzien, J.; Ciborowski, M.; Angulo, S.; Barbas, C. *Electrophoresis* 2013, 34, 2812–2826.
- <sup>8</sup> Umetrics, A. User guide to SIMCA-P+12. *Kinnelon: Umetrics Inc*, 2008.
- <sup>9</sup> Eriksson, L.; Trygg, J.; Wold, S. *J Chemom* 2008, 22, 594–600.
- <sup>10</sup> Tsugawa, H.; Ikeda, K.; Takahashi, M.; Satoh, A.; Mori, Y.; Uchino, H.; Okahashi, N.; Yamada, Y.; Tada, I.; Bonini, P.; Higashi, Y.; Okazaki, Y.; Zhou, Z.; Zhu, Z. J.; Koelmel, J.; Cajka, T.; Fiehn, O.; Saito, K.; Arita, M.; Arita, M. *Nature Biotechnol* 2020, 38(10), 1159–1163.
- <sup>11</sup> Godzien, J.; Ciborowski, M.; Martínez-Alcázar, M. P.; Samczuk, P.; Kretowski, A.; Barbas, C. *J Proteome Res* 2015, 14(8):3204–3216.
- <sup>12</sup> Fahy, E.; Sud, M.; Cotter, D.; Subramaniam, S. *Nucleic Acids Res* 2007, 35:W606-W612.
- <sup>13</sup> Murphy, R. C.; Axelsen, P. H. *Mass Spectrom Rev* 2011, 30(4): 579–599.
- <sup>14</sup> Lee, M. H.; Lee, G. H.; Yoo, J. S. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2003, 17(1):64–75.
- <sup>15</sup> Qu, F.; Zhang, H.; Zhang, M.; Hu, P. *Molecules* 2018, 23, 1324.
- <sup>16</sup> Murphy, R. C.; James, P. F.; McAnoy, A. M.; Krank, J.; Duchoslav, E.; Barkley, R. M. *Anal Biochem* 2007, 366(1), 59–70.
- <sup>17</sup> Höring, M.; Ejsing, C. S.; Hermansson, M.; Liebisch, G. *Anal Chem* 2019, 91(5), 3459–3466.
- <sup>18</sup> Bowden, J. A.; Shao, F.; Albert, C. J.; Lally, J. W.; Brown, R. J.; Procknow, J. D.; Stephenson, A. H.; Ford, D. A. *Lipids* 2011, 46(12):1169–1179.

- <sup>19</sup> Gallego, S. F.; Hojlund, K.; Ejsing, C. S. *J Am Soc Mass Spectrom* 2018, 29 (1), 34–41
- <sup>20</sup> Gil de la Fuente, A.; Godzien, J.; Fernández López, M.; Rupérez, F. J.; Barbas, C.; Otero, A. *J Pharm Biomed Anal* 2018, 154:138–149.
- <sup>21</sup> Bouatra, S.; Aziat, F.; Mandal, R.; Guo, A. C.; Wilson, M. R.; Knox, C.; Bjorndahl, T. C.; Krishnamurthy, R.; Saleem, F.; Liu, P.; Dame, Z. T.; Poelzer, J.; Huynh, J.; Yallou, F. S.; Psychogios, N.; Dong, E.; Bogumil, R.; Roehring, C.; Wishart, D. S. *PloS one* 2013, 8(9), e73076.
- <sup>22</sup> Vuckovic, D. *Chem Commun* 2018, 54:6728-6749.
- <sup>23</sup> Greco, G.; Letzel, T. *J Chromatogr Sci* 2013, 51, 684–693.
- <sup>24</sup> Jandera, P. *Anal Chim Acta* 2011, 692, 1–25.
- <sup>25</sup> Periat, A.; Debrus, B.; Rudaz, S.; Guillarme, D. *J Chromatogr A* 2013, 1282, 72–83.
- <sup>26</sup> Faccio, A. T. *Abordagem metabólica no estudo da exposição gestacional à poluição atmosférica*. 2015. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015. doi:10.11606/D.46.2015.tde-07122015-101244. Acesso em: 31 de outubro de 2020.
- <sup>27</sup> Tautenhahn, R.; Böttcher, C.; Neumann, S *BMC Bioinformatics* 2008, 9:504.
- <sup>28</sup> Jandera, P. *Anal Chim Acta* 2011, 692, 1–25.
- <sup>29</sup> Wishart, D. S.; Feunang, Y. D.; Marcu, A.; Guo, A. C.; Liang, K.; Vázquez-Fresno, R.; Sajed, T.; Johnson, D.; Li, C.; Karu, N.; Sayeeda, Z.; Lo, E.; Assempour, N.; Berjanskii, M.; Singhal, S.; Arndt, D.; Liang, Y.; Badran, H.; Grant, J.; Serra-Cayuela, A.; Liu, Y.; Mandal, R.; Neveu, V.; Pon, A.; Knox, C.; Wilson, M.; Manach, C.; Scalbert, A. *Nucleic Acids Res* 2018, 46(D1):D608–D617.
- <sup>30</sup> Adams, K. J.; Pratt, B.; Bose, N.; Dubois, L. G.; John-Williams, L. S.; Perrott, K. M.; Ky, K.; Kapahi, P.; Sharma, V.; MacCoss, M. J.; Moseley, M. A.; Colton, C. A.; MacLean, B. X.; Schilling, B.; Thompson, J. W; Alzheimer’s Disease Metabolomics Consortium *J Proteome Res* 2020, 19(4): 1447–1458.
- <sup>31</sup> Gil-de-la-Fuente, A.; Godzien, J.; Saugar, S.; Garcia-Carmona, R.; Badran, H.; Wishart, D. S.; Barbas, C.; Otero, A. *J Proteome Res* 2019, 18(2), 797–802.
- <sup>32</sup> Feingold, K.R.; Grunfeld, C. Introduction to Lipids and Lipoproteins. [atualizado em fevereiro de 2018 Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000-. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK305896/>. Acessado em 20 de agosto de 2020.
- <sup>33</sup> Stroes E. *Curr Med Res Opin* 2005, 21(Suppl 6):S9–S16.

- <sup>34</sup> Sattar, N.; Preiss, D.; Murray, H.M.; Welsh, P.; Buckley, B.M.; de Craen, A.J.; Seshasai, S.R.; McMurray, J.J.; Freeman, D.J.; Jukema, J.W.; Macfarlane, P.W.; Packard, C.J.; Stott, D.J.; Westendorp, R.G.; Shepherd, J.; Davis, B.R.; Pressel, S.L.; Marchioli, R.; Marfisi, R.M.; Maggioni, A.P.; Tavazzi, L.; Tognoni, G.; Kjekshus, J.; Pedersen, T.R.; Cook, T.J.; Gotto, A.M.; Clearfield, M.B.; Downs, J.R.; Nakamura, H.; Ohashi, Y.; Mizuno, K.; Ray, K.K.; Ford, I. *Lancet* 2010, 375: 735–42.
- <sup>35</sup> Stegeman, C.; Pechlaner, R.; Willeit, P.; Langley, S. R.; Mangino, M.; Mayr, U.; Menni, C.; Moayyeri, A.; Santer, P.; Rungger, G.; Spector, T. D.; Willeit, J.; Kiechl, S.; Mayr, M. *Circulation*, 2014, 129(18):1821–1831.
- <sup>36</sup> Kienesberger, P. C.; Pulinilkunnil, T.; Nagendran, J.; Dyck, J. R. *J Mol Cell Cardiol* 2013, 55:101–110.
- <sup>37</sup> Ginsberg, H. N. *Am J Cardiol* 1998, 81(4A): 32B-35B.
- <sup>38</sup> Fabregat, A.; Sidiropoulos, K.; Viteri, G.; Marin-Garcia, P.; Ping, P.; Stein, L.; D'Eustachio, P.; Hermjakob H.; *Bioinformatics* (Oxford, England). 2018, 34(7) 1208-1214. Link do pathway: <https://reactome.org/content/detail/R-HSA-1483257>, acessado em 12 de julho de 2020.
- <sup>39</sup> Hishikawa, D.; Hashidate, T.; Shimizu, T.; Shindou, H. *J Lipid Res* 2014, 55(5):799–807.
- <sup>40</sup> Castro-Gómez, P.; Garcia-Serrano, A.; Visioli, F.; Fontecha, J. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2015, 101:41–51.
- <sup>41</sup> Ding, M.; Rexrode, K. M. *Metabolites* 2020, (10):163.
- <sup>42</sup> Siguener, A.; Kleber, M.E.; Heimerl, S.; Liebisch, G.; Schmitz, G; Maerz, W; *PLoS ONE* 2014, 9(1): e85724.
- <sup>43</sup> Matsumoto, T.; Kobayashi, T.; Kamata, K. *Curr Med Chem* 2007, 14(30):3209–3220.
- <sup>44</sup> Law, S. H.; Chan, M. L.; Marathe, G.K.; Parveen, F.; Chen, C.H.; Ke, L.Y. *Int J Mol Sci* 2019, 20(5):1149.
- <sup>45</sup> Mundra, P. A.; Barlow, C. K.; Nestel, P. J.; Barnes, E. H.; Kirby, A.; Thompson, P.; Sullivan, D. R.; Alshehry, Z. H.; Mellett, N. A.; Huynh, K.; Jayawardana, K. S.; Giles, C.; McConville, M. J.; Zoungas, S.; Hillis, G. S.; Chalmers, J.; Woodward, M.; Wong, G.; Kingwell, B. A.; Simes, J.; Tonkin, AM; Meikle, P.J. LIPID Study Investigators *JCI insight* 2018, 3(17): e121326.
- <sup>46</sup> Alshehry, Z. H.; Mundra, P. A.; Barlow, C. K.; Mellett, N. A.; Wong, G.; McConville, M.J.; Simes, J.; Tonkin, A. M.; Sullivan, D. R.; Barnes, E. H.; Nestel, P. J., Kingwell, B. A.; Marre, M.; Neal, B.; Poulter, N. R.; Rodgers, A.; Williams, B.; Zoungas, S.; Hillis, G. S.; Chalmers, J.; Woodward, M.; Meikle, P. J. *Circulation* 2016, 134(21):1637–1650.

- <sup>47</sup> Meikle, P. J.; Wong, G.; Tsorotes, D.; Barlow, C. K.; Weir, J. M.; Christopher, M. J.; MacIntosh, G. L.; Goudey, B.; Stern, L.; Kowalczyk, A.; Haviv, I.; White, A. J.; Dart, A. M.; Duffy, S. J.; Jennings, G. L.; Kingwell, B. A. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011, 31(11):2723–2732.
- <sup>48</sup> Ward-Caviness, C.K.; Xu, T.; Aspelund, T.; Thorand, B.; Montrone, C.; Meisinger, C.; Dunger-Kaltenbach, I.; Zierer, A.; Yu, Z.; Helgadottir, I.R.; Harris, T.B.; Launer, L.J.; Ganna, A.; Lind, L.; Eiriksdottir, G.; Waldenberger, M.; Prehn, C.; Suhre, K.; Illig, T.; Adamski, J.; Ruepp, A.; Koenig, W.; Gudnason, V.; Emilsson, V.; Wang-Sattler, R.; Peters, *Heart* 2017, 103(16):1278-1285.
- <sup>49</sup> Kaddurah-Daouk, R.; Baillie, R. A.; Zhu, H.; Zeng, Z. B.; Wiest, M. M.; Nguyen, U. T.; Watkins, S. M.; Krauss, R. M. *Metabolomics* 2010, 6(2):191–201.
- <sup>50</sup> Kleemann, R.; Princen, H. M.; Emeis, J. J.; Jukema, J. W.; Fontijn, R. D.; Horrevoets, A. J.; Kooistra, T.; Havekes, L. M. *Circulation* 2003, 108(11):1368–1374.)
- <sup>51</sup> Falluel-Morel, A.; Aubert, N.; Vaudry, D.; Desfeux, A.; Allais, A.; Burel, D.; Basille, M.; Vaudry, H.; Laudénbach, V.; Gonzalez, B. J. *J Mol Neurosci.* 2008;36(1-3):8-15.
- <sup>52</sup> Merscher, S.; Fornoni, A. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2014, 5:127.
- <sup>53</sup> Castillo, R.I.; Rojo, L.E.; Henriquez-Henriquez, M.; Silva, H.; Maturana, A.; Villar, M.J.; Fuentes M.; Gaspar, P.A. *Front Neurosci* 2016, 10:488.
- <sup>54</sup> Worgall, T.S. *Subcell Biochem* 2008, 49:371-85.).
- <sup>55</sup> Puig, N.; Estruch, M.; Jin, L.; Sanchez-Quesada; J. L.; Benitez, S. *Biomolecules* 2019, 9(8):300.
- <sup>56</sup> Schissel, S.L.; Tweedie-Hardman, J.; Rapp, J.H.; Graham, G.; Williams, K.J.; Tabas, I. *J Clin Invest* 1996, 98(6):1455-1464.
- <sup>57</sup> Sokolowska, E.; Blachnio-Zabielska, A. *Front Endocrinol* 2019, 10:577.
- <sup>58</sup> Hilvo, M.; Meikle, P.J.; Pedersen, E.R.; Tell, G.S.; Dhar, I.; Brenner, H.; Schöttker, B.; Lääperi, M.; Kauhanen, D.; Koistinen, K.M.; Jylhä, A.; Huynh, K.; Mellett, N.A.; Tonkin, A.M.; Sullivan, D.R.; Simes, J.; Nestel, P.; Koenig, W.; Rothenbacher, D.; Nygård, O.; Laaksonen, R. *Eur Heart J* 2020, 41(3):371-380.
- <sup>59</sup> Laaksonen, R.; Ekroos, K.; Sysi-Aho, M.; Hilvo, M.; Vihervaara, T.; Kauhanen, D.; Suoniemi, M.; Hurme, R.; März, W.; Scharnagl, H.; Stojakovic, T.; Vlachopoulou, E.; Lokki, M.L.; Nieminen, M.S.; Klingenberg, R.; Matter, C.M.; Hornemann, T.; Jüni, P.; Rodondi, N.; Räber, L.; Windecker, S.; Gencer, B.; Pedersen, E.R.; Tell, G.S.; Nygård, O.; Mach, F.; Sinisalo, J.; Lüscher, T.F. *Eur Heart J* 2016, 37(25):1967-76.

- <sup>60</sup> Pan, W.; Sun, M.; Wu, J.; Dong, H.; Liu, J.; Gao, R.; Fang, S.; Xing, L.; Hu, S.; Yu, B. *Atherosclerosis* 2020, 302:8-14.
- <sup>61</sup> Tarasov, K.; Ekroos, K.; Suoniemi, M.; Kauhanen, D.; Sylvänne, T.; Hurme, R.; Gouni-Berthold, I.; Berthold, H.K.; Kleber, M.E.; Laaksonen, R.; März, W. *J Clin Endocrinol Metab* 2014, 99(1):E45-52.
- <sup>62</sup> Ng, T.W.; Ooi, E.M.; Watts, G.F.; Chan, D.C.; Weir, J.M.; Meikle, P.J.; Barrett, P.H. *J Clin Endocrinol Metab* 2014, 99(11):E2335-40.
- <sup>63</sup> Guasch-Ferré, M.; Zheng, Y.; Ruiz-Canela, M.; Hruby, A.; Martínez-González, M. A.; Clish, C. B.; Corella, D.; Estruch, R.; Ros, E.; Fitó, M.; Dennis, C.; Morales-Gil, I. M.; Arós, F.; Fiol, M.; Lapetra, J.; Serra-Majem, L.; Hu, F. B.; Salas-Salvadó, J. *Am J Clin Nutr* 2016, 103(6): 1408–1416.
- <sup>64</sup> Kukhareenko, A.; Brito, A.; Kozhevnikova, M. V.; Moskaleva, N.; Markin, P. A.; Bochkareva, N.; Korobkova, E. O.; Belenkov, Y. N.; Privalova, E. V.; Larcova, E. V.; Ariani, A.; La Frano, M. R.; Appolonova, S. A. *Clin Chim Acta* 2020, 507: 250-256.
- <sup>65</sup> Khan, H.A.; Alhomida, A.S.; Al Madani, H.; Sobki S.H. *Metabolomics* 2013, 9: 828-838
- <sup>66</sup> Costa, C. G.; Struys, E. A.; Bootsma, A.; ten Brink, H. J.; Dorland, L.; Tavares de Almeida, I.; Duran, M.; Jakobs, C. *J Lipid Res* 1997, 38: 173-182.
- <sup>67</sup> Sauer, S. W.; Okun, J. G.; Hoffmann, G. F.; Koelker, S.; Morath, M. A. *Biochim Biophys Acta* 2008, 1777(10), 1276–1282.
- <sup>68</sup> Wang, W.; Zhang, F.; Xia, Y.; Zhao, S.; Yan, W.; Wang, H.; Lee, Y.; Li, C.; Zhang, L.; Lian, K.; Gao, E.; Cheng, H.; Tao, L. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2016, 311: H1160–H1169.
- <sup>69</sup> Kukhareenko, A.; Brito, A.; Kozhevnikova, M. V.; Moskaleva, N.; Markin, P. A.; Bochkareva, N.; Korobkova, E. O.; Belenkov, Y. N.; Privalova, E. V.; Larcova, E. V.; Ariani, A.; La Frano, M. R.; Appolonova, S. A. *Clin Chim Acta* 2020, 507:250–256.
- <sup>70</sup> Aguer, C.; McCoin, C.S.; Knotts, T.A.; Thrush, A.B.; Ono-Moore, K.; McPherson, R.; Dent, R.; Hwang, D.H.; Adams, S.H.; Harper M.E. *FASEB J.* 2015, 29(1):336-345.
- <sup>71</sup> Andersson, C.; Liu, C.; Cheng, S.; Wang, T. J.; Gerszten, R. E.; Larson, M. G.; Vasan, R. S. *ESC heart failure* 2020, DOI:10.1002/ehf2.12923. (Publicado online antes)
- <sup>72</sup> Sahebkar, A.; Simental-Mendía, L. E.; Pedone, C.; Ferretti, G.; Nachtigal, P.; Bo, S.; Derosa, G.; Maffioli, P.; Watts, G. F. *Br J Clin Pharmacol* 2016, 81(5):807–818.
- <sup>73</sup> Ghosh, A.; Gao, L.; Thakur, A.; Siu, P. M.; Lai, C. *J Biomed Sci* 2017, 24(1):50.
- <sup>74</sup> Farthing, D. E.; Farthing, C. A.; Xi, L. *Exp Biol Med (Maywood)* 2015, 240(6):821–831.

<sup>75</sup> Laborde, C. M.; Mourino-Alvarez, L.; Posada-Ayala, M.; Alvarez-Llamas, G.; Serranillos-Reus, M. G.; Moreu, J.; Vivanco, F.; Padial, L. R.; Barderas, M. G. *Metabolomics* 2014, 10(3):414–424.

## **Capítulo 5 – Conclusões**

## 1 – Conclusões

O estudo metabolômico de duas estratégias terapêuticas aplicadas a pacientes pós infarto agudo do miocárdio realizado neste trabalho se mostrou eficaz para se obter uma grande cobertura do metaboloma. Por meio da abordagem analítica multiplataforma utilizando RPLC-MS, HILIC-MS e CE-MS, foi possível identificar metabólitos de diversas classes, desde compostos mais polares como amino ácidos e acilcarnitinas de cadeia curta, a lipídios bem apolares, como triacilglicerídeos e ceramidas.

A análise de dois biofluidos dos mesmos pacientes forneceu resultados complementares importantes. A análise do plasma evidenciou principalmente alterações no metabolismo de diferentes classes de lipídios, como ceramidas, ésteres de colesterol, glicerolipídios e glicerofosfolipídios, além de ácidos graxos, que não estão muito presentes na urina. A análise de urina confirmou alterações no metabolismo de aminoácidos ramificados, acilcarnitinas de cadeia curta e da síntese de glutatona.

A metabolômica foi uma ferramenta importante para avaliar os dois tratamentos estudados. Com o emprego dessa abordagem verificou-se resultados já esperados com o uso de estatinas, como a diminuição dos níveis plasmáticos de algumas espécies de ésteres de colesterol e de triacilglicerídios, confirmando o poder da ferramenta.

Apesar de poucos metabólitos se mostrarem significativos na comparação direta entre os dois tratamentos, foi possível verificar que o tratamento com ticagrelor e rosuvastatina (TR) proporcionou em geral uma maior diminuição dos níveis de lipídios do que o tratamento com clopidogrel e sinvastatina (CS). Além disso, em relação ao metabolismo de aminoácidos de cadeia ramificada e as acilcarnitinas de cadeia curta, foi possível verificar que apenas o tratamento CS resultou numa grande alteração desse metabolismo.

Foi possível confirmar a presença de alguns possíveis biomarcadores relacionados a problemas cardiovasculares, já relatados na literatura, como a hipoxantina, um biomarcador de isquemia, ácido 2-hidroxi-butírico, um biomarcador de estresse oxidativo, algumas ceramidas, fosfatidilcolinas e acilcarnitinas de cadeia curta, biomarcadores de risco cardiovascular, entre outros.

Ainda, foi possível verificar o efeito protetor dos tratamentos devido à diminuição dos níveis de glicerofosfolipídios compostos por ácido araquidônico, em especial pelo tratamento com ticagrelor e rosuvastatina, que foi evidenciado devido ao uso de experimentos de MS/MS

para a caracterização dos lipídios alterados. Os resultados controversos sobre lisofosfatidilcolinas na literatura, também reforçam a importância da caracterização dos lipídios por MS/MS. Assim, é evidente que mais estudos de lipidômica e metabolômica com identificação por padrões analíticos e/ou por MS/MS são muito importantes para melhor compreender o metabolismo de diferentes doenças, mecanismos de atuação de tratamentos e para a busca de biomarcadores mais contundentes.

# Apêndices

**Tabela Suplementar 1** – Identificação putativa dos *molecular features* significativos das análises de plasma por RPLC-MS no modo positivo (ESI+) e negativo (ESI-) de ionização

m/z	t <sub>R</sub> min	Adduct	Error ppm	Name	IDs/mf	Class	Mode	% of change		
								CS-t vs CS-b	TR-t vs TR-b	TR-t vs CS-t
1133.4780	16.0	M+NH4	9	CoA(24:1)	1	AcylCoA	ESI+	<b>-26%</b>	<b>-35%</b>	-10%
144.1014	1.0	M+H	4	Proline betaine	2	Amino acid and deriv.	ESI+	<b>304%</b>	149%	-55%
144.1014	1.0	M+H	3	Crotonobetaine	2	Amino acid and deriv.	ESI+	<b>304%</b>	149%	-55%
145.0615	1.1	M-H	2	Isoglutamine	4	Amino acid and deriv.	ESI-	4%	<b>9%</b>	0%
145.0615	1.1	M-H	3	Ureidoisobutyric acid	4	Amino acid and deriv.	ESI-	4%	<b>9%</b>	0%
145.0615	1.1	M-H	3	Glutamine	4	Amino acid and deriv.	ESI-	4%	<b>9%</b>	0%
204.1226	1.1	M+H	2	N-lactoyl-Leucine	2	Amino acid and deriv.	ESI+	<b>-30%</b>	-17%	20%
170.0924	1.6	M+H	0	Methylhistidine	2	Amino acid and deriv.	ESI+	<b>22%</b>	<b>108%</b>	17%
156.0768	1.6	M+H	0	Histidine	4	Amino acid and deriv.	ESI+	<b>-15%</b>	-5%	11%
156.0768	1.6	M+H-H2O	0	2-Oxoarginine	4	Amino acid and deriv.	ESI+	<b>-15%</b>	-5%	11%
171.0773	1.7	M-H-H2O	2	2-Amino-4-[(2-hydroxy-1-oxopropyl)amino]butanoic acid	5	Amino acid and deriv.	ESI-	<b>-16%</b>	-7%	5%
171.0773	1.7	M-H-H2O	2	Diamino-pimelic acid	5	Amino acid and deriv.	ESI-	<b>-16%</b>	-7%	5%
171.0773	1.7	M-H-H2O	2	meso-2,6-Diaminoheptanedioate	5	Amino acid and deriv.	ESI-	<b>-16%</b>	-7%	5%
189.0874	1.7	M-H	4	2-Amino-4-[(2-hydroxy-1-oxopropyl)amino]butanoic acid	5	Amino acid and deriv.	ESI-	<b>-18%</b>	-7%	6%
189.0874	1.7	M-H	4	Diamino-pimelic acid	5	Amino acid and deriv.	ESI-	<b>-18%</b>	-7%	6%
189.0874	1.7	M-H	4	meso-2,6-Diaminoheptanedioate	5	Amino acid and deriv.	ESI-	<b>-18%</b>	-7%	6%
189.0874	1.7	M+FA-H	5	4-Amino-1-piperidinecarboxylic acid	5	Amino acid and deriv.	ESI-	<b>-18%</b>	-7%	6%
145.0969	1.7	M-H	9	3-Methylornithine	2	Amino acid and deriv.	ESI-	<b>-14%</b>	-7%	2%
145.0969	1.7	M-H	9	Lysine	2	Amino acid and deriv.	ESI-	<b>-14%</b>	-7%	2%
159.1132	1.7	M-H	4	Isoputrescine	2	Amino acid and deriv.	ESI-	<b>-26%</b>	-9%	10%
159.1132	1.7	M-H	4	Methyl-lysine	2	Amino acid and deriv.	ESI-	<b>-26%</b>	-9%	10%

m/z	t <sub>R</sub> min	Adduct	Error ppm	Name	IDs/mf	Class	Mode	% of change		
								CS-t vs CS-b	TR-t vs TR-b	TR-t vs CS-t
233.0775	1.7	M+FA-H	2	N-Acetylglutamine	3	Amino acid and deriv.	ESI-	<b>-17%</b>	-6%	7%
203.1029	1.8	M-H	4	N6-Acetyl-hydroxy-lysine	2	Amino acid and deriv.	ESI-	<b>-24%</b>	-9%	8%
184.0732	17.9	M+K	2	Aminoheptanoic acid	1	Amino acid and deriv.	ESI+	-36%	<b>-47%</b>	24%
273.0723	1.7	M-H-H2O	0	EDTA	2	Anticoagulant	ESI-	<b>-23%</b>	-9%	7%
291.0832	1.7	M-H	1	EDTA	3	Anticoagulant	ESI-	<b>-26%</b>	-9%	10%
466.9308	1.1	M-H	2	alpha-D-Ribose 1-methylphosphonate 5-triphosphate	1	Carbohydrate and deriv.	ESI-	<b>-16%</b>	-6%	6%
661.0789	1.7	M-H	2	UDP-2,3-diacetamido-2,3-dideoxy-alpha-D-mannuronate	1	Carbohydrate and deriv.	ESI-	<b>-22%</b>	-9%	7%
658.0661	1.7	M-H-H2O	4	UDP-N-acetyl-3-(1-carboxyvinyl)-D-glucosamine	1	Carbohydrate and deriv.	ESI-	<b>-21%</b>	-8%	9%
578.0768	1.8	M+FA-H	5	CDP- dideoxy-hexose	1	Carbohydrate and deriv.	ESI-	<b>-27%</b>	-8%	10%
204.1226	1.1	M+H	2	Acetylcarnitine	2	Carnitine/ Acylcarn.	ESI+	<b>-30%</b>	-17%	20%
510.3562	1.3	M+K	1	3-hydroxyeicosanoylcarnitine	5	Carnitine/ Acylcarn.	ESI+	<b>37%</b>	3%	-9%
335.0464	1.1	M-H	6	4-Hydroxy-5-(dihydroxyphenyl)-valeric acid-O-methyl-O-sulphate	3	Catechol and deriv.	ESI-	<b>-9%</b>	<b>-9%</b>	-7%
976.5057	17.7	M-H	1	CDP-DG(34:2)	1	CDP-DG	ESI-	<b>-14%</b>	-13%	-6%
988.5472	18.9	M-H-H2O	4	CDP-DG(36:1)	1	CDP-DG	ESI-	3%	<b>12%</b>	7%
986.5308	20.0	M+H-H2O	4	CDP-DG(36:3)	1	CDP-DG	ESI+	-15%	<b>-21%</b>	10%
998.5130	20.2	M+FA-H	1	CDP-DG(32:0)	1	CDP-DG	ESI-	<b>-9%</b>	-5%	6%
1012.5439	20.9	M+H-H2O	1	CDP-DG(38:4)	1	CDP-DG	ESI+	-20%	<b>-39%</b>	9%
990.5633	20.9	M-H-H2O	5	CDP-DG(36:0)	1	CDP-DG	ESI-	8%	<b>29%</b>	<b>19%</b>
980.5364	20.9	M-H	2	CDP-DG(34:0)	1	CDP-DG	ESI-	3%	<b>29%</b>	<b>27%</b>
871.6145	22.2	M+Cl	9	20:3-Glc-cholesterol	1	CE	ESI-	<b>-15%</b>	-7%	<b>17%</b>
685.5309	33.4	M+K	2	CE(18:3)	1	CE	ESI+	<b>-23%</b>	<b>-29%</b>	-12%

m/z	t <sub>R</sub> min	Adduct	Error ppm	Name	IDs/mf	Class	Mode	% of change		
								CS-t vs CS-b	TR-t vs TR-b	TR-t vs CS-t
735.5474	33.7	M+K	0	CE(22:6)	1	CE	ESI+	<b>-19%</b>	-9%	8%
619.5382	34.0	M+Na	7	CE(14:0)	1	CE	ESI+	-8%	<b>-40%</b>	<b>-36%</b>
645.5573	34.4	M+Na	1	CE(16:1)	1	CE	ESI+	<b>-34%</b>	<b>-40%</b>	-24%
661.5334	34.4	M+K	2	CE(16:1)	2	CE	ESI+	-24%	<b>-31%</b>	-17%
739.5625	34.8	M+H+HCOONa	1	CE(20:5)	1	CE	ESI+	-22%	<b>-32%</b>	-10%
687.5470	34.8	M+K	1	CE(18:2)	2	CE	ESI+	<b>-12%</b>	<b>-14%</b>	1%
1024.6772	13.4	M+H	1	Hex-Hex-Hex-Cer(d34:1)	1	Cer(Hex)	ESI+	<b>-25%</b>	<b>-41%</b>	-4%
844.6115	13.8	M+H-H <sub>2</sub> O	4	HexCer(d34:1)	3	Cer(Hex)	ESI+	<b>-22%</b>	<b>-39%</b>	-8%
738.5488	13.9	M+Na	0	HexCer(d34:1(2OH))	2	Cer(Hex)	ESI+	<b>-17%</b>	<b>-30%</b>	-9%
906.6078	14.7	M+FA-H	9	LacCer(d34:1)	2	Cer(Hex)	ESI-	<b>-17%</b>	<b>-24%</b>	-1%
722.5542	15.0	M+Na	0	HexCer(d34:1)	3	Cer(Hex)	ESI+	<b>-28%</b>	<b>-39%</b>	-7%
744.5609	15.6	M+FA-H	3	HexCer(d34:1)	1	Cer(Hex)	ESI-	<b>-17%</b>	<b>-28%</b>	-16%
842.5231	15.6	M+Cl	1	SulfoHex-Cer(d36:1)	2	Cer(Hex)	ESI-	-7%	<b>-27%</b>	-5%
650.4963	18.0	M-H-H <sub>2</sub> O	5	HexCer(d32:2)	1	Cer(Hex)	ESI-	<b>-26%</b>	<b>-29%</b>	5%
792.5907	19.9	M+Na	7	HexCer(d38:2(OH))	6	Cer(Hex)	ESI+	<b>-17%</b>	<b>-18%</b>	-2%
678.5265	20.8	M-H-H <sub>2</sub> O	6	HexCer(d34:2)	1	Cer(Hex)	ESI-	<b>-33%</b>	<b>-25%</b>	26%
762.5606	21.0	M+Cl	7	HexCer(d36:1)	4	Cer(Hex)	ESI-	-8%	<b>-16%</b>	-9%
764.5771	21.6	M+Cl	6	HexCer(d36:0)	3	Cer(Hex)	ESI-	-6%	<b>-13%</b>	-4%
820.6198	22.1	M+Na	9	HexCer(d40:2(OH))	7	Cer(Hex)	ESI+	-8%	<b>-27%</b>	-2%
972.7389	22.8	M+H	4	HexCer(d42:2)	2	Cer(Hex)	ESI+	<b>-26%</b>	<b>-41%</b>	-22%
828.6503	23.6	M+FA-H	9	HexCer(d40:1)	4	Cer(Hex)	ESI-	<b>-25%</b>	<b>-44%</b>	-21%
732.5738	23.6	M-H-H <sub>2</sub> O	5	HexCer(d38:3)	1	Cer(Hex)	ESI-	-19%	<b>-22%</b>	17%
720.5750	24.1	M-H-H <sub>2</sub> O	4	HexCer(d37:2)	1	Cer(Hex)	ESI-	-20%	<b>-26%</b>	10%
842.6664	24.5	M+FA-H	8	HexCer(d41:1)	3	Cer(Hex)	ESI-	<b>-25%</b>	<b>-47%</b>	<b>-26%</b>
734.5902	24.9	M-H-H <sub>2</sub> O	4	HexCer(d38:2)	1	Cer(Hex)	ESI-	<b>-30%</b>	<b>-36%</b>	0%
736.6062	25.5	M-H-H <sub>2</sub> O	4	HexCer(d38:1)	1	Cer(Hex)	ESI-	<b>-21%</b>	<b>-22%</b>	1%

m/z	t <sub>R</sub> min	Adduct	Error ppm	Name	IDs/mf	Class	Mode	% of change		
								CS-t vs CS-b	TR-t vs TR-b	TR-t vs CS-t
748.6054	25.7	M-H-H2O	5	HexCer(d39:2)	1	Cer(Hex)	ESI-	<b>-23%</b>	<b>-36%</b>	-10%
762.6211	26.5	M-H-H2O	5	HexCer(d40:2)	1	Cer(Hex)	ESI-	<b>-25%</b>	<b>-33%</b>	-10%
776.6354	27.0	M-H-H2O	6	HexCer(d41:2)	1	Cer(Hex)	ESI-	<b>-19%</b>	<b>-31%</b>	-12%
790.6514	28.1	M-H-H2O	6	HexCer(d42:2)	1	Cer(Hex)	ESI-	-24%	<b>-37%</b>	-7%
736.6062	25.5	M-H-H2O	7	CerP(d44:2)	1	CerP	ESI-	<b>-21%</b>	<b>-22%</b>	1%
828.6503	23.6	M+FA-H	2	CerP(d44:2)	4	CerP	ESI-	<b>-25%</b>	<b>-44%</b>	-21%
762.5606	21.0	M+Cl	4	CerP(d42:2)	4	CerP	ESI-	-8%	<b>-16%</b>	-9%
682.6287	25.7	M-H	10	Cer(t42:0(OH))	1	Cer(t)	ESI-	-9%	<b>-13%</b>	-1%
680.6500	27.9	M+FA-H	10	Cer(m42:0)	1	Cer(m)	ESI-	-30%	<b>-37%</b>	-13%
520.5063	17.5	M+H-H2O	5	Cer(d34:1)	1	Cer	ESI+	<b>-28%</b>	<b>-32%</b>	9%
582.5084	17.9	M+FA-H	4	Cer(d34:1)	1	Cer	ESI-	<b>-17%</b>	<b>-19%</b>	4%
608.5237	19.7	M+H+HCOONa	3	Cer(d34:0)	2	Cer	ESI+	-25%	<b>-48%</b>	<b>-36%</b>
610.5389	20.8	M+FA-H	5	Cer(d36:1)	1	Cer	ESI-	<b>-33%</b>	<b>-23%</b>	23%
638.5694	23.1	M+FA-H	6	Cer(d38:1)	1	Cer	ESI-	-14%	-8%	<b>27%</b>
664.5859	23.6	M+FA-H	4	Cer(d40:2)	1	Cer	ESI-	-14%	<b>-18%</b>	20%
604.5989	24.6	M+H-H2O	6	Cer(d40:1)	1	Cer	ESI+	-20%	<b>-42%</b>	-9%
644.5928	24.6	M+Na	4	Cer(d40:1)	1	Cer	ESI+	-20%	<b>-34%</b>	-3%
630.6138	24.8	M+H-H2O	7	Cer(d42:2)	1	Cer	ESI+	-15%	<b>-34%</b>	-7%
670.6102	24.8	M+Na	1	Cer(d42:2)	1	Cer	ESI+	-18%	<b>-25%</b>	3%
656.5721	24.9	M+Cl	5	Cer(d40:1)	1	Cer	ESI-	<b>-28%</b>	<b>-31%</b>	1%
682.5943	25.1	M+FA-H	8	Cer(d40:1(OH))	1	Cer	ESI-	<b>-21%</b>	<b>-21%</b>	3%
618.6146	25.4	M+H-H2O	6	Cer(d41:1)	1	Cer	ESI+	-17%	<b>-43%</b>	-18%
658.6080	25.5	M+Na	5	Cer(d41:1)	1	Cer	ESI+	-22%	<b>-37%</b>	-8%
670.5902	25.7	M+Cl	1	Cer(d41:1)	1	Cer	ESI-	<b>-23%</b>	<b>-35%</b>	-7%
710.6266	25.8	M+Cl	6	Cer(d44:2)	1	Cer	ESI-	-24%	<b>-39%</b>	-16%
638.6400	25.9	M+H	7	Cer(d41:0)	1	Cer	ESI+	<b>-34%</b>	<b>-48%</b>	-2%

m/z	t <sub>R</sub> min	Adduct	Error ppm	Name	IDs/mf	Class	Mode	% of change		
								CS-t vs CS-b	TR-t vs TR-b	TR-t vs CS-t
650.6430	26.2	M+H	2	Cer(d42:1)	1	Cer	ESI+	-22%	<b>-44%</b>	-11%
696.6458	26.5	M+FA-H	8	Cer(d42:0)	1	Cer	ESI-	<b>-24%</b>	<b>-25%</b>	-7%
684.6055	26.5	M+Cl	2	Cer(d42:1)	1	Cer	ESI-	<b>-23%</b>	<b>-31%</b>	-7%
664.6538	26.7	M+H	10	Cer(d43:1)	1	Cer	ESI+	-16%	<b>-36%</b>	-15%
646.6470	26.7	M+H-H2O	4	Cer(d43:1)	1	Cer	ESI+	-6%	<b>-39%</b>	-27%
722.6616	28.0	M+FA-H	8	Cer(d44:1)	1	Cer	ESI-	-12%	<b>-29%</b>	-4%
659.5107	16.1	M-H-H2O	10	DG(40:8)	2	DG	ESI-	-10%	<b>-13%</b>	5%
661.4832	18.8	M+H	1	DG(40:10)	5	DG	ESI+	<b>44%</b>	13%	-25%
661.4832	18.8	M+Na	5	DG(38:7)	5	DG	ESI+	<b>44%</b>	13%	-25%
547.4717	19.0	M+H-H2O	1	DG(32:2)	1	DG	ESI+	-12%	<b>-44%</b>	<b>-40%</b>
582.5055	19.0	M+NH4	7	DG(32:2)	1	DG	ESI+	-12%	<b>-43%</b>	<b>-39%</b>
587.4637	19.0	M+H	6	DG(34:5)	2	DG	ESI+	12%	-19%	<b>-40%</b>
587.4637	19.0	M+Na	2	DG(32:2)	2	DG	ESI+	12%	-19%	<b>-40%</b>
613.4798	19.7	M+H	5	DG(36:6)	1	DG	ESI+	0%	-25%	<b>-41%</b>
573.4848	19.7	M+H-H2O	5	DG(34:3)	1	DG	ESI+	-14%	<b>-32%</b>	<b>-26%</b>
608.5237	19.7	M+NH4	2	DG(34:3)	2	DG	ESI+	-25%	<b>-48%</b>	<b>-36%</b>
639.4965	20.5	M+Na	1	DG(36:4)	1	DG	ESI+	-6%	<b>-28%</b>	<b>-31%</b>
549.4865	20.8	M+H-H2O	2	DG(32:1)	1	DG	ESI+	-26%	<b>-48%</b>	<b>-44%</b>
589.4808	20.8	M+H	3	DG(34:4)	2	DG	ESI+	-21%	<b>-38%</b>	<b>-45%</b>
589.4808	20.8	M+Na	1	DG(32:1)	2	DG	ESI+	-21%	<b>-38%</b>	<b>-45%</b>
615.4955	21.5	M+H	5	DG(36:5)	2	DG	ESI+	<b>-36%</b>	<b>-54%</b>	<b>-35%</b>
615.4955	21.5	M+Na	1	DG(34:2)	2	DG	ESI+	<b>-36%</b>	<b>-54%</b>	<b>-35%</b>
631.4704	21.5	M+K	1	DG(34:2)	3	DG	ESI+	<b>-36%</b>	<b>-49%</b>	<b>-28%</b>
637.5034	21.8	M+FA-H	2	DG(34:2)	1	DG	ESI-	<b>-41%</b>	-35%	-12%
641.5115	22.0	M+H	4	DG(38:6)	2	DG	ESI+	<b>-34%</b>	<b>-45%</b>	-19%
641.5115	22.0	M+Na	0	DG(36:3)	2	DG	ESI+	<b>-34%</b>	<b>-45%</b>	-19%

m/z	t <sub>R</sub> min	Adduct	Error ppm	Name	IDs/mf	Class	Mode	% of change		
								CS-t vs CS-b	TR-t vs TR-b	TR-t vs CS-t
657.4873	22.1	M+K	3	DG(36:3)	5	DG	ESI+	<b>-32%</b>	<b>-39%</b>	-15%
687.5190	22.2	M+FA-H	2	DG(38:5)	1	DG	ESI-	-10%	<b>42%</b>	<b>48%</b>
663.5185	22.4	M+FA-H	3	DG(36:3)	1	DG	ESI-	<b>-30%</b>	<b>-29%</b>	-5%
629.5112	22.5	M+H	4	DG(37:5)	2	DG	ESI+	-20%	<b>-32%</b>	-19%
629.5112	22.5	M+Na	1	DG(35:2)	2	DG	ESI+	-20%	<b>-32%</b>	-19%
551.5019	22.5	M+H-H <sub>2</sub> O	3	DG(32:0)	1	DG	ESI+	-28%	<b>-65%</b>	-54%
586.5381	22.5	M+NH <sub>4</sub>	4	DG(32:0)	1	DG	ESI+	-20%	<b>-56%</b>	-48%
591.4957	22.5	M+Na	0	DG(32:0)	1	DG	ESI+	-20%	<b>-61%</b>	-55%
607.4700	22.5	M+K	0	DG(32:0)	3	DG	ESI+	<b>-32%</b>	<b>-60%</b>	-52%
607.4700	22.5	M+H-H <sub>2</sub> O	3	DG(37:7)	3	DG	ESI+	<b>-32%</b>	<b>-60%</b>	-52%
617.5115	23.0	M+Na	0	DG(34:1)	1	DG	ESI+	<b>-37%</b>	<b>-51%</b>	-33%
633.4871	23.0	M+K	3	DG(34:1)	4	DG	ESI+	<b>-34%</b>	<b>-44%</b>	-29%
633.4871	23.0	M+H-H <sub>2</sub> O	1	DG(39:8)	4	DG	ESI+	<b>-34%</b>	<b>-44%</b>	-29%
639.5255	23.3	M+FA-H	8	DG(34:1)	1	DG	ESI-	<b>-42%</b>	-32%	-6%
643.5272	23.4	M+H	4	DG(38:5)	2	DG	ESI+	<b>-40%</b>	<b>-39%</b>	-12%
643.5272	23.4	M+Na	0	DG(36:2)	2	DG	ESI+	<b>-40%</b>	<b>-39%</b>	-12%
659.5005	23.4	M+K	1	DG(36:2)	4	DG	ESI+	<b>-32%</b>	<b>-30%</b>	-8%
665.5409	23.7	M+FA-H	8	DG(36:2)	1	DG	ESI-	<b>-34%</b>	-20%	7%
664.5938	23.9	M+NH <sub>4</sub>	10	DG(38:3)	1	DG	ESI+	-21%	<b>-24%</b>	-3%
640.5852	24.8	M+NH <sub>4</sub>	4	DG(36:1)	1	DG	ESI+	-15%	<b>-46%</b>	-37%
697.6101	25.7	M-H-H <sub>2</sub> O	5	DG(42:3)	1	DG	ESI-	-16%	<b>-24%</b>	-11%
379.2830	1.4	M+Na	3	Heneicosanedioic acid	2	Fatty acid	ESI+	<b>-45%</b>	<b>-44%</b>	-8%
379.2830	1.4	M+H+HCOONa	4	Eicosenoic acid (C20:1)	2	Fatty acid	ESI+	<b>-45%</b>	<b>-44%</b>	-8%
281.2481	1.7	M-H	2	Octadecenoic acid (C18:1, Oleic Acid)	1	Fatty Acid	ESI-	<b>-49%</b>	<b>-36%</b>	26%
607.4700	22.5	M+H	3	FAHFA(O-40:8)	3	Fatty ester	ESI+	<b>-32%</b>	<b>-60%</b>	-52%
114.0666	1.1	M+H	4	Creatinine	3	Guanidine and deriv.	ESI+	2%	<b>17%</b>	7%

m/z	t <sub>R</sub> min	Adduct	Error ppm	Name	IDs/mf	Class	Mode	% of change		
								CS-t vs CS-b	TR-t vs TR-b	TR-t vs CS-t
114.0666	1.1	M+H-H <sub>2</sub> O	2	Creatine	3	Guanidine and deriv.	ESI+	2%	<b>17%</b>	7%
114.0666	1.1	M+H-H <sub>2</sub> O	2	Beta-Guanidinopropionic acid	3	Guanidine and deriv.	ESI+	2%	<b>17%</b>	7%
156.0768	1.6	M+NH <sub>4</sub>	0	Urocanic acid	4	Imidazole and deriv.	ESI+	<b>-15%</b>	-5%	11%
510.3562	1.3	M+NH <sub>4</sub>	2	LPA(22:1)	5	LPA	ESI+	<b>37%</b>	3%	-9%
510.3562	1.3	M+H	2	LPC(17:0)	5	LPC	ESI+	<b>37%</b>	3%	-9%
480.3436	1.4	M+H	3	LPC(O-16:1)	2	LPC	ESI+	<b>39%</b>	3%	-10%
480.3436	1.4	M+H	3	LPC(P-16:0)	2	LPC	ESI+	<b>39%</b>	3%	-10%
550.3872	1.5	M+H	1	LPC(20:1)	1	LPC	ESI+	<b>23%</b>	2%	6%
524.3716	1.5	M+H	1	LPC(18:0)	2	LPC	ESI+	<b>30%</b>	-8%	-14%
510.3562	1.3	M+H	2	LPE(20:0)	5	LPE	ESI+	<b>37%</b>	3%	-9%
508.3417	1.4	M-H	2	LPE(20:0)	1	LPE	ESI-	<b>47%</b>	16%	-9%
524.3716	1.5	M+H	1	LPE(21:0)	2	LPE	ESI+	<b>30%</b>	-8%	-14%
357.3004	19.2	M+H	1	MG(18:1)	1	MG	ESI+	-12%	<b>-25%</b>	-4%
313.2755	21.5	M+H-H <sub>2</sub> O	5	MG(16:0)	1	MG	ESI+	-36%	<b>-67%</b>	<b>-39%</b>
337.2722	22.0	M+H-H <sub>2</sub> O	5	MG(18:2)	2	MG	ESI+	-28%	<b>-50%</b>	-26%
313.2743	23.0	M+H-H <sub>2</sub> O	1	MG(16:0)	1	MG	ESI+	-34%	<b>-51%</b>	-34%
339.2892	23.4	M+H-H <sub>2</sub> O	1	MG(18:1)	1	MG	ESI+	<b>-40%</b>	<b>-41%</b>	-11%
315.0414	1.6	M-H-H <sub>2</sub> O	10	Nicotinamide ribotide	1	Nucleoside/Nucleotide and deriv.	ESI-	<b>-14%</b>	-6%	3%
368.0087	1.7	M-H-H <sub>2</sub> O	10	dCDP (Deoxycytidine diphosphate)	1	Nucleoside/Nucleotide and deriv.	ESI-	-3%	<b>-5%</b>	-3%
717.9990	1.7	M-H	3	Phosphoribosyl-ATP	1	Nucleoside/Nucleotide and deriv.	ESI-	<b>-12%</b>	-5%	3%
273.0723	1.7	M+FA-H	2	Deoxyuridine	2	Nucleoside/Nucleotide and deriv.	ESI-	<b>-23%</b>	-9%	7%

m/z	t <sub>R</sub> min	Adduct	Error ppm	Name	IDs/mf	Class	Mode	% of change		
								CS-t vs CS-b	TR-t vs TR-b	TR-t vs CS-t
291.0832	1.7	M+FA-H	1	5,6-Dihydrouridine	3	Nucleoside/Nucleotide and deriv.	ESI-	<b>-26%</b>	-9%	10%
111.0074	1.8	M-H-H2O	6	Dioxopentanoate	6	Organic acid	ESI-	<b>-18%</b>	-3%	3%
111.0074	1.8	M-H-H2O	6	Itaconic acid	6	Organic acid	ESI-	<b>-18%</b>	-3%	3%
111.0074	1.8	M-H-H2O	6	2-Hydroxyglutaric acid lactone	6	Organic acid	ESI-	<b>-18%</b>	-3%	3%
111.0074	1.8	M-H-H2O	6	Citraconic acid	6	Organic acid	ESI-	<b>-18%</b>	-3%	3%
111.0074	1.8	M-H-H2O	6	Glutaconic acid	6	Organic acid	ESI-	<b>-18%</b>	-3%	3%
111.0074	1.8	M-H-H2O	6	Mesaconic acid	6	Organic acid	ESI-	<b>-18%</b>	-3%	3%
711.5008	13.3	M-H	5	PA(37:3)	3	PA	ESI-	<b>-28%</b>	<b>-31%</b>	-4%
887.6716	14.0	M+FA-H	4	PA(46:1)	2	PA	ESI-	<b>-28%</b>	<b>-52%</b>	-26%
521.3249	14.0	M-H	0	PA(23:0)	3	PA	ESI-	<b>-23%</b>	<b>-45%</b>	-19%
801.5371	15.0	M-H	9	PA(44:7)	1	PA	ESI-	-4%	<b>-10%</b>	-9%
763.5573	15.1	M-H	10	PA(P-42:4)	2	PA	ESI-	-4%	<b>-10%</b>	-4%
763.5573	15.1	M-H-H2O	9	PA(42:3)	2	PA	ESI-	-4%	<b>-10%</b>	-4%
791.5843	16.3	M+FA-H	5	PA(39:0)	2	PA	ESI-	<b>-19%</b>	<b>-16%</b>	0%
713.5513	17.2	M-H	3	PA(O-38:2)	3	PA	ESI-	<b>-27%</b>	-10%	<b>35%</b>
713.5513	17.2	M-H	3	PA(P-38:1)	3	PA	ESI-	<b>-27%</b>	-10%	<b>35%</b>
713.5513	17.2	M-H-H2O	4	PA(38:0)	3	PA	ESI-	<b>-27%</b>	-10%	<b>35%</b>
841.5579	17.2	M+Cl	7	PA(44:5)	2	PA	ESI-	<b>-17%</b>	-7%	<b>21%</b>
770.5673	17.4	M+NH4	3	PA(40:4)	6	PA	ESI+	-6%	<b>-27%</b>	-4%
749.5757	17.5	M+FA-H	8	PA(O-37:0)	3	PA	ESI-	<b>-24%</b>	<b>-24%</b>	-12%
661.4832	18.8	M+H	4	PA(33:1)	5	PA	ESI+	<b>44%</b>	13%	-25%
715.5697	19.5	M-H	7	PA(O-38:1)	3	PA	ESI-	<b>-20%</b>	-11%	14%
715.5697	19.5	M-H	7	PA(P-38:0)	3	PA	ESI-	<b>-20%</b>	-11%	14%
748.5818	20.3	M+NH4	4	PA(38:1)	3	PA	ESI+	4%	<b>-21%</b>	-16%
718.5726	20.7	M+NH4	3	PA(O-37:2)	6	PA	ESI+	-5%	<b>-36%</b>	<b>-20%</b>

m/z	t <sub>R</sub> min	Adduct	Error ppm	Name	IDs/mf	Class	Mode	% of change		
								CS-t vs CS-b	TR-t vs TR-b	TR-t vs CS-t
718.5726	20.7	M+NH4	3	PA(P-37:1)	6	PA	ESI+	-5%	<b>-36%</b>	<b>-20%</b>
720.5879	21.2	M+NH4	3	PA(O-37:1)	3	PA	ESI+	-4%	<b>-32%</b>	<b>-22%</b>
631.4704	21.5	M+H	1	PA(P-32:1)	3	PA	ESI+	<b>-36%</b>	<b>-49%</b>	<b>-28%</b>
631.4704	21.5	M+H-H2O	1	PA(32:0)	3	PA	ESI+	<b>-36%</b>	<b>-49%</b>	<b>-28%</b>
762.6010	22.0	M+NH4	0	PA(39:1)	3	PA	ESI+	4%	<b>-33%</b>	-18%
657.4873	22.1	M+H	3	PA(O-34:3)	5	PA	ESI+	<b>-32%</b>	<b>-39%</b>	-15%
657.4873	22.1	M+H	3	PA(P-34:2)	5	PA	ESI+	<b>-32%</b>	<b>-39%</b>	-15%
657.4873	22.1	M+Na	7	PA(O-32:0)	5	PA	ESI+	<b>-32%</b>	<b>-39%</b>	-15%
657.4873	22.1	M+H-H2O	3	PA(34:1)	5	PA	ESI+	<b>-32%</b>	<b>-39%</b>	-15%
803.6226	22.2	M+FA-H	7	PA(P-41:0)	4	PA	ESI-	<b>-16%</b>	-10%	<b>17%</b>
633.4871	23.0	M+H	3	PA(P-32:0)	4	PA	ESI+	<b>-34%</b>	<b>-44%</b>	-29%
633.4871	23.0	M+H	3	PA(O-32:1)	4	PA	ESI+	<b>-34%</b>	<b>-44%</b>	-29%
773.6449	23.3	M+H	4	PA(O-42:1)	2	PA	ESI+	-11%	<b>-30%</b>	-2%
773.6449	23.3	M+H	4	PA(P-42:0)	2	PA	ESI+	-11%	<b>-30%</b>	-2%
659.5005	23.4	M+H	1	PA(O-34:2)	4	PA	ESI+	<b>-32%</b>	<b>-30%</b>	-8%
659.5005	23.4	M+H	1	PA(P-34:1)	4	PA	ESI+	<b>-32%</b>	<b>-30%</b>	-8%
659.5005	23.4	M+H-H2O	1	PA(34:0)	4	PA	ESI+	<b>-32%</b>	<b>-30%</b>	-8%
898.5657	14.0	M+FA-H	6	PC(42:10)	1	PC	ESI-	<b>-30%</b>	<b>-49%</b>	-20%
818.5526	14.9	M+FA-H	3	PC(34:2(OH))	3	PC	ESI-	<b>-29%</b>	<b>-35%</b>	-9%
722.5542	15.0	M+H-H2O	8	PC(O-34:4)	3	PC	ESI+	<b>-28%</b>	<b>-39%</b>	-7%
722.5542	15.0	M+H-H2O	8	PC(P-34:3)	3	PC	ESI+	<b>-28%</b>	<b>-39%</b>	-7%
822.5289	15.2	M+FA-H	0	PC(36:6)	3	PC	ESI-	<b>40%</b>	8%	-16%
836.5401	16.5	M+FA-H	6	PC(37:6)	3	PC	ESI-	<b>16%</b>	-5%	-9%
812.5429	16.8	M+FA-H	2	PC(35:4)	3	PC	ESI-	8%	<b>22%</b>	19%
890.5148	17.0	M+K	6	PC(42:11)	2	PC	ESI+	-29%	<b>-38%</b>	-16%
840.5329	17.3	M+Cl	2	PC(38:6)	4	PC	ESI-	<b>-12%</b>	-5%	<b>16%</b>

m/z	t <sub>R</sub> min	Adduct	Error ppm	Name	IDs/mf	Class	Mode	% of change		
								CS-t vs CS-b	TR-t vs TR-b	TR-t vs CS-t
770.5673	17.4	M+H	3	PC(35:3)	6	PC	ESI+	-6%	<b>-27%</b>	-4%
838.5578	17.6	M+FA-H	3	PC(37:5)	4	PC	ESI-	<b>32%</b>	11%	-19%
720.4971	17.8	M-H-H2O	0	PC(33:4)	4	PC	ESI-	<b>144%</b>	<b>71%</b>	-29%
900.5720	18.0	M+FA-H	5	PC(42:9)	1	PC	ESI-	<b>15%</b>	9%	-4%
796.5319	18.0	M+K	9	PC(34:2)	5	PC	ESI+	<b>-31%</b>	<b>-46%</b>	-9%
848.5407	18.1	M+Na	8	PC(38:4(OH))	4	PC	ESI+	-21%	<b>-36%</b>	-5%
846.5788	18.4	M+Cl	0	PC(38:3)	5	PC	ESI-	<b>-22%</b>	<b>-27%</b>	-5%
846.5788	18.4	M+FA-H	10	PC(36:2(OH))	5	PC	ESI-	<b>-22%</b>	<b>-27%</b>	-5%
860.5211	18.4	M+Cl	8	PC(38:4(OH))	2	PC	ESI-	<b>-15%</b>	<b>-24%</b>	-5%
876.5775	18.6	M+FA-H	2	PC(40:7)	1	PC	ESI-	<b>13%</b>	<b>18%</b>	11%
892.5275	19.4	M+K	3	PC(42:10)	2	PC	ESI+	-20%	<b>-38%</b>	-6%
840.5770	19.7	M+FA-H	1	PC(37:4)	3	PC	ESI-	<b>25%</b>	<b>45%</b>	<b>22%</b>
772.5308	19.9	M-H-H2O	3	PC(37:6)	3	PC	ESI-	8%	<b>29%</b>	<b>25%</b>
792.5907	19.9	M+H	1	PC(P-38:5)	6	PC	ESI+	<b>-17%</b>	<b>-18%</b>	-2%
792.5907	19.9	M+H	1	PC(O-38:6)	6	PC	ESI+	<b>-17%</b>	<b>-18%</b>	-2%
792.5907	19.9	M+Na	4	PC(O-36:3)	6	PC	ESI+	<b>-17%</b>	<b>-18%</b>	-2%
792.5907	19.9	M+Na	4	PC(P-36:2)	6	PC	ESI+	<b>-17%</b>	<b>-18%</b>	-2%
748.5818	20.3	M+H	4	PC(33:0)	3	PC	ESI+	4%	<b>-21%</b>	-16%
848.5946	20.3	M+Cl	1	PC(38:2)	4	PC	ESI-	<b>-20%</b>	<b>-11%</b>	6%
862.5632	20.3	M+FA-H	3	PC(39:7)	3	PC	ESI-	-7%	-4%	<b>13%</b>
828.6042	20.5	M+H+HCOONa	6	PC(P-35:0)	9	PC	ESI+	-15%	<b>-35%</b>	-5%
718.5726	20.7	M+H	3	PC(P-32:0)	6	PC	ESI+	-5%	<b>-36%</b>	<b>-20%</b>
718.5726	20.7	M+H	3	PC(O-32:1)	6	PC	ESI+	-5%	<b>-36%</b>	<b>-20%</b>
824.5707	20.8	M+Na	9	PC(36:2(OH))	8	PC	ESI+	-13%	<b>-30%</b>	5%
824.5707	20.8	M+H+HCOONa	9	PC(P-35:2)	8	PC	ESI+	-13%	<b>-30%</b>	5%
844.5658	20.9	M+Cl	4	PC(38:4)	4	PC	ESI-	13%	<b>31%</b>	<b>25%</b>

m/z	t <sub>R</sub> min	Adduct	Error ppm	Name	IDs/mf	Class	Mode	% of change		
								CS-t vs CS-b	TR-t vs TR-b	TR-t vs CS-t
820.5664	21.2	M+Cl	5	PC(36:2)	3	PC	ESI-	-8%	<b>-27%</b>	-2%
720.5879	21.2	M+H	3	PC(O-32:0)	3	PC	ESI+	-4%	<b>-32%</b>	<b>-22%</b>
764.5771	21.6	M+FA-H	6	PC(O-32:0)	3	PC	ESI-	-6%	<b>-13%</b>	-4%
762.6010	22.0	M+H	0	PC(34:0)	3	PC	ESI+	4%	<b>-33%</b>	-18%
820.6198	22.1	M+H	2	PC(P-40:5)	7	PC	ESI+	-8%	<b>-27%</b>	-2%
820.6198	22.1	M+H	2	PC(O-40:6)	7	PC	ESI+	-8%	<b>-27%</b>	-2%
820.6198	22.1	M+Na	1	PC(P-38:2)	7	PC	ESI+	-8%	<b>-27%</b>	-2%
820.6198	22.1	M+Na	1	PC(O-38:3)	7	PC	ESI+	-8%	<b>-27%</b>	-2%
820.6198	22.1	M+H-H <sub>2</sub> O	2	PC(40:4)	7	PC	ESI+	-8%	<b>-27%</b>	-2%
838.5946	22.3	M+FA-H	3	PC(P-38:4)	4	PC	ESI-	-9%	3%	<b>24%</b>
838.5946	22.3	M+FA-H	3	PC(O-38:5)	4	PC	ESI-	-9%	3%	<b>24%</b>
822.6364	22.6	M+H	1	PC(P-40:4)	5	PC	ESI+	1%	<b>-25%</b>	0%
822.6364	22.6	M+H	1	PC(O-40:5)	5	PC	ESI+	1%	<b>-25%</b>	0%
822.6364	22.6	M+Na	2	PC(P-38:1)	5	PC	ESI+	1%	<b>-25%</b>	0%
822.6364	22.6	M+Na	2	PC(O-38:2)	5	PC	ESI+	1%	<b>-25%</b>	0%
822.6364	22.6	M+H-H <sub>2</sub> O	1	PC(40:3)	5	PC	ESI+	1%	<b>-25%</b>	0%
972.7389	22.8	M+Na	0	PC(48:4)	2	PC	ESI+	<b>-26%</b>	<b>-41%</b>	-22%
856.6497	23.0	M+K	7	PC(O-39:0)	5	PC	ESI+	-13%	<b>-45%</b>	-19%
738.5488	13.9	M+H-H <sub>2</sub> O	7	PE(37:3)	2	PE	ESI+	<b>-17%</b>	<b>-30%</b>	-9%
822.5289	15.2	M+FA-H	0	PE(39:6)	3	PE	ESI-	<b>40%</b>	8%	-16%
836.5401	16.5	M+FA-H	6	PE(P-40:6(OH))	3	PE	ESI-	<b>16%</b>	-5%	-9%
812.5429	16.8	M+FA-H	2	PE(P-38:4)(OH)	3	PE	ESI-	8%	<b>22%</b>	19%
840.5329	17.3	M+Cl	2	PE(41:6)	4	PE	ESI-	<b>-12%</b>	-5%	<b>16%</b>
770.5673	17.4	M+H	3	PE(38:3)	6	PE	ESI+	-6%	<b>-27%</b>	-4%
770.5673	17.4	M+Na	0	PE(36:0)	6	PE	ESI+	-6%	<b>-27%</b>	-4%
844.5300	17.5	M+K	6	PE(41:6)	2	PE	ESI+	-13%	<b>-31%</b>	-6%

m/z	t <sub>R</sub> min	Adduct	Error ppm	Name	IDs/mf	Class	Mode	% of change		
								CS-t vs CS-b	TR-t vs TR-b	TR-t vs CS-t
838.5578	17.6	M+Cl	7	PE(P-42:6)	4	PE	ESI-	<b>32%</b>	11%	-19%
838.5578	17.6	M+FA-H	3	PE(40:5)	4	PE	ESI-	<b>32%</b>	11%	-19%
720.4971	17.8	M-H	0	PE(P-36:5)	4	PE	ESI-	<b>144%</b>	<b>71%</b>	-29%
720.4971	17.8	M-H-H <sub>2</sub> O	0	PE(36:4)	4	PE	ESI-	<b>144%</b>	<b>71%</b>	-29%
720.4971	17.8	M-H-H <sub>2</sub> O	0	PE(P-36:4(OH))	4	PE	ESI-	<b>144%</b>	<b>71%</b>	-29%
796.5319	18.0	M+Na	9	PE(P-40:7)	5	PE	ESI+	<b>-31%</b>	<b>-46%</b>	-9%
796.5319	18.0	M+K	9	PE(37:2)	5	PE	ESI+	<b>-31%</b>	<b>-46%</b>	-9%
796.5319	18.0	M+H-H <sub>2</sub> O	5	PE(42:9)	5	PE	ESI+	<b>-31%</b>	<b>-46%</b>	-9%
848.5407	18.1	M+H+HCOONa	1	PE(39:5)	4	PE	ESI+	-21%	<b>-36%</b>	-5%
846.5788	18.4	M+Cl	0	PE(41:3)	5	PE	ESI-	<b>-22%</b>	<b>-27%</b>	-5%
768.5484	19.5	M-H	8	PE(38:3)	3	PE	ESI-	<b>-14%</b>	<b>-23%</b>	<b>-11%</b>
840.5770	19.7	M+FA-H	1	PE(40:4)	3	PE	ESI-	<b>25%</b>	<b>45%</b>	<b>22%</b>
772.5308	19.9	M-H	3	PE(P-40:7)	3	PE	ESI-	8%	<b>29%</b>	<b>25%</b>
772.5308	19.9	M-H-H <sub>2</sub> O	3	PE(40:6)	3	PE	ESI-	8%	<b>29%</b>	<b>25%</b>
792.5907	19.9	M+H-H <sub>2</sub> O	1	PE(41:4)	6	PE	ESI+	<b>-17%</b>	<b>-18%</b>	-2%
850.5588	20.0	M+H+HCOONa	3	PE(39:4)	3	PE	ESI+	-17%	<b>-23%</b>	9%
716.5222	20.2	M-H	2	PE(34:1)	2	PE	ESI-	<b>-29%</b>	-1%	38%
748.5818	20.3	M+H	4	PE(36:0)	3	PE	ESI+	4%	<b>-21%</b>	-16%
848.5946	20.3	M+Cl	1	PE(41:2)	4	PE	ESI-	<b>-20%</b>	<b>-11%</b>	6%
862.5632	20.3	M+FA-H	3	PE(42:7)	3	PE	ESI-	-7%	-4%	<b>13%</b>
748.5310	20.3	M-H	3	PE(P-38:5)	3	PE	ESI-	<b>24%</b>	<b>34%</b>	19%
748.5310	20.3	M-H	3	PE(O-38:6)	3	PE	ESI-	<b>24%</b>	<b>34%</b>	19%
748.5310	20.3	M-H-H <sub>2</sub> O	4	PE(P-38:4(OH))	3	PE	ESI-	<b>24%</b>	<b>34%</b>	19%
828.6042	20.5	M+H+HCOONa	6	PC(O-35:1)	9	PE	ESI+	-15%	<b>-35%</b>	-5%
828.6042	20.5	M+H+HCOONa	6	PE(P-38:0)	9	PE	ESI+	-15%	<b>-35%</b>	-5%
718.5726	20.7	M+H	3	PE(O-35:1)	6	PE	ESI+	-5%	<b>-36%</b>	<b>-20%</b>

m/z	t <sub>R</sub> min	Adduct	Error ppm	Name	IDs/mf	Class	Mode	% of change		
								CS-t vs CS-b	TR-t vs TR-b	TR-t vs CS-t
718.5726	20.7	M+H	3	PE(P-35:0)	6	PE	ESI+	-5%	<b>-36%</b>	<b>-20%</b>
824.5707	20.8	M+H+HCOONa	9	PE(O-38:3)	8	PE	ESI+	-13%	<b>-30%</b>	5%
824.5707	20.8	M+H+HCOONa	9	PE(P-38:2)	8	PE	ESI+	-13%	<b>-30%</b>	5%
876.5692	20.9	M+H+HCOONa	4	PE(41:5)	2	PE	ESI+	-23%	<b>-29%</b>	11%
844.5658	20.9	M+Cl	4	PE(41:4)	4	PE	ESI-	13%	<b>31%</b>	<b>25%</b>
762.5606	21.0	M+FA-H	7	PE(O-35:1)	4	PE	ESI-	-8%	<b>-16%</b>	-9%
770.5673	21.2	M-H	4	PE(38:2)	3	PE	ESI-	-9%	<b>-21%</b>	-2%
720.5879	21.2	M+H	3	PE(O-35:0)	3	PE	ESI+	-4%	<b>-32%</b>	<b>-22%</b>
764.5771	21.6	M+FA-H	6	PE(O-35:0)	3	PE	ESI-	-6%	<b>-13%</b>	-4%
700.5224	21.6	M-H	9	PE(P-34:1)	3	PE	ESI-	20%	16%	<b>4%</b>
700.5224	21.6	M-H	9	PE(O-34:2)	3	PE	ESI-	20%	16%	<b>4%</b>
700.5224	21.6	M-H-H <sub>2</sub> O	8	PE(34:0)	3	PE	ESI-	20%	16%	<b>4%</b>
762.6010	22.0	M+H	0	PE(37:0)	3	PE	ESI+	4%	<b>-33%</b>	-18%
820.6198	22.1	M+H-H <sub>2</sub> O	2	PE(43:4)	7	PE	ESI+	-8%	<b>-27%</b>	-2%
818.5539	22.2	M+Cl	9	PE(39:3)	3	PE	ESI-	<b>25%</b>	<b>40%</b>	<b>31%</b>
838.5946	22.3	M+FA-H	3	PE(P-38:4)	4	PE	ESI-	-9%	3%	<b>24%</b>
856.6497	23.0	M+K	7	PE(O-42:0)	5	PE	ESI+	-13%	<b>-45%</b>	-19%
828.6503	23.6	M-H	2	PE(42:1)	4	PE	ESI-	<b>-25%</b>	<b>-44%</b>	-21%
854.6563	23.7	M-H	10	PE(44:2)	1	PE	ESI-	-16%	<b>-33%</b>	-18%
842.6664	24.5	M-H	2	PE(43:1)	3	PE	ESI-	<b>-25%</b>	<b>-47%</b>	<b>-26%</b>
723.5189	15.0	M+Cl	4	PE-Cer(d36:1)	2	PE-Cer	ESI-	<b>-11%</b>	<b>-13%</b>	-3%
759.5622	15.8	M+FA-H	5	PE-Cer(d38:2)	1	PE-Cer	ESI-	<b>-17%</b>	0%	<b>22%</b>
659.5107	16.1	M-H	4	PE-Cer(d34:1)	2	PE-Cer	ESI-	-10%	<b>-13%</b>	5%
715.5697	19.5	M-H	9	PE-Cer(d38:1)	3	PE-Cer	ESI-	<b>-20%</b>	-11%	14%
629.4607	19.7	M+H	7	PE-Cer(d32:3)	1	PE-Cer	ESI+	-10%	<b>-34%</b>	<b>-40%</b>
145.0615	1.1	M-H	2	Dipeptide (Gly Ala)	4	Peptide	ESI-	4%	<b>9%</b>	0%

m/z	t <sub>R</sub> min	Adduct	Error ppm	Name	IDs/mf	Class	Mode	% of change		
								CS-t vs CS-b	TR-t vs TR-b	TR-t vs CS-t
229.1536	1.1	M+H	5	Dipeptide (Leu Pro/Ile Pro)	1	Peptide	ESI+	<b>-47%</b>	<b>-48%</b>	3%
313.0646	1.2	M+Cl	6	Dipeptide (Glu Met)	1	Peptide	ESI-	<b>-19%</b>	-6%	6%
510.3562	1.3	M+H-H <sub>2</sub> O	10	Tetrapeptide	5	Peptide	ESI+	<b>37%</b>	3%	-9%
616.2863	1.4	M-H	4	Tetrapeptide	1	Peptide	ESI-	<b>39%</b>	<b>18%</b>	-7%
171.0773	1.7	M-H	1	Dipeptide (Gly Pro)	5	Peptide	ESI-	<b>-16%</b>	-7%	5%
171.0773	1.7	M-H-H <sub>2</sub> O	2	Dipeptide(Ala Thr)	5	Peptide	ESI-	<b>-16%</b>	-7%	5%
189.0874	1.7	M-H	4	Dipeptide (Ala Thr)	5	Peptide	ESI-	<b>-18%</b>	-7%	6%
233.0775	1.7	M-H	2	Dipeptide (Thr Asp/ Glu Ser)	3	Peptide	ESI-	<b>-17%</b>	-6%	7%
233.0775	1.7	M+FA-H	2	Dipeptide (Gly Hyp)	3	Peptide	ESI-	<b>-17%</b>	-6%	7%
247.0931	1.7	M-H	2	Dipeptide (Gln Pro)	2	Peptide	ESI-	<b>-24%</b>	-9%	10%
247.0931	1.7	M+FA-H	2	Dipeptide (Ser Pro/ Ala Hyp)	2	Peptide	ESI-	<b>-24%</b>	-9%	10%
291.0832	1.7	M+FA-H	1	Dipeptide (Asp Hyp)	3	Peptide	ESI-	<b>-26%</b>	-9%	10%
313.0646	1.7	M+Cl	6	Dipeptide (Glu Met)	1	Peptide	ESI-	<b>-23%</b>	-8%	10%
203.1029	1.8	M-H	4	Dipeptide (Val Ser)	2	Peptide	ESI-	<b>-24%</b>	-9%	8%
269.0748	1.8	M+Cl	7	Dipeptide (Ile Cys/ Leu Cys)	1	Peptide	ESI-	<b>-23%</b>	-9%	9%
215.0660	1.8	M-H-H <sub>2</sub> O	3	Dipeptide (Gln Ser/ Asp Thr)	1	Peptide	ESI-	<b>-13%</b>	-5%	5%
255.0582	1.8	M+Cl	3	Dipeptide (Val Cys/ Ala Met)	1	Peptide	ESI-	<b>-11%</b>	-4%	4%
444.1037	5.2	M+Cl	0	Tripeptide	1	Peptide	ESI-	<b>-21%</b>	<b>-19%</b>	16%
533.2904	12.3	M-H	9	Tetrapeptide	1	Peptide	ESI-	<b>-25%</b>	<b>-41%</b>	-10%
556.2169	13.9	M-H	1	Tetrapeptide	1	Peptide	ESI-	<b>-15%</b>	<b>-23%</b>	-4%
485.2725	14.0	M-H	1	Tetrapeptide	1	Peptide	ESI-	<b>-28%</b>	<b>-43%</b>	-14%
547.3206	14.0	M+FA-H	1	Tetrapeptide	1	Peptide	ESI-	<b>-25%</b>	<b>-49%</b>	-21%
566.2467	14.0	M-H	2	Tetrapeptide	1	Peptide	ESI-	<b>-19%</b>	<b>-35%</b>	-13%
576.2752	14.0	M+Cl	5	Tetrapeptide	1	Peptide	ESI-	<b>-18%</b>	<b>-43%</b>	<b>-21%</b>
435.2330	14.0	M-H	7	Tetrapeptide/ Tripeptide	1	Peptide	ESI-	<b>-49%</b>	<b>-75%</b>	-40%
910.5038	15.7	M-H	2	Kinetensin 1-7		Peptide	ESI-	-5%	<b>-28%</b>	-8%

m/z	t <sub>R</sub> min	Adduct	Error ppm	Name	IDs/mf	Class	Mode	% of change		
								CS-t vs CS-b	TR-t vs TR-b	TR-t vs CS-t
1052.5002	18.3	M+H+HCOONa	7	Adrenorphin	1	Peptide	ESI+	<b>-11%</b>	<b>-21%</b>	<b>-11%</b>
984.5316	20.7	M+H-H2O	10	Angiotensin A	1	Peptide	ESI+	-1%	10%	<b>25%</b>
855.5083	13.3	M-H	9	PGP(36:1)	1	PGP	ESI-	<b>-16%</b>	<b>-27%</b>	-10%
711.5008	13.3	M-H-H2O	6	PG(P-34:2)	3	PG	ESI-	<b>-28%</b>	<b>-31%</b>	-4%
711.5008	13.3	M-H-H2O	6	PG(O-34:3)	3	PG	ESI-	<b>-28%</b>	<b>-31%</b>	-4%
787.5208	13.3	M-H-H2O	9	PG(P-40:6)	1	PG	ESI-	<b>-17%</b>	<b>-25%</b>	-10%
844.6115	13.8	M+NH4	6	PG(40:4)	3	PG	ESI+	<b>-22%</b>	<b>-39%</b>	-8%
887.6716	14.0	M-H	3	PG(44:1)	2	PG	ESI-	<b>-28%</b>	<b>-52%</b>	-26%
869.5282	15.0	M-H	6	PG(44:10)	1	PG	ESI-	-5%	<b>-8%</b>	-8%
807.5268	16.2	M+Cl	6	PG(P-37:2)	1	PG	ESI-	-8%	<b>-9%</b>	1%
859.5721	16.2	M+FA-H	2	PG(39:3)	1	PG	ESI-	<b>-17%</b>	<b>-15%</b>	-1%
805.5251	16.2	M+FA-H	2	PG(35:2)	1	PG	ESI-	<b>-13%</b>	<b>-14%</b>	2%
791.5843	16.3	M-H	4	PG(37:0)	2	PG	ESI-	<b>-19%</b>	<b>-16%</b>	0%
909.5441	17.2	M+Cl	3	PG(44:8)	2	PG	ESI-	<b>-15%</b>	-2%	<b>19%</b>
749.5757	17.5	M-H	7	PG(O-35:0)	3	PG	ESI-	<b>-24%</b>	<b>-24%</b>	-12%
831.5427	17.6	M+FA-H	4	PG(37:3)	1	PG	ESI-	<b>-8%</b>	<b>-7%</b>	10%
799.5888	17.8	M-H-H2O	4	PG(39:1)	1	PG	ESI-	<b>-18%</b>	3%	<b>34%</b>
661.4832	18.8	M+H-H2O	4	PG(O-30:1)	5	PG	ESI+	<b>44%</b>	13%	-25%
661.4832	18.8	M+H-H2O	4	PG(P-30:0)	5	PG	ESI+	<b>44%</b>	13%	-25%
911.5656	19.5	M+Cl	9	PG(44:7)	2	PG	ESI-	<b>-18%</b>	-7%	<b>14%</b>
828.6042	20.5	M+NH4	9	PG(P-40:4)	9	PG	ESI+	-15%	<b>-35%</b>	-5%
828.6042	20.5	M+NH4	9	PG(O-40:5)	9	PG	ESI+	-15%	<b>-35%</b>	-5%
853.6392	21.3	M-H-H2O	8	PG(43:2)	1	PG	ESI-	<b>-12%</b>	0%	<b>26%</b>
803.6226	22.2	M-H	7	PG(P-39:0)	4	PG	ESI-	<b>-16%</b>	-10%	<b>17%</b>
803.6226	22.2	M-H	7	PG(O-39:1)	4	PG	ESI-	<b>-16%</b>	-10%	<b>17%</b>
856.6497	23.0	M+NH4	8	PG(P-42:4)	5	PG	ESI+	-13%	<b>-45%</b>	-19%

m/z	t <sub>R</sub> min	Adduct	Error ppm	Name	IDs/mf	Class	Mode	% of change		
								CS-t vs CS-b	TR-t vs TR-b	TR-t vs CS-t
911.6445	24.0	M+Cl	8	PG(43:0)	2	PG	ESI-	-15%	<b>-18%</b>	16%
909.5481	25.7	M+Cl	7	PG(44:8)	2	PG	ESI-	-8%	<b>-23%</b>	-17%
887.5585	26.5	M+Cl	1	PG(42:5)	2	PG	ESI-	-11%	<b>-17%</b>	-6%
911.5631	26.6	M+Cl	6	PG(44:7)	2	PG	ESI-	-15%	<b>-31%</b>	-22%
833.5008	13.5	M+K	8	PI(O-32:1)	1	PI	ESI+	<b>-23%</b>	<b>-41%</b>	-21%
833.5008	13.5	M+K	8	PI(P-32:0)	1	PI	ESI+	<b>-23%</b>	<b>-41%</b>	-21%
881.5165	13.5	M+H	1	PI(38:7)	2	PI	ESI+	-5%	<b>-43%</b>	-28%
881.5165	13.5	M+Na	2	PI(36:4)	2	PI	ESI+	-5%	<b>-43%</b>	-28%
907.5294	13.6	M+H	4	PI(40:8)	1	PI	ESI+	-17%	<b>-49%</b>	<b>-33%</b>
861.5311	16.0	M+K	7	PI(O-34:1)	2	PI	ESI+	<b>-26%</b>	<b>-41%</b>	-13%
861.5311	16.0	M+K	7	PI(P-34:0)	2	PI	ESI+	<b>-26%</b>	<b>-41%</b>	-13%
997.5046	16.0	M+H+HCOONa	0	PI(42:11)	1	PI	ESI+	<b>-25%</b>	<b>-36%</b>	-8%
887.5618	16.5	M+H	3	PI(38:4)	2	PI	ESI+	-8%	<b>-25%</b>	-4%
887.5618	16.5	M+Na	0	PI(36:1)	2	PI	ESI+	-8%	<b>-25%</b>	-4%
841.5579	17.2	M-H-H <sub>2</sub> O	2	PI(P-37:2)	2	PI	ESI-	<b>-17%</b>	-7%	<b>21%</b>
909.5441	17.2	M-H	6	PI(40:6)	2	PI	ESI-	<b>-15%</b>	-2%	<b>19%</b>
889.5630	17.7	M+K	7	PI(O-36:1)	2	PI	ESI+	-12%	<b>-15%</b>	6%
889.5630	17.7	M+K	7	PI(P-36:0)	2	PI	ESI+	-12%	<b>-15%</b>	6%
796.5319	18.0	M+NH <sub>4</sub>	2	PI(P-31:1)	5	PI	ESI+	<b>-31%</b>	<b>-46%</b>	-9%
911.5656	19.5	M-H	0	PI(40:5)	2	PI	ESI-	<b>-18%</b>	-7%	<b>14%</b>
849.5530	19.7	M-H	4	PI(35:1)	1	PI	ESI-	<b>-15%</b>	<b>-18%</b>	-7%
937.5795	20.2	M-H	2	PI(42:6)	1	PI	ESI-	-1%	<b>11%</b>	<b>23%</b>
824.5707	20.8	M+NH <sub>4</sub>	7	PI(O-33:2)	8	PI	ESI+	-13%	<b>-30%</b>	5%
824.5707	20.8	M+NH <sub>4</sub>	7	PI(P-33:1)	8	PI	ESI+	-13%	<b>-30%</b>	5%
967.5695	21.2	M-H-H <sub>2</sub> O	7	Hex-PI(33:0)	1	PI	ESI-	-8%	<b>-20%</b>	-4%
969.6282	21.8	M+K	10	PI(P-42:2)	1	PI	ESI+	-14%	<b>-27%</b>	2%

m/z	t <sub>R</sub> min	Adduct	Error ppm	Name	IDs/mf	Class	Mode	% of change		
								CS-t vs CS-b	TR-t vs TR-b	TR-t vs CS-t
939.5994	22.2	M-H	3	PI(42:5)	1	PI	ESI-	<b>-12%</b>	-7%	<b>13%</b>
965.6170	22.7	M-H	5	PI(44:6)	2	PI	ESI-	<b>-16%</b>	<b>-12%</b>	<b>17%</b>
965.6170	22.7	M+Cl	9	PI(P-42:2)	2	PI	ESI-	<b>-16%</b>	<b>-12%</b>	<b>17%</b>
911.6445	24.0	M-H-H <sub>2</sub> O	7	PI(P-42:2)	2	PI	ESI-	-15%	<b>-18%</b>	16%
945.6269	24.0	M+K	8	PI(O-40:1)	2	PI	ESI+	-33%	<b>-56%</b>	-25%
945.6269	24.0	M+K	8	PI(P-40:0)	2	PI	ESI+	-33%	<b>-56%</b>	-25%
971.6468	24.1	M+Na	10	PI(42:1)	1	PI	ESI+	-21%	<b>-37%</b>	7%
967.6303	24.2	M-H	2	PI(44:5)	1	PI	ESI-	<b>-23%</b>	<b>-27%</b>	4%
913.6600	25.6	M-H-H <sub>2</sub> O	7	PI(O-42:2)	2	PI	ESI-	<b>-18%</b>	<b>-28%</b>	-2%
913.6600	25.6	M-H-H <sub>2</sub> O	7	PI(P-42:1)	2	PI	ESI-	<b>-18%</b>	<b>-28%</b>	-2%
909.5481	25.7	M-H	2	PI(40:6)	2	PI	ESI-	-8%	<b>-23%</b>	-17%
973.6654	26.1	M+H	9	PI(44:3)	2	PI	ESI+	<b>-32%</b>	<b>-47%</b>	-3%
973.6654	26.1	M+Na	6	PI(42:0)	2	PI	ESI+	<b>-32%</b>	<b>-47%</b>	-3%
929.5346	26.3	M+Cl	3	PI(P-40:6)	2	PI	ESI-	<b>-23%</b>	<b>-40%</b>	-15%
929.5346	26.3	M+FA-H	6	PI(38:5)	2	PI	ESI-	<b>-23%</b>	<b>-40%</b>	-15%
887.5585	26.5	M-H	8	PI(38:3)	2	PI	ESI-	-11%	<b>-17%</b>	-6%
911.5631	26.6	M-H	3	PI(40:5)	2	PI	ESI-	-15%	<b>-31%</b>	-22%
431.3878	15.5	M+H	1	alpha-tocopherol	4	Prenol lipid	ESI+	-24%	<b>-31%</b>	-6%
844.6115	13.8	M+H	6	PS(40:2)	3	PS	ESI+	<b>-22%</b>	<b>-39%</b>	-8%
916.6239	14.0	M+FA-H	5	PS(42:2)	1	PS	ESI-	<b>-28%</b>	<b>-56%</b>	<b>-29%</b>
906.6078	14.7	M+Cl	9	PS(42:2)	2	PS	ESI-	<b>-17%</b>	<b>-24%</b>	-1%
818.5526	14.9	M+FA-H	3	PS(P-36:1)	3	PS	ESI-	<b>-29%</b>	<b>-35%</b>	-9%
818.5526	14.9	M+FA-H	3	PS(O-36:2)	3	PS	ESI-	<b>-29%</b>	<b>-35%</b>	-9%
822.5289	15.2	M-H	0	PS(39:5)	3	PS	ESI-	<b>40%</b>	8%	-16%
842.5231	15.6	M+FA-H	5	PS(37:4)	2	PS	ESI-	-7%	<b>-27%</b>	-5%
820.5649	16.5	M+FA-H	8	PS(P-36:0)	2	PS	ESI-	<b>-20%</b>	<b>-14%</b>	1%

m/z	t <sub>R</sub> min	Adduct	Error ppm	Name	IDs/mf	Class	Mode	% of change		
								CS-t vs CS-b	TR-t vs TR-b	TR-t vs CS-t
820.5649	16.5	M+FA-H	8	PS(O-36:1)	2	PS	ESI-	<b>-20%</b>	<b>-14%</b>	1%
836.5401	16.5	M-H	6	PS(40:5)	3	PS	ESI-	<b>16%</b>	-5%	-9%
868.5327	16.7	M+FA-H	2	PS(39:5)	1	PS	ESI-	<b>-16%</b>	<b>-25%</b>	-3%
812.5429	16.8	M-H	2	PS(38:3)	3	PS	ESI-	8%	<b>22%</b>	19%
856.5359	16.9	M+FA-H	2	PS(38:4)	1	PS	ESI-	<b>-14%</b>	<b>-30%</b>	-4%
890.5148	17.0	M+H+HCOONa	1	PS(39:6)	2	PS	ESI+	-29%	<b>-38%</b>	-16%
840.5329	17.3	M+FA-H	8	PS(O-38:5)	4	PS	ESI-	<b>-12%</b>	-5%	<b>16%</b>
840.5329	17.3	M+FA-H	8	PS(P-38:4)	4	PS	ESI-	<b>-12%</b>	-5%	<b>16%</b>
770.5673	17.4	M+H-H <sub>2</sub> O	3	PS(P-37:1)	6	PS	ESI+	-6%	<b>-27%</b>	-4%
770.5673	17.4	M+H-H <sub>2</sub> O	3	PS(O-37:2)	6	PS	ESI+	-6%	<b>-27%</b>	-4%
834.5276	17.4	M-H	2	PS(40:6)	1	PS	ESI-	-15%	<b>-23%</b>	-4%
844.5300	17.5	M+H+HCOONa	1	PS(35:1)	2	PS	ESI+	-13%	<b>-31%</b>	-6%
838.5578	17.6	M-H	3	PS(40:4)	4	PS	ESI-	<b>32%</b>	11%	-19%
902.5178	17.7	M+FA-H	1	PS(42:9)	1	PS	ESI-	<b>-12%</b>	-8%	7%
848.5407	18.1	M+H	3	PS(41:7)	4	PS	ESI+	-21%	<b>-36%</b>	-5%
848.5407	18.1	M+Na	1	PS(39:4)	4	PS	ESI+	-21%	<b>-36%</b>	-5%
846.5788	18.4	M+FA-H	10	PS(P-38:1)	5	PS	ESI-	<b>-22%</b>	<b>-27%</b>	-5%
846.5788	18.4	M+FA-H	10	PS(O-38:2)	5	PS	ESI-	<b>-22%</b>	<b>-27%</b>	-5%
714.5056	18.4	M-H-H <sub>2</sub> O	2	PS(P-33:0)	2	PS	ESI-	<b>-31%</b>	<b>-28%</b>	5%
714.5056	18.4	M-H-H <sub>2</sub> O	2	PS(O-33:1)	2	PS	ESI-	<b>-31%</b>	<b>-28%</b>	5%
860.5211	18.4	M+Cl	0	PS(39:4)	2	PS	ESI-	<b>-15%</b>	<b>-24%</b>	-5%
876.5775	18.6	M-H	2	PS(43:6)	1	PS	ESI-	<b>13%</b>	<b>18%</b>	11%
820.5484	19.3	M-H	2	PS(O-40:6)	3	PS	ESI-	-12%	<b>-28%</b>	-16%
820.5484	19.3	M-H	2	PS(P-40:5)	3	PS	ESI-	-12%	<b>-28%</b>	-16%
820.5484	19.3	M-H-H <sub>2</sub> O	1	PS(40:4)	3	PS	ESI-	-12%	<b>-28%</b>	-16%
892.5275	19.4	M+H+HCOONa	4	PS(39:5)	2	PS	ESI+	-20%	<b>-38%</b>	-6%

m/z	t <sub>R</sub> min	Adduct	Error ppm	Name	IDs/mf	Class	Mode	% of change		
								CS-t vs CS-b	TR-t vs TR-b	TR-t vs CS-t
768.5484	19.5	M-H-H2O	8	PS(P-37:1)	3	PS	ESI-	<b>-14%</b>	<b>-23%</b>	<b>-11%</b>
768.5484	19.5	M-H-H2O	8	PS(O-37:2)	3	PS	ESI-	<b>-14%</b>	<b>-23%</b>	<b>-11%</b>
840.5770	19.7	M-H	1	PS(40:3)	3	PS	ESI-	<b>25%</b>	<b>45%</b>	<b>22%</b>
908.5591	19.8	M+FA-H	8	PS(42:6)	1	PS	ESI-	<b>28%</b>	<b>61%</b>	<b>34%</b>
884.5577	19.9	M+Cl	0	PS(O-42:6)	2	PS	ESI-	-6%	<b>-21%</b>	2%
884.5577	19.9	M+FA-H	10	PS(40:4)	2	PS	ESI-	-6%	<b>-21%</b>	2%
850.5588	20.0	M+H	1	PS(41:6)	3	PS	ESI+	-17%	<b>-23%</b>	9%
850.5588	20.0	M+Na	2	PS(39:3)	3	PS	ESI+	-17%	<b>-23%</b>	9%
864.5526	20.2	M+Cl	0	PS(39:2)	1	PS	ESI-	<b>-15%</b>	-5%	12%
916.5812	20.2	M+Cl	3	PS(43:4)	1	PS	ESI-	<b>-20%</b>	<b>-12%</b>	7%
716.5222	20.2	M-H-H2O	1	PS(O-33:0)	2	PS	ESI-	<b>-29%</b>	-1%	38%
744.5516	20.3	M-H-H2O	4	PS(O-35:0)	1	PS	ESI-	<b>-15%</b>	<b>-12%</b>	8%
848.5946	20.3	M+FA-H	9	PS(P-38:0)	4	PS	ESI-	<b>-20%</b>	<b>-11%</b>	6%
848.5946	20.3	M+FA-H	9	PS(O-38:1)	4	PS	ESI-	<b>-20%</b>	<b>-11%</b>	6%
862.5632	20.3	M-H	3	PS(42:6)	3	PS	ESI-	-7%	-4%	<b>13%</b>
828.6042	20.5	M+H	9	PS(O-40:3)	9	PS	ESI+	-15%	<b>-35%</b>	-5%
828.6042	20.5	M+H	9	PS(P-40:2)	9	PS	ESI+	-15%	<b>-35%</b>	-5%
828.6042	20.5	M+Na	6	PS(O-38:0)	9	PS	ESI+	-15%	<b>-35%</b>	-5%
828.6042	20.5	M+H-H2O	8	PS(40:1)	9	PS	ESI+	-15%	<b>-35%</b>	-5%
824.5707	20.8	M+Na	9	PS(P-38:1)	8	PS	ESI+	-13%	<b>-30%</b>	5%
824.5707	20.8	M+Na	9	PS(O-38:2)	8	PS	ESI+	-13%	<b>-30%</b>	5%
876.5692	20.9	M+Na	4	PS(41:4)	2	PS	ESI+	-23%	<b>-29%</b>	11%
844.5658	20.9	M+FA-H	6	PS(P-38:2)	4	PS	ESI-	13%	<b>31%</b>	<b>25%</b>
844.5658	20.9	M+FA-H	6	PS(O-38:3)	4	PS	ESI-	13%	<b>31%</b>	<b>25%</b>
912.5565	20.9	M+Cl	4	PS(43:6)	1	PS	ESI-	3%	<b>23%</b>	<b>23%</b>
762.5606	21.0	M-H	6	PS(O-35:0)	4	PS	ESI-	-8%	<b>-16%</b>	-9%

m/z	t <sub>R</sub> min	Adduct	Error ppm	Name	IDs/mf	Class	Mode	% of change		
								CS-t vs CS-b	TR-t vs TR-b	TR-t vs CS-t
820.5664	21.2	M+FA-H	6	PS(P-36:0)	3	PS	ESI-	-8%	<b>-27%</b>	-2%
820.5664	21.2	M+FA-H	6	PS(O-36:1)	3	PS	ESI-	-8%	<b>-27%</b>	-2%
770.5673	21.2	M-H-H2O	3	PS(P-37:0)	3	PS	ESI-	-9%	<b>-21%</b>	-2%
770.5673	21.2	M-H-H2O	3	PS(O-37:1)	3	PS	ESI-	-9%	<b>-21%</b>	-2%
898.5794	21.2	M+FA-H	2	PS(41:4)	1	PS	ESI-	<b>-30%</b>	<b>-49%</b>	-20%
888.5538	21.2	M+Cl	1	PS(41:4)	1	PS	ESI-	-12%	<b>-26%</b>	-6%
818.5539	22.2	M+FA-H	2	PS(P-36:1)	3	PS	ESI-	<b>25%</b>	<b>40%</b>	<b>31%</b>
818.5539	22.2	M+FA-H	2	PS(O-36:2)	3	PS	ESI-	<b>25%</b>	<b>40%</b>	<b>31%</b>
838.5946	22.3	M-H-H2O	2	PS(41:2)	4	PS	ESI-	-9%	3%	<b>24%</b>
856.6497	23.0	M+H	8	PS(P-42:2)	5	PS	ESI+	-13%	<b>-45%</b>	-19%
856.6497	23.0	M+H-H2O	8	PS(42:1)	5	PS	ESI+	-13%	<b>-45%</b>	-19%
828.6503	23.6	M-H-H2O	2	PS(O-41:0)	4	PS	ESI-	<b>-25%</b>	<b>-44%</b>	-21%
842.6664	24.5	M-H-H2O	3	PS(O-42:0)	3	PS	ESI-	<b>-25%</b>	<b>-47%</b>	<b>-26%</b>
902.5115	16.5	M+H+HCOONa	5	PS(40:7)	1	PS	ESI+	<b>-41%</b>	<b>-61%</b>	-10%
954.5420	19.4	M+H+HCOONa	5	PS(44:9)	1	PS	ESI+	8%	13%	<b>26%</b>
930.5413	19.5	M+H+HCOONa	6	PS(42:7)	1	PS	ESI+	-14%	<b>-31%</b>	2%
254.0903	1.1	M+H	8	Neopterin	3	Pterin	ESI+	<b>-87%</b>	-54%	253%
254.0903	1.1	M+H	8	Threoneopterin	3	Pterin	ESI+	<b>-87%</b>	-54%	253%
254.0903	1.1	M+H	8	Hydroxysepiapterin	3	Pterin	ESI+	<b>-87%</b>	-54%	253%
705.0507	1.7	M-H-H2O	6	Molybdopterin-AMP		Pterin	ESI-	<b>-18%</b>	-7%	6%
170.0924	1.6	M+NH4	0	N1-Methyl-pyridone-carboxamide	2	Pyridine and deriv.	ESI+	<b>22%</b>	<b>108%</b>	17%
156.0768	1.6	M+NH4	0	Nicotinamide N-oxide	4	Pyridine and deriv.	ESI+	<b>-15%</b>	-5%	11%
271.2424	34.8	M+H-H2O	1	all-trans-13,14-dihydroretinol	2	Retinoid	ESI+	-16%	<b>-32%</b>	-16%
709.5031	13.3	M+Cl	4	SM(d32:1)	1	SM	ESI-	<b>-22%</b>	<b>-27%</b>	-5%
717.5502	13.6	M+H	5	SM(d34:1(OH))	1	SM	ESI+	<b>-20%</b>	<b>-26%</b>	-7%
723.5189	15.0	M+Cl	4	SM(d33:1)	2	SM	ESI-	<b>-11%</b>	<b>-13%</b>	-3%

m/z	t <sub>R</sub> min	Adduct	Error ppm	Name	IDs/mf	Class	Mode	% of change		
								CS-t vs CS-b	TR-t vs TR-b	TR-t vs CS-t
771.5639	15.4	M+FA-H	3	SM(d36:3)	1	SM	ESI-	<b>-31%</b>	<b>-19%</b>	<b>26%</b>
749.5757	17.5	M+FA-H	8	SM(d34:0)	3	SM	ESI-	<b>-24%</b>	<b>-24%</b>	-12%
717.5839	17.6	M+H	9	SM(d35:1)	1	SM	ESI+	-12%	<b>-26%</b>	-1%
803.6226	22.2	M+FA-H	8	SM(d38:1)	4	SM	ESI-	<b>-16%</b>	-10%	<b>17%</b>
813.6831	24.1	M+H	2	SM(d42:2)	1	SM	ESI+	-13%	<b>-28%</b>	4%
821.6259	24.2	M+Cl	6	SM(d40:1)	1	SM	ESI-	<b>-30%</b>	<b>-37%</b>	5%
849.6614	26.9	M+Cl	1	SM(d42:1)	1	SM	ESI-	<b>-23%</b>	<b>-25%</b>	-3%
863.7021	33.2	M+Na	5	SM(d44:2)	1	SM	ESI+	-23%	<b>-32%</b>	-6%
482.3312	1.3	M+NH <sub>4</sub>	3	Vitamin D3 sulfoconjugate	1	Steroid	ESI+	<b>28%</b>	-4%	-12%
409.3441	13.6	M+Na	0	Cholestanone	2	Steroid	ESI+	-26%	<b>-44%</b>	-13%
409.3441	13.6	M+Na	0	Cholesterol (cholestenol)	2	Steroid	ESI+	-26%	<b>-44%</b>	-13%
431.3878	15.5	M+H	1	Hydroxysteroid	4	Steroid	ESI+	-24%	<b>-31%</b>	-6%
431.3878	15.5	M+H	1	Dimethyl-cholestendiol	4	Steroid	ESI+	-24%	<b>-31%</b>	-6%
431.3878	15.5	M+H	1	hydroxymethyl-methyl-cholestenol	4	Steroid	ESI+	-24%	<b>-31%</b>	-6%
337.2722	22.0	M+H	5	Pregnanetriol	2	Steroid	ESI+	-28%	<b>-50%</b>	-26%
257.2266	34.8	M+H-H <sub>2</sub> O	0	Androstenol	2	Steroid	ESI+	-21%	<b>-28%</b>	-6%
257.2266	34.8	M+H-H <sub>2</sub> O	0	Oxosteroid	2	Steroid	ESI+	-21%	<b>-28%</b>	-6%
271.2424	34.8	M+H-H <sub>2</sub> O	1	Methyl-androstenol	2	Steroid	ESI+	-16%	<b>-32%</b>	-16%
259.2413	34.8	M+H-H <sub>2</sub> O	3	Hydroxysteroid	2	Steroid	ESI+	-15%	<b>-31%</b>	-15%
259.2413	34.8	M+H-H <sub>2</sub> O	3	Androstanol	2	Steroid	ESI+	-15%	<b>-31%</b>	-15%
287.2722	34.8	M+H-H <sub>2</sub> O	4	Pregnan-21-ol	1	Steroid	ESI+	-17%	<b>-31%</b>	-14%
521.3249	14.0	M-H-H <sub>2</sub> O	3	Methoxyphenyloxyethyl esterdihydroxycholanoic acid	3	Steroid and deriv.	ESI-	<b>-23%</b>	<b>-45%</b>	-19%
493.3451	15.6	M+Cl	1	Hydroxyursanoic acid	6	Steroid and deriv.	ESI-	<b>-21%</b>	<b>-34%</b>	-15%
493.3451	15.6	M+Cl	1	Longispinogenin	6	Steroid and deriv.	ESI-	<b>-21%</b>	<b>-34%</b>	-15%
335.0464	1.1	M+Cl	3	Carboxytolbutamide	3	Sulfuric acid ester	ESI-	<b>-9%</b>	<b>-9%</b>	-7%

m/z	t <sub>R</sub> min	Adduct	Error ppm	Name	IDs/mf	Class	Mode	% of change		
								CS-t vs CS-b	TR-t vs TR-b	TR-t vs CS-t
335.0464	1.1	M+FA-H	8	Hydroxy-(hydroxyphenyl)-valeric acid-O-sulphate	3	Sulfuric acid ester	ESI-	<b>-9%</b>	<b>-9%</b>	-7%
942.7590	31.5	M+NH4	5	TG(58:11)	1	TG	ESI+	<b>126%</b>	36%	-39%
963.6830	31.5	M+K	1	TG(58:11)	1	TG	ESI+	<b>114%</b>	70%	-22%
923.7113	32.0	M+H	1	TG(58:12)	2	TG	ESI+	<b>52%</b>	24%	-15%
923.7113	32.0	M+Na	2	TG(56:9)	2	TG	ESI+	<b>52%</b>	24%	-15%
949.7315	33.0	M+H	4	TG(60:13)	2	TG	ESI+	<b>63%</b>	<b>46%</b>	-3%
949.7315	33.0	M+Na	6	TG(58:10)	2	TG	ESI+	<b>63%</b>	<b>46%</b>	-3%
944.7682	33.1	M+NH4	2	TG(58:10)	1	TG	ESI+	<b>81%</b>	<b>21%</b>	-24%
965.7024	33.1	M+K	3	TG(58:10)	1	TG	ESI+	<b>55%</b>	<b>54%</b>	8%
863.7021	33.2	M+Na	9	TG(51:4)	1	TG	ESI+	-23%	<b>-32%</b>	-6%
941.7009	34.1	M+K	2	TG(56:8)	1	TG	ESI+	19%	<b>25%</b>	-1%
867.6844	34.3	M+K	1	TG(50:3)	2	TG	ESI+	-16%	<b>-28%</b>	<b>-25%</b>
867.6844	34.3	M+H-H2O	2	TG(55:10)	2	TG	ESI+	-16%	<b>-28%</b>	<b>-25%</b>
661.5334	34.4	M+Na	7	TG(36:0)	2	TG	ESI+	-24%	<b>-31%</b>	-17%
967.7159	34.5	M+K	1	TG(58:9)	1	TG	ESI+	<b>49%</b>	<b>67%</b>	16%
893.6991	34.7	M+K	0	TG(52:4)	2	TG	ESI+	<b>-14%</b>	<b>-15%</b>	-6%
893.6991	34.7	M+H-H2O	3	TG(57:11)	2	TG	ESI+	<b>-14%</b>	<b>-15%</b>	-6%
1013.7028	34.7	M+K	3	TG(62:14)	1	TG	ESI+	-20%	<b>-31%</b>	-9%
687.5470	34.8	M+Na	10	TG(38:1)	2	TG	ESI+	<b>-12%</b>	<b>-14%</b>	1%
972.8019	35.0	M+NH4	0	TG(60:10)	1	TG	ESI+	<b>52%</b>	<b>55%</b>	-9%
943.7208	35.1	M+K	6	TG(56:7)	2	TG	ESI+	21%	<b>26%</b>	1%
943.7208	35.1	M+H-H2O	3	TG(61:14)	2	TG	ESI+	21%	<b>26%</b>	1%
521.3249	14.0	M+FA-H	5	Dihydroxyphenyldidehydronorvitamin D3	3	Vitamin and deriv.	ESI-	<b>-23%</b>	<b>-45%</b>	-19%
493.3451	15.6	M+Cl	1	Dihydroxydimethyldidehydrodihomo-19-norvitamin D3	6	Vitamin and deriv.	ESI-	<b>-21%</b>	<b>-34%</b>	-15%

<i>m/z</i>	<i>t<sub>R</sub></i> min	Adduct	Error ppm	Name	IDs/ <i>mf</i>	Class	Mode	% of change		
								CS-t vs CS-b	TR-t vs TR-b	TR-t vs CS-t
493.3451	15.6	M+Cl	1	Dihydroxytrihomovitamin D3	6	Vitamin and deriv.	ESI-	<b>-21%</b>	<b>-34%</b>	-15%
493.3451	15.6	M+Cl	1	Dihydroxydimethylhomovitamin D3	6	Vitamin and deriv.	ESI-	<b>-21%</b>	<b>-34%</b>	-15%
493.3451	15.6	M+Cl	1	Dhydroxydimethylhomoepivitamin D3	6	Vitamin and deriv.	ESI-	<b>-21%</b>	<b>-34%</b>	-15%

IDs/*mf*: number of identifications by *molecular feature*. The percentage of change in bold are significant by univariate analysis ( $p < 0.05$ ).

**Tabela Suplementar 2** – Identificação putativa de *molecular features* significativos pela análise de urina por RPLC-MS modo positivo e HILIC-MS modo positivo e negativo.

m/z	t <sub>R</sub> min	Adduct	Error ppm	Name	IDs /mf	Analysis	Class	% of change								
								TR-t vs CS-t	TR-s vs CS-s	CS-t vs CS-b	CS-s vs CS-b	CS-s vs CS-t	TR-t vs TR-b	TR-s vs TR-b	TR-s vs TR-t	
203.0829	6.2	M-H-H2O	4	4-Aminohippurate	4	HILIC(-)	Acyl glycine	22%	10%	<b>-32%</b>	<b>-28%</b>	6%	-11%	-15%	-4%	
172.0971	5.8	M-H	5	Hexanoylglycine	4	HILIC(-)	Acyl glycine	16%	14%	-35%	<b>-36%</b>	-3%	-30%	<b>-32%</b>	-4%	
178.0513	5.8	M-H	2	Hippuric acid	2	HILIC(-)	Acyl glycine	-9%	27%	63%	49%	-9%	80%	<b>128%</b>	27%	
180.0669	5.7	M+H	8	Hippuric acid	2	HILIC(+)	Acyl glycine	-14%	13%	115%	<b>85%</b>	-14%	106%	<b>133%</b>	13%	
162.0554	7.1	M+H-H2O	2	Hippuric acid	2	RP(+)	Acyl glycine	13%	16%	49%	39%	-7%	<b>121%</b>	<b>112%</b>	-4%	
172.0969	2.0	M+H-H2O	0	Hydroxyhexanoylglycine	2	RP(+)	Acyl glycine	2%	18%	-48%	<b>-30%</b>	36%	-36%	1%	58%	
172.0974	7.3	M+H-H2O	3	Hydroxyhexanoylglycine	1	RP(+)	Acyl glycine	86%	22%	-44%	<b>-54%</b>	-18%	-14%	<b>-54%</b>	-47%	
196.0621	6.8	M+H	9	Hydroxyhippuric acid	4	RP(+)	Acyl glycine	-50%	-34%	<b>202%</b>	160%	-14%	102%	129%	14%	
208.0623	5.7	M-H	4	Hydroxyphenylacetyl-glycine	3	HILIC(-)	Acyl glycine	-19%	30%	227%	80%	-45%	101%	<b>77%</b>	-12%	
204.0672	5.7	M-H-H2O	5	Hydroxyphenylpropionyl-glycine	6	HILIC(-)	Acyl glycine	-15%	42%	18%	-1%	-16%	29%	<b>80%</b>	40%	
227.0812	3.6	M+H-H2O	2	Indolylacryloylglycine	1	HILIC(+)	Acyl glycine	-23%	108%	<b>205%</b>	114%	-30%	166%	<b>401%</b>	89%	
174.0553	2.7	M-H-H2O	1	Methylhippuric acid	6	HILIC(-)	Acyl glycine	51%	101%	-54%	-22%	68%	<b>-53%</b>	6%	123%	
130.0501	2.0	M+H	2	N-Acryloylglycine	6	RP(+)	Acyl glycine	-1%	-5%	<b>-23%</b>	<b>-24%</b>	-2%	-9%	-15%	-7%	
222.0902	5.9	M+Cl	0	N-Heptanoylglycine	3	HILIC(-)	Acyl glycine	36%	<b>28%</b>	7%	13%	5%	34%	33%	-1%	
174.0553	2.7	M-H-H2O	1	N-Phenylacetyl-glycine	6	HILIC(-)	Acyl glycine	51%	101%	-54%	-22%	68%	<b>-53%</b>	6%	123%	
132.0452	1.7	M-H-H2O	2	Phenylglycine	4	HILIC(-)	Acyl glycine	<b>-35%</b>	-28%	-4%	23%	28%	-1%	41%	43%	
132.0455	5.8	M-H-H2O	4	Phenylglycine	4	HILIC(-)	Acyl glycine	4%	33%	51%	26%	-16%	109%	<b>123%</b>	7%	
134.0592	1.7	M+H-H2O	6	Phenylglycine	4	HILIC(+)	Acyl glycine	<b>-35%</b>	-19%	-3%	12%	15%	-10%	28%	43%	
134.0595	7.2	M+H-H2O	4	Phenylglycine	4	RP(+)	Acyl glycine	<b>-26%</b>	<b>-30%</b>	-10%	16%	29%	-4%	18%	23%	
239.1757	1.5	M+K	7	Tridecanol	1	RP(+)	Alcohol	-32%	-6%	<b>187%</b>	<b>171%</b>	-6%	<b>194%</b>	<b>281%</b>	30%	
132.0454	1.7	M+H-H2O	6	2-Formylaminobenzaldehyde	2	HILIC(+)	Aldehyde	<b>-36%</b>	-16%	1%	10%	9%	-10%	29%	43%	
132.0449	7.2	M+H-H2O	3	2-Formylaminobenzaldehyde	2	RP(+)	Aldehyde	-13%	<b>-35%</b>	14%	<b>56%</b>	37%	20%	24%	3%	

m/z	t <sub>R</sub> min	Adduct	Error ppm	Name	IDs /mf	Analysis	Class	% of change							
								TR-t vs CS-t	TR-s vs CS-s	CS-t vs CS-b	CS-s vs CS-b	CS-s vs CS-t	TR-t vs TR-b	TR-s vs TR-b	TR-s vs TR-t
130.0863	1.5	M+H	0	Acetamidobutanal	2	RP(+)	Aldehyde	38%	201%	-19%	18%	46%	31%	<b>319%</b>	<b>219%</b>
139.0513	1.6	M+K	7	Hexanal	6	RP(+)	Aldehyde	-20%	-6%	<b>-29%</b>	<b>-35%</b>	-7%	<b>-38%</b>	<b>-33%</b>	9%
211.0718	6.4	M+K	8	Hydroperoxynonenal	4	RP(+)	Aldehyde	-13%	-8%	<b>159%</b>	<b>91%</b>	-26%	<b>192%</b>	<b>129%</b>	-22%
139.0513	1.6	M+K	7	Methylpentanal	6	RP(+)	Aldehyde	-20%	-6%	<b>-29%</b>	<b>-35%</b>	-7%	<b>-38%</b>	<b>-33%</b>	9%
134.0611	5.8	M-H	0	2-Phenylacetamide	3	HILIC(-)	Amide/ Fatty amide	2%	24%	75%	55%	-11%	125%	<b>142%</b>	8%
153.0659	4.7	M+H	0	N1-Methyl-pyridone-carboxamide	1	RP(+)	Amide/ Fatty amide	0%	14%	25%	15%	-8%	<b>46%</b>	<b>52%</b>	4%
153.0658	6.1	M+H	0	N1-Methyl-pyridone-carboxamide	1	RP(+)	Amide/ Fatty amide	1%	11%	26%	15%	-9%	<b>41%</b>	<b>41%</b>	0%
259.1055	2.4	M+Na	1	N-Acetyl-5-methoxykynuramine	4	RP(+)	Amide/ Fatty amide	-7%	10%	<b>-36%</b>	<b>-40%</b>	-7%	-28%	-20%	10%
278.1243	1.6	M+H	0	S-(2-Methylpropionyl)-dihydrolipoamide	2	RP(+)	Amide/ Fatty amide	8%	1%	<b>-37%</b>	<b>-38%</b>	-2%	<b>-24%</b>	<b>-31%</b>	-9%
360.0698	7.3	M+K	1	S-Glutaryldihydrolipoamide	2	RP(+)	Amide/ Fatty amide	12%	<b>54%</b>	<b>57%</b>	31%	-17%	20%	37%	15%
127.1229	0.9	M+H-H <sub>2</sub> O	1	1-(3-Aminopropyl)-4-aminobutanal	2	RP(+)	Amine/Polyamine	59%	62%	<b>-56%</b>	<b>-56%</b>	-2%	-33%	-33%	0%
118.0507	7.1	M+FA-H	4	Aminoacetone	3	HILIC(-)	Amine/Polyamine	38%	<b>50%</b>	-26%	-22%	5%	28%	48%	15%
209.0921	4.3	M+H	0	Formyl-5-hydroxykynurenamine	3	RP(+)	Amine/Polyamine	1034%	<b>1004%</b>	-71%	-77%	-22%	188%	<b>119%</b>	-24%
255.1586	1.7	M+K	4	Heptanoylcholine	1	RP(+)	Amine/Polyamine	<b>-42%</b>	-10%	<b>100%</b>	<b>68%</b>	-16%	55%	<b>101%</b>	30%
188.1754	1.0	M+H	2	N-Acetylspermidine	1	RP(+)	Amine/Polyamine	9%	4%	<b>-32%</b>	<b>-33%</b>	-1%	-26%	-29%	-5%
154.0955	6.3	M+Na	3	N-Carbamoylputrescine	1	HILIC(+)	Amine/Polyamine	<b>-69%</b>	-50%	-55%	-24%	71%	-78%	-38%	180%
154.0617	5.1	M-H-H <sub>2</sub> O	0	2-Oxoarginine	2	HILIC(-)	Amino acid and deriv.	-29%	32%	<b>103%</b>	71%	-16%	54%	<b>140%</b>	56%
156.0771	9.2	M+H-H <sub>2</sub> O	1	2-Oxoarginine	4	HILIC(+)	Amino acid and deriv.	1%	1%	<b>-39%</b>	<b>-32%</b>	10%	-28%	-21%	10%
242.0155	1.4	M+H	1	3-Mercaptolactate-cysteine disulfide	1	RP(+)	Amino acid and deriv.	-30%	-1%	<b>-67%</b>	<b>-74%</b>	-21%	-66%	-62%	13%

m/z	t <sub>R</sub> min	Adduct	Error ppm	Name	IDs /mf	Analysis	Class	% of change								
								TR-t vs CS-t	TR-s vs CS-s	CS-t vs CS-b	CS-s vs CS-b	CS-s vs CS-t	TR-t vs TR-b	TR-s vs TR-b	TR-s vs TR-t	
195.0526	4.7	M+Cl	10	4-Acetamido-2-aminobutanoic acid	5	HILIC(-)	Amino acid and deriv.	-22%	22%	81%	83%	1%	40%	<b>121%</b>	58%	
130.0501	2.0	M+H-H2O	1	4-Hydroxyglutamate semialdehyde	6	RP(+)	Amino acid and deriv.	-1%	-5%	<b>-23%</b>	<b>-24%</b>	-2%	-9%	-15%	-7%	
222.0902	5.9	M+Cl	0	7-oxo-8-amino-nonanoic acid	3	HILIC(-)	Amino acid and deriv.	36%	<b>28%</b>	7%	13%	5%	34%	33%	-1%	
195.0526	4.7	M+Cl	10	Acetyl-2,4-diaminobutyrate	5	HILIC(-)	Amino acid and deriv.	-22%	22%	81%	83%	1%	40%	<b>121%</b>	58%	
189.1237	1.5	M+H	2	Acetyllysine	2	RP(+)	Amino acid and deriv.	2%	-4%	<b>-22%</b>	<b>-15%</b>	9%	-13%	-11%	2%	
130.0501	2.0	M+H-H2O	1	Acetylserine	6	RP(+)	Amino acid and deriv.	-1%	-5%	<b>-23%</b>	<b>-24%</b>	-2%	-9%	-15%	-7%	
204.0672	5.7	M-H-H2O	5	Acetyltyrosine	6	HILIC(-)	Amino acid and deriv.	-15%	42%	18%	-1%	-16%	29%	<b>80%</b>	40%	
132.1019	1.8	M+H	0	Alloisoleucine	3	RP(+)	Amino acid and deriv.	18%	16%	<b>-43%</b>	<b>-44%</b>	-2%	-17%	-20%	-4%	
132.1021	2.0	M+H	1	Alloisoleucine	3	RP(+)	Amino acid and deriv.	37%	11%	<b>-82%</b>	<b>-79%</b>	17%	-60%	-62%	-5%	
120.044	5.7	M+H-H2O	3	Aminobenzoic acid	2	HILIC(+)	Amino acid and deriv.	-15%	15%	49%	31%	-12%	42%	<b>70%</b>	19%	
138.0546	7.5	M+H	3	Aminobenzoic acid	2	HILIC(+)	Amino acid and deriv.	-17%	-4%	<b>69%</b>	<b>69%</b>	0%	<b>82%</b>	<b>110%</b>	16%	
176.012	8.3	M+K	8	Aminobenzoic acid	2	HILIC(+)	Amino acid and deriv.	<b>-50%</b>	-13%	<b>330%</b>	<b>182%</b>	-34%	444%	<b>522%</b>	14%	
138.0555	1.5	M+H	4	Aminobenzoic acid	2	RP(+)	Amino acid and deriv.	-17%	-8%	<b>95%</b>	<b>91%</b>	-2%	<b>131%</b>	<b>154%</b>	10%	
146.1175	1.3	M+H	0	Aminoheptanoic acid	2	RP(+)	Amino acid and deriv.	4%	1%	-93%	-81%	156%	<b>-95%</b>	<b>-87%</b>	150%	
146.1176	1.4	M+H	0	Aminoheptanoic acid	2	RP(+)	Amino acid and deriv.	-15%	1%	-94%	-87%	133%	<b>-96%</b>	<b>-90%</b>	177%	
160.1343	9.4	M+H	6	Aminooctanoic acid	3	HILIC(+)	Amino acid and deriv.	-26%	-3%	<b>-68%</b>	-49%	57%	<b>-80%</b>	<b>-58%</b>	<b>106%</b>	
198.0896	1.3	M+K	3	Aminooctanoic acid	1	RP(+)	Amino acid and deriv.	16%	-8%	-33%	-27%	9%	<b>-41%</b>	<b>-49%</b>	-13%	
160.1332	2.2	M+H	0	Aminooctanoic acid	1	RP(+)	Amino acid and deriv.	-8%	-7%	<b>-69%</b>	-44%	<b>79%</b>	<b>-76%</b>	<b>-56%</b>	<b>81%</b>	
140.0681	2.2	M+Na	1	Aminopentanoic acid	3	RP(+)	Amino acid and deriv.	-3%	11%	<b>57%</b>	<b>49%</b>	-5%	31%	<b>44%</b>	10%	
159.028	2.4	M+H-H2O	5	Ascorbic acid	8	RP(+)	Amino acid and deriv.	2%	-10%	-23%	<b>-29%</b>	-8%	-22%	<b>-36%</b>	-18%	
140.0681	2.2	M+Na	1	Betaine	3	RP(+)	Amino acid and deriv.	-3%	11%	<b>57%</b>	<b>49%</b>	-5%	31%	<b>44%</b>	10%	
144.1016	7.7	M+H	2	Crotonobetaine	2	HILIC(+)	Amino acid and deriv.	-14%	-7%	46%	-4%	-35%	<b>121%</b>	56%	-29%	
144.1021	1.3	M+H	2	Crotonobetaine	2	RP(+)	Amino acid and deriv.	35%	5%	-29%	-16%	18%	<b>-43%</b>	<b>-47%</b>	-8%	

m/z	t <sub>R</sub> min	Adduct	Error ppm	Name	IDs /mf	Analysis	Class	% of change							
								TR-t vs CS-t	TR-s vs CS-s	CS-t vs CS-b	CS-s vs CS-b	CS-s vs CS-t	TR-t vs TR-b	TR-s vs TR-b	TR-s vs TR-t
129.0659	1.2	M+H	0	Cyanoaminobutyric acid	6	RP(+)	Amino acid and deriv.	20%	21%	<b>-49%</b>	<b>-40%</b>	18%	-24%	-8%	20%
120.0125	8.0	M-H	0	Cysteine	1	HILIC(-)	Amino acid and deriv.	-23%	-10%	-27%	<b>-35%</b>	-11%	-29%	-26%	4%
239.018	8.0	M-H	6	Cystine	1	HILIC(-)	Amino acid and deriv.	-16%	-12%	<b>-40%</b>	<b>-42%</b>	-3%	-35%	-34%	2%
241.0303	1.1	M+H	3	Cystine	1	RP(+)	Amino acid and deriv.	-13%	-31%	<b>-55%</b>	<b>-50%</b>	11%	-41%	-48%	-12%
225.063	3.6	M+Cl	9	Diaminoheptanedioic acid	5	HILIC(-)	Amino acid and deriv.	-20%	82%	<b>136%</b>	85%	-21%	112%	<b>282%</b>	80%
191.1033	1.2	M+H	4	Diaminoheptanedioic acid	2	RP(+)	Amino acid and deriv.	<b>46%</b>	<b>31%</b>	<b>-27%</b>	<b>-24%</b>	4%	10%	3%	-6%
203.1504	1.1	M+H	1	Dimethyl-arginine	1	RP(+)	Amino acid and deriv.	0%	3%	<b>-22%</b>	<b>-23%</b>	-2%	<b>-22%</b>	<b>-22%</b>	1%
178.0513	5.8	M-H-H <sub>2</sub> O	4	Dopa	2	HILIC(-)	Amino acid and deriv.	-9%	27%	63%	49%	-9%	80%	<b>128%</b>	27%
180.0669	5.7	M+H-H <sub>2</sub> O	7	Dopa	2	HILIC(+)	Amino acid and deriv.	-14%	13%	115%	<b>85%</b>	-14%	106%	<b>133%</b>	13%
196.0621	6.8	M+H	9	Dopaquinone	4	RP(+)	Amino acid and deriv.	-50%	-34%	<b>202%</b>	160%	-14%	102%	129%	14%
157.0607	1.2	M+H-H <sub>2</sub> O	1	Formiminoglutamic acid	4	RP(+)	Amino acid and deriv.	16%	18%	<b>-53%</b>	<b>-47%</b>	13%	<b>-42%</b>	<b>-34%</b>	15%
175.0713	1.5	M+H	0	Formiminoglutamic acid	3	RP(+)	Amino acid and deriv.	48%	35%	<b>-54%</b>	<b>-44%</b>	21%	<b>-37%</b>	-31%	11%
238.0906	1.1	M+H	6	Fructoseglycine	2	RP(+)	Amino acid and deriv.	13%	-2%	-6%	-14%	-8%	-4%	<b>-24%</b>	<b>-21%</b>
130.0501	2.0	M+H-H <sub>2</sub> O	1	Glutamic acid	6	RP(+)	Amino acid and deriv.	-1%	-5%	<b>-23%</b>	<b>-24%</b>	-2%	-9%	-15%	-7%
129.0659	1.2	M+H-H <sub>2</sub> O	0	Glutamine	6	RP(+)	Amino acid and deriv.	20%	21%	<b>-49%</b>	<b>-40%</b>	18%	-24%	-8%	20%
154.0617	5.1	M-H	3	Histidine	2	HILIC(-)	Amino acid and deriv.	-29%	32%	<b>103%</b>	71%	-16%	54%	<b>140%</b>	56%
156.0771	9.2	M+H	2	Histidine	4	HILIC(+)	Amino acid and deriv.	1%	1%	<b>-39%</b>	<b>-32%</b>	10%	-28%	-21%	10%
156.0764	1.0	M+H	2	Histidine	1	RP(+)	Amino acid and deriv.	12%	4%	<b>-56%</b>	<b>-44%</b>	29%	<b>-48%</b>	-38%	20%
164.0747	7.4	M+H	4	Homomethionine	2	HILIC(+)	Amino acid and deriv.	7%	-2%	<b>-45%</b>	<b>-49%</b>	-7%	-18%	-30%	-15%
118.0507	7.1	M-H	2	Homoserine	3	HILIC(-)	Amino acid and deriv.	38%	<b>50%</b>	-26%	-22%	5%	28%	48%	15%
120.0645	7.3	M+H	9	Homoserine	5	HILIC(+)	Amino acid and deriv.	0%	16%	26%	15%	-9%	53%	<b>62%</b>	6%
149.0548	1.1	M+H	6	Hydroxyasparagine	1	RP(+)	Amino acid and deriv.	7%	-9%	-8%	-9%	-2%	-8%	<b>-22%</b>	-16%
146.0446	1.6	M+H-H <sub>2</sub> O	2	Hydroxy-glutamic acid	3	RP(+)	Amino acid and deriv.	-4%	-25%	<b>-39%</b>	<b>-32%</b>	11%	-27%	<b>-37%</b>	-13%
225.0854	2.5	M+H	7	Hydroxykynurenine	3	RP(+)	Amino acid and deriv.	<b>409%</b>	<b>458%</b>	-54%	-68%	-30%	94%	49%	-23%
197.0683	5.1	M+Cl	10	Hydroxylysine	1	HILIC(-)	Amino acid and deriv.	-29%	28%	<b>96%</b>	69%	-14%	49%	<b>131%</b>	55%

m/z	t <sub>R</sub> min	Adduct	Error ppm	Name	IDs /mf	Analysis	Class	% of change							
								TR-t vs CS-t	TR-s vs CS-s	CS-t vs CS-b	CS-s vs CS-b	CS-s vs CS-t	TR-t vs TR-b	TR-s vs TR-b	TR-s vs TR-t
132.1019	1.8	M+H	0	Isoleucine	3	RP(+)	Amino acid and deriv.	18%	16%	<b>-43%</b>	<b>-44%</b>	-2%	-17%	-20%	-4%
132.1021	2.0	M+H	1	Isoleucine	3	RP(+)	Amino acid and deriv.	37%	11%	<b>-82%</b>	<b>-79%</b>	17%	-60%	-62%	-5%
161.1284	1.0	M+H	0	Isoputrescine	2	RP(+)	Amino acid and deriv.	-20%	-19%	<b>-44%</b>	<b>-39%</b>	8%	-29%	-22%	10%
172.0971	5.8	M-H	5	Isovalerylsarcosine	4	HILIC(-)	Amino acid and deriv.	16%	14%	-35%	<b>-36%</b>	-3%	-30%	<b>-32%</b>	-4%
146.0446	1.6	M+H	1	Keto-glutamamic acid	3	RP(+)	Amino acid and deriv.	-4%	-25%	<b>-39%</b>	<b>-32%</b>	11%	-27%	<b>-37%</b>	-13%
209.0921	4.3	M+H	0	Kynurenine	3	RP(+)	Amino acid and deriv.	1034%	<b>1004%</b>	-71%	-77%	-22%	188%	<b>119%</b>	-24%
132.1019	1.8	M+H	0	Leucine	3	RP(+)	Amino acid and deriv.	18%	16%	<b>-43%</b>	<b>-44%</b>	-2%	-17%	-20%	-4%
132.1021	2.0	M+H	1	Leucine	3	RP(+)	Amino acid and deriv.	37%	11%	<b>-82%</b>	<b>-79%</b>	17%	-60%	-62%	-5%
129.1021	1.2	M+H-H <sub>2</sub> O	2	Lysine	2	RP(+)	Amino acid and deriv.	8%	6%	-15%	<b>-28%</b>	-14%	7%	-10%	-16%
161.1284	1.0	M+H	0	Methyl-lysine	2	RP(+)	Amino acid and deriv.	-20%	-19%	<b>-44%</b>	<b>-39%</b>	8%	-29%	-22%	10%
129.1021	1.2	M+H-H <sub>2</sub> O	1	Methylornithine	2	RP(+)	Amino acid and deriv.	8%	6%	-15%	<b>-28%</b>	-14%	7%	-10%	-16%
213.1008	3.1	M+K	5	N <sub>6</sub> ,N <sub>6</sub> -Dimethyl-Lysine	3	HILIC(+)	Amino acid and deriv.	-28%	20%	103%	69%	-17%	113%	<b>198%</b>	40%
175.1433	1.0	M+H	5	N <sub>6</sub> ,N <sub>6</sub> -Dimethyl-Lysine	1	RP(+)	Amino acid and deriv.	-2%	-10%	<b>-28%</b>	-23%	8%	-25%	-26%	-1%
157.0607	1.2	M+H-H <sub>2</sub> O	1	N-Acetylasparagine	4	RP(+)	Amino acid and deriv.	16%	18%	<b>-53%</b>	<b>-47%</b>	13%	<b>-42%</b>	<b>-34%</b>	15%
175.0713	1.5	M+H	0	N-Acetylasparagine	3	RP(+)	Amino acid and deriv.	48%	35%	<b>-54%</b>	<b>-44%</b>	21%	<b>-37%</b>	-31%	11%
127.1229	0.9	M+H-H <sub>2</sub> O	1	N-Acetylcadaverine	2	RP(+)	Amino acid and deriv.	59%	62%	<b>-56%</b>	<b>-56%</b>	-2%	-33%	-33%	0%
200.1047	1.1	M+H-H <sub>2</sub> O	8	N-Acetylcitrulline	3	RP(+)	Amino acid and deriv.	<b>146%</b>	<b>265%</b>	-54%	<b>-66%</b>	-26%	-22%	-15%	10%
265.0864	1.5	M+H	4	N-Acetylcystathionine	2	RP(+)	Amino acid and deriv.	141%	<b>132%</b>	7%	1%	-6%	73%	57%	-10%
189.0876	1.8	M+H	3	N-Acetylglutamine	3	RP(+)	Amino acid and deriv.	27%	18%	<b>-36%</b>	-30%	11%	-25%	-23%	3%
172.0971	5.8	M-H	5	N-Acetylisoleucine	4	HILIC(-)	Amino acid and deriv.	16%	14%	-35%	<b>-36%</b>	-3%	-30%	<b>-32%</b>	-4%
203.1396	1.8	M+H	3	N-Acetylisoputrescine	2	RP(+)	Amino acid and deriv.	23%	12%	-24%	<b>-27%</b>	-4%	-6%	-18%	-13%
172.0971	5.8	M-H	5	N-Acetylleucine	4	HILIC(-)	Amino acid and deriv.	16%	14%	-35%	<b>-36%</b>	-3%	-30%	<b>-32%</b>	-4%
172.0969	2.0	M+H-H <sub>2</sub> O	0	N-lactoyl-Valine	2	RP(+)	Amino acid and deriv.	2%	18%	-48%	<b>-30%</b>	36%	-36%	1%	58%
161.0908	1.1	M+H	8	N-Methyl-glutamine	3	RP(+)	Amino acid and deriv.	25%	-18%	6%	42%	34%	<b>59%</b>	39%	-13%

m/z	t <sub>R</sub> min	Adduct	Error ppm	Name	IDs /mf	Analysis	Class	% of change							
								TR-t vs CS-t	TR-s vs CS-s	CS-t vs CS-b	CS-s vs CS-b	CS-s vs CS-t	TR-t vs TR-b	TR-s vs TR-b	TR-s vs TR-t
130.0501	2.0	M+H	2	Oxo-proline (pyroglutamic acid)	6	RP(+)	Amino acid and deriv.	-1%	-5%	<b>-23%</b>	<b>-24%</b>	-2%	-9%	-15%	-7%
220.1181	6.0	M+H	1	Pantothenic acid	1	RP(+)	Amino acid and deriv.	-16%	0%	-18%	<b>-34%</b>	-19%	<b>-29%</b>	<b>-32%</b>	-3%
166.0866	3.8	M+H	2	Phenylalanine	1	RP(+)	Amino acid and deriv.	13%	9%	<b>-32%</b>	<b>-27%</b>	7%	-19%	-16%	3%
130.0863	1.5	M+H	0	Pipecolic acid	2	RP(+)	Amino acid and deriv.	38%	201%	-19%	18%	46%	31%	<b>319%</b>	<b>219%</b>
144.1016	7.7	M+H	2	Proline betaine	2	HILIC(+)	Amino acid and deriv.	-14%	-7%	46%	-4%	-35%	<b>121%</b>	56%	-29%
144.1021	1.3	M+H	1	Proline betaine	2	RP(+)	Amino acid and deriv.	35%	5%	-29%	-16%	18%	<b>-43%</b>	<b>-47%</b>	-8%
129.0659	1.2	M+H	0	Pyroglutamine	6	RP(+)	Amino acid and deriv.	20%	21%	<b>-49%</b>	<b>-40%</b>	18%	-24%	-8%	20%
130.0501	2.0	M+H	2	Pyrroline hydroxycarboxylic acid	6	RP(+)	Amino acid and deriv.	-1%	-5%	<b>-23%</b>	<b>-24%</b>	-2%	-9%	-15%	-7%
164.0747	7.4	M+H	4	S-(2-carboxypropyl)-Cysteamine	2	HILIC(+)	Amino acid and deriv.	7%	-2%	<b>-45%</b>	<b>-49%</b>	-7%	-18%	-30%	-15%
298.1155	6.4	M+Na	5	Saccharopine	5	RP(+)	Amino acid and deriv.	-11%	-18%	-14%	-15%	-2%	-17%	<b>-25%</b>	-9%
108.0122	1.8	M+H-H <sub>2</sub> O	6	Taurine	1	RP(+)	Amino acid and deriv.	-23%	-20%	<b>108%</b>	71%	-18%	55%	33%	-14%
118.0507	7.1	M-H	2	Threonine	3	HILIC(-)	Amino acid and deriv.	38%	<b>50%</b>	-26%	-22%	5%	28%	48%	15%
120.0645	7.3	M+H	9	Threonine	5	HILIC(+)	Amino acid and deriv.	0%	16%	26%	15%	-9%	53%	<b>62%</b>	6%
203.0829	6.2	M-H	1	Tryptophan	4	HILIC(-)	Amino acid and deriv.	22%	10%	<b>-32%</b>	<b>-28%</b>	6%	-11%	-15%	-4%
205.0986	7.0	M+H	7	Tryptophan	1	RP(+)	Amino acid and deriv.	36%	28%	-33%	<b>-33%</b>	0%	-18%	-23%	-6%
182.0815	2.3	M+H	2	Tyrosine	1	RP(+)	Amino acid and deriv.	14%	13%	<b>-34%</b>	<b>-28%</b>	9%	-19%	-12%	8%
140.0681	2.2	M+Na	1	Valine	3	RP(+)	Amino acid and deriv.	-3%	11%	<b>57%</b>	<b>49%</b>	-5%	31%	<b>44%</b>	10%
183.087	5.7	M+Na	2	3-Dehydrocarnitine	2	HILIC(+)	Carnitine/ Acylcarn.	<b>81%</b>	<b>108%</b>	-54%	-49%	11%	-33%	-15%	27%
146.1175	1.3	M+H	0	3-Dehydroxycarnitine	2	RP(+)	Carnitine/ Acylcarn.	4%	1%	-93%	-81%	156%	<b>-95%</b>	<b>-87%</b>	150%
146.1176	1.4	M+H	0	3-Dehydroxycarnitine	2	RP(+)	Carnitine/ Acylcarn.	-15%	1%	-94%	-87%	133%	<b>-96%</b>	<b>-90%</b>	177%
204.1238	3.1	M+H	4	Acetylcarnitine	1	RP(+)	Carnitine/ Acylcarn.	16%	9%	<b>-91%</b>	<b>-80%</b>	110%	<b>-88%</b>	-76%	<b>98%</b>
290.1611	6.8	M+H	4	Adipoylcarnitine	2	RP(+)	Carnitine/ Acylcarn.	<b>78%</b>	<b>65%</b>	-19%	-20%	0%	45%	34%	-8%
232.1563	7.9	M+H	9	Butyrylcarnitine	2	HILIC(+)	Carnitine/ Acylcarn.	-22%	9%	-30%	-18%	17%	-32%	12%	<b>65%</b>

m/z	t <sub>R</sub> min	Adduct	Error ppm	Name	IDs /mf	Analysis	Class	% of change							
								TR-t vs CS-t	TR-s vs CS-s	CS-t vs CS-b	CS-s vs CS-b	CS-s vs CS-t	TR-t vs TR-b	TR-s vs TR-b	TR-s vs TR-t
232.1556	6.9	M+H	5	Butyrylcarnitine	2	RP(+)	Carnitine/ Acylcarn.	-12%	8%	-23%	-6%	23%	-21%	20%	<b>51%</b>
206.1034	8.6	M+FA-H	0	Carnitine	1	HILIC(-)	Carnitine/ Acylcarn.	-30%	13%	-95%	-88%	123%	-96%	-85%	<b>259%</b>
162.1128	8.4	M+H	2	Carnitine	1	HILIC(+)	Carnitine/ Acylcarn.	-24%	11%	<b>-77%</b>	<b>-63%</b>	61%	<b>-81%</b>	<b>-56%</b>	<b>138%</b>
162.113	1.2	M+H	3	Carnitine	1	RP(+)	Carnitine/ Acylcarn.	-15%	23%	<b>-82%</b>	<b>-68%</b>	79%	<b>-84%</b>	<b>-58%</b>	<b>157%</b>
276.1449	6.1	M+H	3	Glutarylcarnitine	1	RP(+)	Carnitine/ Acylcarn.	3%	-2%	<b>-34%</b>	<b>-23%</b>	18%	-15%	-4%	12%
248.1509	8.2	M+H	7	Hydroxybutyrylcarnitine	1	HILIC(+)	Carnitine/ Acylcarn.	27%	-7%	-84%	-69%	86%	<b>-80%</b>	-73%	36%
276.1804	7.0	M+H	1	Hydroxyhexanoylcarnitine	1	RP(+)	Carnitine/ Acylcarn.	13%	-6%	<b>-56%</b>	-50%	14%	-47%	-50%	-6%
244.155	7.8	M+H-H2O	2	Hydroxyisovalerylcarnitine	2	HILIC(+)	Carnitine/ Acylcarn.	0%	15%	<b>-32%</b>	<b>-28%</b>	6%	-15%	4%	22%
262.1654	6.4	M+H	2	Hydroxyisovalerylcarnitine	1	RP(+)	Carnitine/ Acylcarn.	34%	18%	<b>-32%</b>	-17%	21%	<b>-23%</b>	-17%	7%
246.1713	7.7	M+H-H2O	5	Hydroxyvalerylcarnitine	3	HILIC(+)	Carnitine/ Acylcarn.	10%	18%	<b>-67%</b>	<b>-47%</b>	57%	<b>-59%</b>	-31%	<b>69%</b>
246.1699	7.3	M+H-H2O	1	Hydroxyvalerylcarnitine	3	RP(+)	Carnitine/ Acylcarn.	4%	26%	-44%	-22%	39%	-44%	-6%	<b>68%</b>
232.1563	7.9	M+H	9	Isobutyrylcarnitine	2	HILIC(+)	Carnitine/ Acylcarn.	-22%	9%	-30%	-18%	17%	-32%	12%	<b>65%</b>
232.1556	6.9	M+H	5	Isobutyrylcarnitine	2	RP(+)	Carnitine/ Acylcarn.	-12%	8%	-23%	-6%	23%	-21%	20%	<b>51%</b>
246.1699	7.3	M+H	0	Isovalerylcarnitine	3	RP(+)	Carnitine/ Acylcarn.	4%	26%	-44%	-22%	39%	-44%	-6%	<b>68%</b>
246.1713	7.7	M+H	5	Isovalerylcarnitine	3	HILIC(+)	Carnitine/ Acylcarn.	10%	18%	<b>-67%</b>	<b>-47%</b>	57%	<b>-59%</b>	-31%	<b>69%</b>
290.1611	6.8	M+H	4	Methylglutarylcarnitine	2	RP(+)	Carnitine/ Acylcarn.	<b>78%</b>	<b>65%</b>	-19%	-20%	0%	45%	34%	-8%
302.2313	6.8	M+H	4	Nonanoylcarnitine	1	HILIC(+)	Carnitine/ Acylcarn.	-31%	11%	69%	53%	-9%	50%	<b>118%</b>	45%
288.2177	7.1	M+H	3	Octanoylcarnitine	1	HILIC(+)	Carnitine/ Acylcarn.	-6%	-8%	<b>-55%</b>	-38%	36%	-39%	-20%	32%
218.1391	6.3	M+H	2	Propionylcarnitine	1	RP(+)	Carnitine/ Acylcarn.	18%	40%	<b>-92%</b>	-84%	106%	-90%	-75%	<b>145%</b>
244.155	7.8	M+H	3	Tiglylcarnitine	2	HILIC(+)	Carnitine/ Acylcarn.	0%	15%	<b>-32%</b>	<b>-28%</b>	6%	-15%	4%	22%
246.1713	7.7	M+H	5	Valerylcarnitine	3	HILIC(+)	Carnitine/ Acylcarn.	10%	18%	<b>-67%</b>	<b>-47%</b>	57%	<b>-59%</b>	-31%	<b>69%</b>
246.1699	7.3	M+H	0	Valerylcarnitine	3	RP(+)	Carnitine/ Acylcarn.	4%	26%	-44%	-22%	39%	-44%	-6%	<b>68%</b>
327.1544	1.7	M+K	8	1,2-Dihexanoyl-sn-glycerol	1	RP(+)	DG	<b>-64%</b>	-26%	<b>187%</b>	192%	2%	13%	135%	107%
360.0698	7.3	M+Na	2	3-Indole carboxylic acid glucuronide	2	RP(+)	Glucuronide	12%	<b>54%</b>	<b>57%</b>	31%	-17%	20%	37%	15%

m/z	t <sub>R</sub> min	Adduct	Error ppm	Name	IDs /mf	Analysis	Class	% of change								
								TR-t vs CS-t	TR-s vs CS-s	CS-t vs CS-b	CS-s vs CS-b	CS-s vs CS-t	TR-t vs TR-b	TR-s vs TR-b	TR-s vs TR-t	
397.1138	1.2	M+H-H <sub>2</sub> O	2	5-(3',4',5'-trihydroxyphenyl)- gamma-valerolactone-O- methyl-5'-O-glucuronide	2	RP(+)	Glucoronide	31%	13%	<b>-48%</b>	-38%	20%	-38%	-36%	4%	
378.0982	7.1	M+K	10	5-Hydroxytryptophol glucuronide	1	RP(+)	Glucoronide	-5%	16%	<b>93%</b>	<b>102%</b>	4%	<b>119%</b>	<b>179%</b>	28%	
326.0887	6.8	M+H	5	Dihydroxy-1H-indole glucuronide I	1	RP(+)	Glucoronide	<b>-33%</b>	<b>-28%</b>	-3%	3%	6%	-17%	-6%	14%	
379.0847	1.2	M+Na	0	Glucopyranuronosylhexose	2	RP(+)	Glucoronide	28%	28%	<b>-30%</b>	-24%	9%	<b>-22%</b>	-14%	10%	
394.0754	6.9	M+Na	3	Salicyluric beta-glucuronide	1	RP(+)	Glucoronide	<b>-42%</b>	-62%	-33%	-41%	-12%	-42%	-67%	-43%	
146.0929	1.7	M+H	3	4-Guanidinobutyric acid	1	RP(+)	Guanidines	<b>-35%</b>	-14%	47%	31%	-11%	20%	42%	18%	
132.0762	7.4	M+H	4	Creatine	3	HILIC(+)	Guanidines	132%	25%	-62%	-55%	17%	-44%	<b>-65%</b>	-37%	
152.022	1.1	M+K	1	Creatinine	1	RP(+)	Guanidines	-14%	-14%	<b>47%</b>	18%	-19%	43%	14%	-20%	
100.0497	1.1	M+H-H <sub>2</sub> O	8	Guanidinoacetic acid	1	RP(+)	Guanidines	-4%	-7%	<b>-31%</b>	<b>-30%</b>	1%	-21%	-23%	-2%	
118.0599	1.1	M+H	10	Guanidinoacetic acid	1	RP(+)	Guanidines	32%	24%	<b>-45%</b>	-29%	28%	-27%	-13%	20%	
212.0351	5.8	M+FA-H	3	Taurocyamine	1	HILIC(-)	Guanidines	<b>180%</b>	<b>180%</b>	-57%	-53%	10%	-13%	-4%	10%	
157.0607	1.2	M+H	0	4-Imidazolone-5-propanoic acid	4	RP(+)	Imidazoles and deriv.	16%	18%	<b>-53%</b>	<b>-47%</b>	13%	<b>-42%</b>	<b>-34%</b>	15%	
139.0513	1.6	M+H-H <sub>2</sub> O	6	4-Imidazolone-5-propanoic acid	6	RP(+)	Imidazoles and deriv.	-20%	-6%	<b>-29%</b>	<b>-35%</b>	-7%	<b>-38%</b>	<b>-33%</b>	9%	
153.0399	2.5	M+H-H <sub>2</sub> O	5	4-Ureido-5- imidazolecarboxylic acid	3	RP(+)	Imidazoles and deriv.	-19%	25%	-17%	<b>-51%</b>	-41%	-33%	<b>-39%</b>	-9%	
124.0865	1.0	M+H-H <sub>2</sub> O	4	Histidinol	1	RP(+)	Imidazoles and deriv.	13%	0%	<b>-31%</b>	-26%	9%	-17%	-21%	-4%	
153.0303	4.2	M-H	2	Imidazole pyruvate	2	HILIC(-)	Imidazoles and deriv.	10%	-1%	<b>-29%</b>	<b>-27%</b>	3%	-16%	-22%	-8%	
157.0607	1.2	M+H	0	Imidazolelactic acid	4	RP(+)	Imidazoles and deriv.	16%	18%	<b>-53%</b>	<b>-47%</b>	13%	<b>-42%</b>	<b>-34%</b>	15%	
139.0513	1.6	M+H-H <sub>2</sub> O	6	Imidazolelactic acid	6	RP(+)	Imidazoles and deriv.	-20%	-6%	<b>-29%</b>	<b>-35%</b>	-7%	<b>-38%</b>	<b>-33%</b>	9%	
141.0659	1.4	M+H	0	Imidazolepropionic acid	4	RP(+)	Imidazoles and deriv.	-2%	<b>-24%</b>	-16%	-6%	12%	-23%	<b>-33%</b>	-13%	

m/z	t <sub>R</sub> min	Adduct	Error ppm	Name	IDs /mf	Analysis	Class	% of change								
								TR-t vs CS-t	TR-s vs CS-s	CS-t vs CS-b	CS-s vs CS-b	CS-s vs CS-t	TR-t vs TR-b	TR-s vs TR-b	TR-s vs TR-t	
141.0659	1.4	M+H	0	Methylimidazoleacetic acid	4	RP(+)	Imidazoles and deriv.	-2%	<b>-24%</b>	-16%	-6%	12%	-23%	<b>-33%</b>	-13%	
154.0976	1.4	M+H	1	N-Acetylhistamine	1	RP(+)	Imidazoles and deriv.	-74%	-56%	188%	<b>333%</b>	50%	-72%	-29%	158%	
132.0762	7.4	M+NH <sub>4</sub>	5	N-Methylhydantoin	3	HILIC(+)	Imidazoles and deriv.	132%	25%	-62%	-55%	17%	-44%	<b>-65%</b>	-37%	
156.0771	9.2	M+NH <sub>4</sub>	3	Urocanic acid	4	HILIC(+)	Imidazoles and deriv.	1%	1%	<b>-39%</b>	<b>-32%</b>	10%	-28%	-21%	10%	
139.0513	1.6	M+H	8	Urocanic acid	6	RP(+)	Imidazoles and deriv.	-20%	-6%	<b>-29%</b>	<b>-35%</b>	-7%	<b>-38%</b>	<b>-33%</b>	9%	
174.0553	2.7	M-H	4	3-Indoleglycolaldehyde	6	HILIC(-)	Indole and deriv.	51%	101%	-54%	-22%	68%	<b>-53%</b>	6%	123%	
144.0458	2.0	M-H-H <sub>2</sub> O	5	3-Methyldioxyindole	2	HILIC(-)	Indole and deriv.	169%	<b>184%</b>	-52%	-49%	6%	-1%	10%	12%	
208.0623	5.7	M+FA-H	5	3-Methyldioxyindole	3	HILIC(-)	Indole and deriv.	-19%	30%	227%	80%	-45%	101%	<b>77%</b>	-12%	
200.0697	8.4	M+H-H <sub>2</sub> O	5	3-Methylindolepyruvate	2	HILIC(+)	Indole and deriv.	-28%	8%	<b>-65%</b>	-53%	34%	-69%	-37%	<b>99%</b>	
239.081	1.1	M+K	5	4-(1-piperazinyl)-1H-Indole	2	RP(+)	Indole and deriv.	6%	12%	<b>-47%</b>	-43%	8%	<b>-51%</b>	<b>-44%</b>	14%	
174.0553	2.7	M-H	4	5-Hydroxyindoleacetaldehyde	6	HILIC(-)	Indole and deriv.	51%	101%	-54%	-22%	68%	<b>-53%</b>	6%	123%	
202.0495	7.1	M+H-H <sub>2</sub> O	2	5-Hydroxyindolepyruvate	2	RP(+)	Indole and deriv.	5%	8%	<b>63%</b>	<b>63%</b>	0%	<b>105%</b>	<b>109%</b>	2%	
200.0697	8.4	M+Na	8	5-Hydroxytryptophol	2	HILIC(+)	Indole and deriv.	-28%	8%	<b>-65%</b>	-53%	34%	-69%	-37%	<b>99%</b>	
204.0672	5.7	M-H	3	5-Methoxyindoleacetate	6	HILIC(-)	Indole and deriv.	-15%	42%	18%	-1%	-16%	29%	<b>80%</b>	40%	
213.1008	3.1	M+Na	5	5-Methoxytryptamine	3	HILIC(+)	Indole and deriv.	-28%	20%	103%	69%	-17%	113%	<b>198%</b>	40%	
132.0454	1.7	M+H-H <sub>2</sub> O	6	Dihydroxyindole	2	HILIC(+)	Indole and deriv.	<b>-36%</b>	-16%	1%	10%	9%	-10%	29%	43%	
132.0449	7.2	M+H-H <sub>2</sub> O	3	Dihydroxyindole	2	RP(+)	Indole and deriv.	-13%	<b>-35%</b>	14%	<b>56%</b>	37%	20%	24%	3%	
134.0595	7.2	M+H	4	Hydroxyindole	4	RP(+)	Indole and deriv.	<b>-26%</b>	<b>-30%</b>	-10%	16%	29%	-4%	18%	23%	
199.0827	1.8	M+Na	8	Hydroxytryptamine (Serotonin)	3	RP(+)	Indole and deriv.	-12%	53%	81%	51%	-16%	112%	<b>207%</b>	45%	
197.0678	7.0	M+Na	4	Indole-3-acetaldehyde oxime	2	RP(+)	Indole and deriv.	-25%	-1%	<b>118%</b>	<b>104%</b>	-7%	107%	<b>155%</b>	23%	
204.0672	5.7	M+FA-H	4	Indoleacetaldehyde	6	HILIC(-)	Indole and deriv.	-15%	42%	18%	-1%	-16%	29%	<b>80%</b>	40%	
174.0553	2.7	M-H	4	Indoleacetic acid	6	HILIC(-)	Indole and deriv.	51%	101%	-54%	-22%	68%	<b>-53%</b>	6%	123%	
204.0672	5.7	M-H	3	Indolelactic acid	6	HILIC(-)	Indole and deriv.	-15%	42%	18%	-1%	-16%	29%	<b>80%</b>	40%	
132.0452	1.7	M-H	2	Indoxyl	4	HILIC(-)	Indole and deriv.	<b>-35%</b>	-28%	-4%	23%	28%	-1%	41%	43%	

m/z	t <sub>R</sub> min	Adduct	Error ppm	Name	IDs /mf	Analysis	Class	% of change								
								TR-t vs CS-t	TR-s vs CS-s	CS-t vs CS-b	CS-s vs CS-b	CS-s vs CS-t	TR-t vs TR-b	TR-s vs TR-b	TR-s vs TR-t	
132.0455	5.8	M-H	0	Indoxyl	4	HILIC(-)	Indole and deriv.	4%	33%	51%	26%	-16%	109%	<b>123%</b>	7%	
134.0592	1.7	M+H	6	Indoxyl	4	HILIC(+)	Indole and deriv.	<b>-35%</b>	-19%	-3%	12%	15%	-10%	28%	43%	
212.0037	1.7	M-H	7	Indoxyl sulfate	1	HILIC(-)	Indole and deriv.	-23%	-16%	-11%	2%	15%	4%	<b>32%</b>	26%	
214.0178	1.7	M+H	4	Indoxyl sulfate	1	HILIC(+)	Indole and deriv.	<b>-42%</b>	<b>-31%</b>	-5%	-2%	3%	2%	25%	23%	
196.0621	6.8	M+H	9	Leucodopachrome	4	RP(+)	Indole and deriv.	-50%	-34%	<b>202%</b>	160%	-14%	102%	129%	14%	
174.0553	2.7	M-H	4	N-Acetylindoxyl	6	HILIC(-)	Indole and deriv.	51%	101%	-54%	-22%	68%	<b>-53%</b>	6%	123%	
213.1008	3.1	M+Na	5	N-Methylserotonin	3	HILIC(+)	Indole and deriv.	-28%	20%	103%	69%	-17%	113%	<b>198%</b>	40%	
258.1091	2.4	M+H	3	5-Methylcytidine	5	RP(+)	Nucleoside/Nucleotide	-9%	-2%	-21%	<b>-22%</b>	-1%	-21%	-16%	6%	
222.0902	5.9	M-H-H2O	10	5-Methyldeoxycytidine	3	HILIC(-)	Nucleoside/Nucleotide	36%	<b>28%</b>	7%	13%	5%	34%	33%	-1%	
317.1209	8.3	M+NH4	2	8-Hydroxyguanosine	1	HILIC(+)	Nucleoside/Nucleotide	-4%	2%	<b>64%</b>	<b>44%</b>	-12%	<b>50%</b>	<b>40%</b>	-7%	
322.0773	2.8	M+Na	5	8-Hydroxyguanosine	1	RP(+)	Nucleoside/Nucleotide	-13%	-17%	-15%	<b>-20%</b>	-6%	-13%	<b>-21%</b>	-9%	
348.0705	6.8	M+H	0	Adenosine monophosphate	4	RP(+)	Nucleoside/Nucleotide	<b>-29%</b>	<b>-27%</b>	10%	18%	7%	-8%	1%	10%	
296.1014	5.1	M+FA-H	5	Deoxyadenosine	4	HILIC(-)	Nucleoside/Nucleotide	-14%	-6%	<b>-65%</b>	<b>-68%</b>	-9%	-16%	-16%	0%	
348.0705	6.8	M+H	0	Deoxyguanosine monophosphate	4	RP(+)	Nucleoside/Nucleotide	<b>-29%</b>	<b>-27%</b>	10%	18%	7%	-8%	1%	10%	
211.0718	6.4	M+H-H2O	2	Deoxyuridine	4	RP(+)	Nucleoside/Nucleotide	-13%	-8%	<b>159%</b>	<b>91%</b>	-26%	<b>192%</b>	<b>129%</b>	-22%	
247.0942	1.3	M+H	7	Dihydrouridine	2	RP(+)	Nucleoside/Nucleotide	6%	-20%	-11%	-10%	1%	-7%	<b>-30%</b>	<b>-25%</b>	
247.0926	1.6	M+H	1	Dihydrouridine	2	RP(+)	Nucleoside/Nucleotide	5%	-1%	-22%	<b>-25%</b>	-4%	-4%	-12%	-9%	
278.1243	1.6	M+H-H2O	2	Dimethyladenosine	2	RP(+)	Nucleoside/Nucleotide	8%	1%	<b>-37%</b>	<b>-38%</b>	-2%	<b>-24%</b>	<b>-31%</b>	-9%	
387.0076	1.6	M+K	8	Inosine monophosphate	3	RP(+)	Nucleoside/Nucleotide	27%	12%	<b>-45%</b>	<b>-43%</b>	5%	-27%	<b>-32%</b>	-8%	
296.1014	5.1	M-H	5	Methylguanosine	4	HILIC(-)	Nucleoside/Nucleotide	-14%	-6%	<b>-65%</b>	<b>-68%</b>	-9%	-16%	-16%	0%	
298.1155	6.4	M+H	3	Methylguanosine	5	RP(+)	Nucleoside/Nucleotide	-11%	-18%	-14%	-15%	-2%	-17%	<b>-25%</b>	-9%	
245.0775	1.6	M+H	3	Pseudouridine	3	RP(+)	Nucleoside/Nucleotide	4%	-7%	<b>-31%</b>	<b>-32%</b>	-1%	-20%	<b>-29%</b>	-12%	
399.1435	1.1	M+H	3	S-adenosylmethioninate	2	RP(+)	Nucleoside/Nucleotide	-4%	1%	<b>-22%</b>	<b>-22%</b>	0%	<b>-26%</b>	<b>-22%</b>	6%	
225.0854	2.5	M+H-H2O	7	Thymidine	3	RP(+)	Nucleoside/Nucleotide	<b>409%</b>	<b>458%</b>	-54%	-68%	-30%	94%	49%	-23%	

m/z	t <sub>R</sub> min	Adduct	Error ppm	Name	IDs /mf	Analysis	Class	% of change								
								TR-t vs CS-t	TR-s vs CS-s	CS-t vs CS-b	CS-s vs CS-b	CS-s vs CS-t	TR-t vs TR-b	TR-s vs TR-b	TR-s vs TR-t	
245.0775	1.6	M+H	3	Uridine	3	RP(+)	Nucleoside/Nucleotide	4%	-7%	<b>-31%</b>	<b>-32%</b>	-1%	-20%	<b>-29%</b>	-12%	
285.0834	5.9	M+H	2	Xanthosine	3	RP(+)	Nucleoside/Nucleotide	-16%	-7%	-9%	<b>-19%</b>	-11%	-13%	-14%	-2%	
191.0549	2.3	M+H	1	2,4-dihydroxy-2-heptenedioic acid	2	RP(+)	Organic acid/ Fatty acid	0%	-5%	-24%	<b>-26%</b>	-3%	-6%	-14%	-9%	
199.0404	7.1	M+Na	3	2-Oxo-6-methylthiohexanoic acid	1	RP(+)	Organic acid/ Fatty acid	13%	-1%	42%	<b>47%</b>	3%	<b>64%</b>	<b>48%</b>	-10%	
215.0171	1.5	M+Na	5	Citric acid	3	RP(+)	Organic acid/ Fatty acid	-14%	<b>-29%</b>	-4%	2%	6%	-3%	-15%	-13%	
203.0829	6.2	M+Cl	9	Decadienoic acid	4	HILIC(-)	Organic acid/ Fatty acid	22%	10%	<b>-32%</b>	<b>-28%</b>	6%	-11%	-15%	-4%	
191.0549	2.3	M+H-H <sub>2</sub> O	5	Dihydrolipoate	2	RP(+)	Organic acid/ Fatty acid	0%	-5%	-24%	<b>-26%</b>	-3%	-6%	-14%	-9%	
159.028	2.4	M+H-H <sub>2</sub> O	5	Dihydroxy-dioxohexanoic acid	8	RP(+)	Organic acid/ Fatty acid	2%	-10%	-23%	<b>-29%</b>	-8%	-22%	<b>-36%</b>	-18%	
215.0171	1.5	M+Na	5	Diketogulonic acid	3	RP(+)	Organic acid/ Fatty acid	-14%	<b>-29%</b>	-4%	2%	6%	-3%	-15%	-13%	
211.0718	6.4	M+K	8	Hydroxy-nonenoic acid	4	RP(+)	Organic acid/ Fatty acid	-13%	-8%	<b>159%</b>	<b>91%</b>	-26%	<b>192%</b>	<b>129%</b>	-22%	
159.028	2.4	M+H-H <sub>2</sub> O	5	Hydroxy-oxoadipic acid	8	RP(+)	Organic acid/ Fatty acid	2%	-10%	-23%	<b>-29%</b>	-8%	-22%	<b>-36%</b>	-18%	
200.1047	1.1	M+H-H <sub>2</sub> O	1	Hydroxysebacate	3	RP(+)	Organic acid/ Fatty acid	<b>146%</b>	<b>265%</b>	-54%	<b>-66%</b>	-26%	-22%	-15%	10%	
215.0171	1.5	M+Na	5	Isocitric acid	3	RP(+)	Organic acid/ Fatty acid	-14%	<b>-29%</b>	-4%	2%	6%	-3%	-15%	-13%	
211.0618	5.4	M+FA-H	4	Methoxyphenylacetic acid	4	HILIC(-)	Organic acid/ Fatty acid	-73%	-19%	<b>554%</b>	<b>134%</b>	-64%	90%	103%	7%	
211.0718	6.4	M+K	8	Oxo-nonanoic acid	4	RP(+)	Organic acid/ Fatty acid	-13%	-8%	<b>159%</b>	<b>91%</b>	-26%	<b>192%</b>	<b>129%</b>	-22%	

m/z	t <sub>R</sub> min	Adduct	Error ppm	Name	IDs /mf	Analysis	Class	% of change								
								TR-t vs CS-t	TR-s vs CS-s	CS-t vs CS-b	CS-s vs CS-b	CS-s vs CS-t	TR-t vs TR-b	TR-s vs TR-b	TR-s vs TR-t	
211.0618	5.4	M+FA-H	4	Phenyllactic acid	4	HILIC(-)	Organic acid/ Fatty acid	-73%	-19%	<b>554%</b>	<b>134%</b>	-64%	90%	103%	7%	
145.0497	6.7	M+H	1	2-methylideneglutaric acid	11	RP(+)	Organic acid/Fatty acid	32%	<b>66%</b>	-14%	-29%	-17%	34%	39%	4%	
159.028	2.4	M+H	5	5-oxohex-2-enedioic acid	8	RP(+)	Organic acid/Fatty acid	2%	-10%	-23%	<b>-29%</b>	-8%	-22%	<b>-36%</b>	-18%	
191.0557	6.6	M+FA-H	3	Acetyl-hydroxy-butanoic acid	8	HILIC(-)	Organic acid/Fatty acid	5%	50%	<b>115%</b>	95%	-9%	<b>178%</b>	<b>261%</b>	30%	
191.0557	6.6	M+FA-H	3	Adipic acid	8	HILIC(-)	Organic acid/Fatty acid	5%	50%	<b>115%</b>	95%	-9%	<b>178%</b>	<b>261%</b>	30%	
160.0732	5.7	M+FA-H	8	Caproate (6:0)	1	HILIC(-)	Organic acid/Fatty acid	-26%	39%	<b>65%</b>	33%	-19%	27%	<b>93%</b>	53%	
191.0557	6.6	M+FA-H	3	Dehydropantoate	8	HILIC(-)	Organic acid/Fatty acid	5%	50%	<b>115%</b>	95%	-9%	<b>178%</b>	<b>261%</b>	30%	
188.995	1.6	M+Cl	7	Dihydroxybenzoic acid	1	HILIC(-)	Organic acid/Fatty acid	6%	16%	37%	39%	1%	<b>46%</b>	<b>63%</b>	12%	
103.0392	1.4	M+H-H2O	1	Dihydroxybutyric acid	7	RP(+)	Organic acid/Fatty acid	6%	4%	<b>-28%</b>	<b>-30%</b>	-3%	-6%	-11%	-5%	
103.0392	1.4	M+H-H2O	1	Dihydroxy-isobutyric acid	7	RP(+)	Organic acid/Fatty acid	6%	4%	<b>-28%</b>	<b>-30%</b>	-3%	-6%	-11%	-5%	
145.0497	6.7	M+H-H2O	0	Dimethylmalate	11	RP(+)	Organic acid/Fatty acid	32%	<b>66%</b>	-14%	-29%	-17%	34%	39%	4%	
145.0497	6.7	M+H-H2O	0	Ethylmalate	11	RP(+)	Organic acid/Fatty acid	32%	<b>66%</b>	-14%	-29%	-17%	34%	39%	4%	
181.0483	6.6	M+Na	7	Heptenedioic acid	6	RP(+)	Organic acid/Fatty acid	19%	-15%	<b>-28%</b>	-25%	4%	19%	-11%	-25%	
145.0497	6.7	M+H	1	Hexenedioic acid	11	RP(+)	Organic acid/Fatty acid	32%	<b>66%</b>	-14%	-29%	-17%	34%	39%	4%	
145.0497	6.7	M+H-H2O	0	Hydroxyadipic acid	11	RP(+)	Organic acid/Fatty acid	32%	<b>66%</b>	-14%	-29%	-17%	34%	39%	4%	
117.0555	5.5	M-H	2	Hydroxy-ethylpropanoic acid	4	HILIC(-)	Organic acid/Fatty acid	75%	28%	<b>-59%</b>	<b>-53%</b>	14%	-38%	<b>-49%</b>	-17%	
117.0555	5.5	M-H	2	Hydroxy-isovaleric acid	4	HILIC(-)	Organic acid/Fatty acid	75%	28%	<b>-59%</b>	<b>-53%</b>	14%	-38%	<b>-49%</b>	-17%	
145.0497	6.7	M+H-H2O	0	Hydroxymethylglutarate	11	RP(+)	Organic acid/Fatty acid	32%	<b>66%</b>	-14%	-29%	-17%	34%	39%	4%	
191.0557	6.6	M+FA-H	3	Hydroxy-methyl-oxopentanoic acid	8	HILIC(-)	Organic acid/Fatty acid	5%	50%	<b>115%</b>	95%	-9%	<b>178%</b>	<b>261%</b>	30%	
117.0555	5.5	M-H	2	Hydroxyvaleric acid	4	HILIC(-)	Organic acid/Fatty acid	75%	28%	<b>-59%</b>	<b>-53%</b>	14%	-38%	<b>-49%</b>	-17%	
181.0483	6.6	M+Na	7	Isopropylmaleate	6	RP(+)	Organic acid/Fatty acid	19%	-15%	<b>-28%</b>	-25%	4%	19%	-11%	-25%	
120.0645	7.3	M+NH4	10	Ketobutyric acid	5	HILIC(+)	Organic acid/Fatty acid	0%	16%	26%	15%	-9%	53%	<b>62%</b>	6%	
140.9946	8.4	M+K	2	Ketobutyric acid	4	HILIC(+)	Organic acid/Fatty acid	-30%	11%	<b>-68%</b>	-56%	39%	<b>-73%</b>	-41%	<b>119%</b>	

m/z	t <sub>R</sub> min	Adduct	Error ppm	Name	IDs /mf	Analysis	Class	% of change								
								TR-t vs CS-t	TR-s vs CS-s	CS-t vs CS-b	CS-s vs CS-b	CS-s vs CS-t	TR-t vs TR-b	TR-s vs TR-b	TR-s vs TR-t	
103.0392	1.4	M+H	2	Ketobutyric acid	7	RP(+)	Organic acid/Fatty acid	6%	4%	<b>-28%</b>	<b>-30%</b>	-3%	-6%	-11%	-5%	
145.0497	6.7	M+H	1	Methylglutaconic acid	11	RP(+)	Organic acid/Fatty acid	32%	<b>66%</b>	-14%	-29%	-17%	34%	39%	4%	
191.0557	6.6	M+FA-H	3	Methylglutaric acid	8	HILIC(-)	Organic acid/Fatty acid	5%	50%	<b>115%</b>	95%	-9%	<b>178%</b>	<b>261%</b>	30%	
160.1343	9.4	M+NH <sub>4</sub>	8	Methylheptenoic acid	3	HILIC(+)	Organic acid/Fatty acid	-26%	-3%	<b>-68%</b>	-49%	57%	<b>-80%</b>	<b>-58%</b>	<b>106%</b>	
145.0497	6.7	M+H	1	Methylitaconate	11	RP(+)	Organic acid/Fatty acid	32%	<b>66%</b>	-14%	-29%	-17%	34%	39%	4%	
120.0645	7.3	M+NH <sub>4</sub>	10	Methyl-oxopropanoic acid	5	HILIC(+)	Organic acid/Fatty acid	0%	16%	26%	15%	-9%	53%	<b>62%</b>	6%	
140.9946	8.4	M+K	2	Methyl-oxo-propanoic acid	4	HILIC(+)	Organic acid/Fatty acid	-30%	11%	<b>-68%</b>	-56%	39%	<b>-73%</b>	-41%	<b>119%</b>	
103.0392	1.4	M+H	2	Methyl-oxo-propanoic acid	7	RP(+)	Organic acid/Fatty acid	6%	4%	<b>-28%</b>	<b>-30%</b>	-3%	-6%	-11%	-5%	
126.0192	6.4	M+H-H <sub>2</sub> O	4	N-formylmaleamic acid	1	HILIC(+)	Organic acid/Fatty acid	-3%	7%	<b>-59%</b>	-47%	30%	<b>-62%</b>	-45%	43%	
126.0199	1.1	M+H-H <sub>2</sub> O	9	N-formylmaleamic acid	1	RP(+)	Organic acid/Fatty acid	17%	14%	<b>-47%</b>	-37%	18%	<b>-50%</b>	<b>-43%</b>	15%	
160.1343	9.4	M+NH <sub>4</sub>	8	Octenoic acid	3	HILIC(+)	Organic acid/Fatty acid	-26%	-3%	<b>-68%</b>	-49%	57%	<b>-80%</b>	<b>-58%</b>	<b>106%</b>	
120.0645	7.3	M+NH <sub>4</sub>	10	Succinic acid semialdehyde	5	HILIC(+)	Organic acid/Fatty acid	0%	16%	26%	15%	-9%	53%	<b>62%</b>	6%	
140.9946	8.4	M+K	2	Succinic acid semialdehyde	4	HILIC(+)	Organic acid/Fatty acid	-30%	11%	<b>-68%</b>	-56%	39%	<b>-73%</b>	-41%	<b>119%</b>	
103.0392	1.4	M+H	2	Succinic acid semialdehyde	7	RP(+)	Organic acid/Fatty acid	6%	4%	<b>-28%</b>	<b>-30%</b>	-3%	-6%	-11%	-5%	
181.0483	6.6	M+Na	7	Succinylacetone	6	RP(+)	Organic acid/Fatty acid	19%	-15%	<b>-28%</b>	-25%	4%	19%	-11%	-25%	
183.007	8.3	M+H	9	2-Oxo-4-phosphonobutanoate	2	HILIC(+)	Organophosphorus compound/Phosphate Ester	-15%	41%	-91%	-86%	67%	<b>-88%</b>	-67%	<b>176%</b>	
183.007	8.3	M+H-H <sub>2</sub> O	8	Erythrose phosphate	2	HILIC(+)	Organophosphorus compound/Phosphate Ester	-15%	41%	-91%	-86%	67%	<b>-88%</b>	-67%	<b>176%</b>	
258.1091	2.4	M+H	4	Glycerophosphorylcholine	5	RP(+)	Organophosphorus compound/Phosphate Ester	-9%	-2%	-21%	<b>-22%</b>	-1%	-21%	-16%	6%	

m/z	t <sub>R</sub> min	Adduct	Error ppm	Name	IDs /mf	Analysis	Class	% of change							
								TR-t vs CS-t	TR-s vs CS-s	CS-t vs CS-b	CS-s vs CS-b	CS-s vs CS-t	TR-t vs TR-b	TR-s vs TR-b	TR-s vs TR-t
465.1261	1.1	M+H-H <sub>2</sub> O	5	N-[(7,8-Dihydropterin-6-yl)methyl]-4-(beta-D-ribofuranosyl)aniline 5'-phosphate	1	RP(+)	Organophosphorus compound/Phosphate Ester	41%	12%	<b>-44%</b>	<b>-40%</b>	7%	12%	-5%	-15%
156.0434	8.3	M+H	9	N-Methylethanolaminium phosphate	1	HILIC(+)	Organophosphorus compound/Phosphate Ester	0%	39%	7%	6%	-1%	<b>154%</b>	<b>250%</b>	38%
253.9809	6.9	M+K	8	O-Phospho-4-hydroxy-L-threonine	1	RP(+)	Organophosphorus compound/Phosphate Ester	-53%	<b>-48%</b>	-7%	-10%	-3%	35%	44%	6%
408.1024	1.2	M+Na	2	Phosphatidylserine	2	RP(+)	Organophosphorus compound/Phosphate Ester	-23%	<b>-23%</b>	<b>43%</b>	18%	-17%	6%	-13%	-18%
140.9946	8.4	M+H	1	Phosphonoacetate	4	HILIC(+)	Organophosphorus compound/Phosphate Ester	-30%	11%	<b>-68%</b>	-56%	39%	<b>-73%</b>	-41%	<b>119%</b>
231.0513	1.7	M+H-H <sub>2</sub> O	7	Pyridoxamine 5'-phosphate	2	HILIC(+)	Organophosphorus compound/Phosphate Ester	-53%	-33%	7%	<b>28%</b>	20%	-19%	40%	73%
165.0418	2.8	M-H	3	S-Propyl 1-propanesulfinothioate	4	HILIC(-)	Organosulfur compound	-34%	6%	70%	62%	-5%	39%	<b>113%</b>	53%
132.0452	1.7	M-H-H <sub>2</sub> O	2	4-Hydroxyphenylacetaldehyde oxime	4	HILIC(-)	Oxime	<b>-35%</b>	-28%	-4%	23%	28%	-1%	41%	43%
132.0455	5.8	M-H-H <sub>2</sub> O	4	4-Hydroxyphenylacetaldehyde oxime	4	HILIC(-)	Oxime	4%	33%	51%	26%	-16%	109%	<b>123%</b>	7%
134.0592	1.7	M+H-H <sub>2</sub> O	6	4-Hydroxyphenylacetaldehyde oxime	4	HILIC(+)	Oxime	<b>-35%</b>	-19%	-3%	12%	15%	-10%	28%	43%

m/z	t <sub>R</sub> min	Adduct	Error ppm	Name	IDs /mf	Analysis	Class	% of change							
								TR-t vs CS-t	TR-s vs CS-s	CS-t vs CS-b	CS-s vs CS-b	CS-s vs CS-t	TR-t vs TR-b	TR-s vs TR-b	TR-s vs TR-t
134.0595	7.2	M+H-H <sub>2</sub> O	4	4-Hydroxyphenylacetaldehyde oxime	4	RP(+)	Oxime	<b>-26%</b>	<b>-30%</b>	-10%	16%	29%	-4%	18%	23%
134.0611	5.8	M-H	0	Phenylacetaldoxime	3	HILIC(-)	Oxime	2%	24%	75%	55%	-11%	125%	<b>142%</b>	8%
337.0837	1.2	M+K	8	LPA(8:0)	4	RP(+)	LPA	61%	23%	<b>-68%</b>	-59%	29%	-50%	-51%	-1%
377.2474	6.9	M+H-H <sub>2</sub> O	6	LPA(P-16:0)	2	RP(+)	LPA	-56%	<b>-52%</b>	7%	12%	4%	69%	92%	14%
209.1013	1.1	M+H-H <sub>2</sub> O	9	Carnosine (dipeptide His, Ala)	2	RP(+)	Peptide	<b>47%</b>	14%	<b>-41%</b>	<b>-47%</b>	-10%	-9%	<b>-36%</b>	<b>-30%</b>
189.0876	1.8	M+H	3	Dipeptide (Gly Hyp)	3	RP(+)	Peptide	27%	18%	<b>-36%</b>	-30%	11%	-25%	-23%	3%
195.0526	4.7	M+Cl	10	Dipeptide (Ala Ala)	5	HILIC(-)	Peptide	-22%	22%	81%	83%	1%	40%	<b>121%</b>	58%
161.0908	1.1	M+H	8	Dipeptide (Ala Ala)	3	RP(+)	Peptide	25%	-18%	6%	42%	34%	<b>59%</b>	39%	-13%
203.1396	1.8	M+H	3	Dipeptide (Ala Ile, Ala Leu)	2	RP(+)	Peptide	23%	12%	-24%	<b>-27%</b>	-4%	-6%	-18%	-13%
169.0971	6.2	M+H-H <sub>2</sub> O	1	Dipeptide (Ala Pro)	1	RP(+)	Peptide	<b>-25%</b>	-13%	<b>45%</b>	<b>54%</b>	6%	24%	<b>54%</b>	24%
225.063	3.6	M+Cl	9	Dipeptide (Ala Thr)	5	HILIC(-)	Peptide	-20%	82%	<b>136%</b>	85%	-21%	112%	<b>282%</b>	80%
191.1033	1.2	M+H	3	Dipeptide (Ala Thr)	2	RP(+)	Peptide	<b>46%</b>	<b>31%</b>	<b>-27%</b>	<b>-24%</b>	4%	10%	3%	-6%
298.1155	6.4	M+Na	3	Dipeptide (Ala Trp)	5	RP(+)	Peptide	-11%	-18%	-14%	-15%	-2%	-17%	<b>-25%</b>	-9%
246.1084	1.2	M+H	0	Dipeptide (Asn Hyp)	3	RP(+)	Peptide	-2%	-6%	-6%	<b>-27%</b>	-23%	-4%	<b>-29%</b>	-26%
410.0435	6.9	M+K	4	Dipeptide (Asn Met-OH)	1	RP(+)	Peptide	<b>-31%</b>	<b>-42%</b>	-23%	-24%	-2%	-27%	-40%	-18%
318.0828	1.2	M+K	8	Dipeptide (Asn Phe)	2	RP(+)	Peptide	-1%	<b>-32%</b>	53%	<b>78%</b>	16%	40%	11%	-20%
245.0775	1.6	M+H-H <sub>2</sub> O	2	Dipeptide (Asp Glu)	3	RP(+)	Peptide	4%	-7%	<b>-31%</b>	<b>-32%</b>	-1%	-20%	<b>-29%</b>	-12%
247.0942	1.3	M+H	7	Dipeptide (Asp Hyp)	2	RP(+)	Peptide	6%	-20%	-11%	-10%	1%	-7%	<b>-30%</b>	<b>-25%</b>
247.0926	1.6	M+H	1	Dipeptide (Asp Hyp)	2	RP(+)	Peptide	5%	-1%	-22%	<b>-25%</b>	-4%	-4%	-12%	-9%
379.0847	1.2	M+H	10	Dipeptide (Asp-His-OH)	2	RP(+)	Peptide	28%	28%	<b>-30%</b>	-24%	9%	<b>-22%</b>	-14%	10%
243.0194	3.4	M+Cl	9	Dipeptide (Cys Ser)	1	HILIC(-)	Peptide	-32%	-26%	<b>-35%</b>	-36%	-1%	-4%	3%	7%
200.1047	1.1	M+H-H <sub>2</sub> O	8	Dipeptide (Gln Ala)	3	RP(+)	Peptide	<b>146%</b>	<b>265%</b>	-54%	<b>-66%</b>	-26%	-22%	-15%	10%
298.1155	6.4	M+K	3	Dipeptide (Gln Ile, Leu Gln, Lys Hyp)	5	RP(+)	Peptide	-11%	-18%	-14%	-15%	-2%	-17%	<b>-25%</b>	-9%

m/z	t <sub>R</sub> min	Adduct	Error ppm	Name	IDs /mf	Analysis	Class	% of change							
								TR-t vs CS-t	TR-s vs CS-s	CS-t vs CS-b	CS-s vs CS-b	CS-s vs CS-t	TR-t vs TR-b	TR-s vs TR-b	TR-s vs TR-t
258.1091	2.4	M+H-H <sub>2</sub> O	2	Dipeptide (Glu Gln)	5	RP(+)	Peptide	-9%	-2%	-21%	<b>-22%</b>	-1%	-21%	-16%	6%
243.1338	7.2	M+H-H <sub>2</sub> O	1	Dipeptide (Glu Ile, Glu Leu)	1	RP(+)	Peptide	34%	-36%	-40%	-34%	10%	-16%	<b>-56%</b>	-48%
243.1365	6.1	M+H-H <sub>2</sub> O	10	Dipeptide (Glu Ile, Leu Glu)	1	HILIC(+)	Peptide	52%	1%	-47%	<b>-55%</b>	-15%	3%	-42%	-44%
295.1296	7.1	M+H	3	Dipeptide (Glu Phe, Tyr Hyp)	1	RP(+)	Peptide	<b>325%</b>	<b>306%</b>	-36%	-35%	0%	<b>100%</b>	<b>92%</b>	-4%
249.1081	1.1	M+H	0	Dipeptide (Glu Thr)	1	RP(+)	Peptide	-13%	-19%	<b>30%</b>	28%	-2%	11%	2%	-8%
231.0973	1.7	M+H-H <sub>2</sub> O	1	Dipeptide (Glu Thr)	2	RP(+)	Peptide	-26%	-32%	<b>-33%</b>	<b>-34%</b>	-2%	<b>-47%</b>	<b>-52%</b>	-9%
129.0659	1.2	M+H-H <sub>2</sub> O	0	Dipeptide (Gly Ala)	6	RP(+)	Peptide	20%	21%	<b>-49%</b>	<b>-40%</b>	18%	-24%	-8%	20%
279.023	7.2	M-H-H <sub>2</sub> O	8	Dipeptide (Gly Asp-OH, Gly-OH Asp)	1	HILIC(-)	Peptide	-19%	2%	<b>88%</b>	67%	-11%	<b>74%</b>	94%	12%
331.0955	7.1	M+H	9	Dipeptide (Gly Phe-OH, Phe Gly-OH)	1	RP(+)	Peptide	1%	10%	<b>61%</b>	<b>63%</b>	1%	<b>88%</b>	<b>107%</b>	10%
309.0598	5.1	M+K	1	Dipeptide (His Asp)	1	HILIC(+)	Peptide	<b>-74%</b>	<b>-95%</b>	<b>-82%</b>	<b>-79%</b>	13%	-82%	-96%	-79%
267.111	8.3	M+H-H <sub>2</sub> O	7	Dipeptide (His Glu)	4	HILIC(+)	Peptide	<b>-37%</b>	-24%	4%	-21%	-24%	24%	14%	-8%
261.1088	1.2	M+H	3	Dipeptide (Hyp Glu)	1	RP(+)	Peptide	13%	-8%	-15%	-10%	6%	-15%	<b>-27%</b>	-14%
243.1343	6.1	M-H	3	Dipeptide (Hyp Leu, Hyp Ile)	1	HILIC(-)	Peptide	32%	-2%	<b>-54%</b>	<b>-56%</b>	-2%	-26%	-46%	-28%
260.1345	1.1	M+H	8	Dipeptide (Ile Glu, Leu Glu)	1	RP(+)	Peptide	26%	35%	<b>-34%</b>	<b>-32%</b>	3%	-9%	1%	10%
242.1242	1.2	M+H-H <sub>2</sub> O	8	Dipeptide (Ile Glu, Leu Glu)	2	RP(+)	Peptide	6%	40%	<b>-53%</b>	<b>-50%</b>	7%	-34%	-7%	41%
189.1237	1.5	M+H	2	Dipeptide (Ile Gly, Leu Gly, Val Ala)	2	RP(+)	Peptide	2%	-4%	<b>-22%</b>	<b>-15%</b>	9%	-13%	-11%	2%
229.1189	1.3	M+H-H <sub>2</sub> O	2	Dipeptide (Leu Asp, Ile Asp, Val Glu)	4	RP(+)	Peptide	24%	-4%	-30%	-18%	18%	-27%	<b>-33%</b>	-9%
229.119	1.4	M+H-H <sub>2</sub> O	3	Dipeptide (Leu Asp, Ile Asp, Val Glu)	4	RP(+)	Peptide	1%	-16%	-13%	-3%	12%	-25%	<b>-29%</b>	-6%
247.1293	3.4	M+H	2	Dipeptide (Leu Asp, Ile Asp, Val Glu)	2	RP(+)	Peptide	<b>96%</b>	<b>76%</b>	-23%	-20%	4%	<b>42%</b>	<b>32%</b>	-7%
285.0834	5.9	M+K	5	Dipeptide (Leu Asp, Ile Asp, Val Glu)	3	RP(+)	Peptide	-16%	-7%	-9%	<b>-19%</b>	-11%	-13%	-14%	-2%

m/z	t <sub>R</sub> min	Adduct	Error ppm	Name	IDs /mf	Analysis	Class	% of change							
								TR-t vs CS-t	TR-s vs CS-s	CS-t vs CS-b	CS-s vs CS-b	CS-s vs CS-t	TR-t vs TR-b	TR-s vs TR-b	TR-s vs TR-t
267.111	8.3	M+K	2	Dipeptide (Leu Pro, Ile Pro)	4	HILIC(+)	Peptide	<b>-37%</b>	-24%	4%	-21%	-24%	24%	14%	-8%
229.1562	8.8	M+H	7	Dipeptide (Leu Pro, Ile Pro)	1	HILIC(+)	Peptide	-2%	-6%	<b>-63%</b>	-59%	11%	-60%	-57%	7%
296.1014	5.1	M+Cl	2	Dipeptide (Lys Asp)	4	HILIC(-)	Peptide	-14%	-6%	<b>-65%</b>	<b>-68%</b>	-9%	-16%	-16%	0%
232.1099	7.2	M+H-H2O	6	Dipeptide (Lys Cys)	1	RP(+)	Peptide	64%	70%	<b>-94%</b>	<b>-81%</b>	205%	<b>-91%</b>	<b>-72%</b>	215%
265.0864	1.5	M+H	4	Dipeptide (Met Asp)	2	RP(+)	Peptide	141%	<b>132%</b>	7%	1%	-6%	73%	57%	-10%
318.1251	8.3	M+H-H2O	6	Dipeptide (Met Trp)	1	HILIC(+)	Peptide	<b>-23%</b>	-18%	<b>65%</b>	<b>53%</b>	-8%	21%	19%	-1%
318.1254	1.1	M+H-H2O	5	Dipeptide (Met Trp)	1	RP(+)	Peptide	76%	<b>127%</b>	-32%	-34%	-3%	-19%	1%	24%
231.1183	1.1	M+H-H2O	8	Dipeptide (Met Val)	1	RP(+)	Peptide	50%	22%	<b>-54%</b>	<b>-41%</b>	28%	-32%	-29%	5%
336.1389	1.1	M+H	4	Dipeptide (Met, Trp)	5	RP(+)	Peptide	-3%	-14%	<b>-26%</b>	<b>-25%</b>	1%	<b>-24%</b>	<b>-32%</b>	-10%
258.1091	2.4	M+H	3	Dipeptide (pGlu Gln)	5	RP(+)	Peptide	-9%	-2%	-21%	<b>-22%</b>	-1%	-21%	-16%	6%
259.1055	2.4	M+Na	1	Dipeptide (Phe Ala)	4	RP(+)	Peptide	-7%	10%	<b>-36%</b>	<b>-40%</b>	-7%	-28%	-20%	10%
203.0829	6.2	M-H-H2O	4	Dipeptide (Phe Gly)	4	HILIC(-)	Peptide	22%	10%	<b>-32%</b>	<b>-28%</b>	6%	-11%	-15%	-4%
231.0973	1.7	M+H	1	Dipeptide (Pro Asp)	2	RP(+)	Peptide	-26%	-32%	<b>-33%</b>	<b>-34%</b>	-2%	<b>-47%</b>	<b>-52%</b>	-9%
229.1189	1.3	M+H	3	Dipeptide (Pro Hyp)	4	RP(+)	Peptide	24%	-4%	-30%	-18%	18%	-27%	<b>-33%</b>	-9%
229.119	1.4	M+H	3	Dipeptide (Pro Hyp)	4	RP(+)	Peptide	1%	-16%	-13%	-3%	12%	-25%	<b>-29%</b>	-6%
225.0854	2.5	M+Na	4	Dipeptide (Ser Pro, Ala Hyp)	3	RP(+)	Peptide	<b>409%</b>	<b>458%</b>	-54%	-68%	-30%	94%	49%	-23%
175.0713	1.5	M+H-H2O	1	Dipeptide (Ser Ser)	3	RP(+)	Peptide	48%	35%	<b>-54%</b>	<b>-44%</b>	21%	<b>-37%</b>	-31%	11%
189.0876	1.8	M+H-H2O	3	Dipeptide (Thr Ser)	3	RP(+)	Peptide	27%	18%	<b>-36%</b>	-30%	11%	-25%	-23%	3%
420.1205	1.1	M+Na	10	Dipeptide (Trp Ala -OH)	3	RP(+)	Peptide	<b>-26%</b>	-20%	<b>37%</b>	<b>32%</b>	-4%	10%	14%	4%
493.152	1.1	M+K	8	Dipeptide (Trp-Lys-OH)	3	RP(+)	Peptide	<b>61%</b>	<b>68%</b>	-33%	-27%	9%	-10%	2%	14%
348.0705	6.8	M+K	4	Dipeptide (Tyr Glu)	4	RP(+)	Peptide	<b>-29%</b>	<b>-27%</b>	10%	18%	7%	-8%	1%	10%
231.1343	6.6	M+H	2	Dipeptide (Val Hyp)	1	RP(+)	Peptide	3%	-6%	<b>-27%</b>	-24%	5%	<b>-29%</b>	<b>-31%</b>	-4%
267.111	8.3	M+NH4	5	Dipeptide (Gln Cys)	4	HILIC(+)	Peptide	<b>-37%</b>	-24%	4%	-21%	-24%	24%	14%	-8%
276.154	1.1	M+H	5	Dipeptide (Glu Lys)	2	RP(+)	Peptide	<b>886%</b>	<b>896%</b>	-33%	-28%	6%	<b>247%</b>	<b>273%</b>	8%
248.1611	1.5	M+H	2	Dipeptide (Lys Thr)	1	RP(+)	Peptide	<b>123%</b>	44%	<b>-73%</b>	-59%	54%	-51%	-51%	0%

m/z	t <sub>R</sub> min	Adduct	Error ppm	Name	IDs /mf	Analysis	Class	% of change							
								TR-t vs CS-t	TR-s vs CS-s	CS-t vs CS-b	CS-s vs CS-b	CS-s vs CS-t	TR-t vs TR-b	TR-s vs TR-b	TR-s vs TR-t
229.1189	1.3	M+H	3	Pyroglutamylvaline	4	RP(+)	Peptide	24%	-4%	-30%	-18%	18%	-27%	<b>-33%</b>	-9%
229.119	1.4	M+H	3	Pyroglutamylvaline	4	RP(+)	Peptide	1%	-16%	-13%	-3%	12%	-25%	<b>-29%</b>	-6%
337.0837	1.2	M+H	7	S-Nitrosoglutathione	4	RP(+)	Peptide	61%	23%	<b>-68%</b>	-59%	29%	-50%	-51%	-1%
258.1091	2.4	M+H-H2O	2	Tripeptide (Ala Ala Asp, Ala Gly Glu)	5	RP(+)	Peptide	-9%	-2%	-21%	<b>-22%</b>	-1%	-21%	-16%	6%
374.1304	1.2	M+Na	5	Tripeptide (Ala Asp Phe, Gly Glu Phe)	1	RP(+)	Peptide	30%	39%	-30%	<b>-35%</b>	-7%	-15%	-15%	-1%
298.1155	6.4	M+K	3	Tripeptide (Ala Val Ala, Ile Gly Ala, Leu Gly Ala)	5	RP(+)	Peptide	-11%	-18%	-14%	-15%	-2%	-17%	<b>-25%</b>	-9%
357.1363	1.2	M+Na	5	Tripeptide (Asn Thr Thr, Gln Ser Thr)	1	RP(+)	Peptide	<b>53%</b>	18%	-17%	-4%	16%	12%	0%	-11%
260.0886	7.1	M+H-H2O	3	Tripeptide (Asp Gly Ser)	1	RP(+)	Peptide	-3%	5%	<b>75%</b>	<b>51%</b>	-14%	<b>81%</b>	<b>69%</b>	-6%
276.1029	7.1	M+H	6	Tripeptide (Cys Gly Pro)	2	RP(+)	Peptide	17%	9%	-12%	-9%	4%	<b>-25%</b>	<b>-27%</b>	-3%
384.1502	1.3	M+Na	3	Tripeptide (Gln Asn Thr, Gln Gln Ser)	3	RP(+)	Peptide	1%	-13%	-19%	-21%	-2%	-14%	<b>-28%</b>	-16%
419.0823	1.1	M+K	1	Tripeptide (Gln Cys Met)	1	RP(+)	Peptide	<b>234%</b>	107%	-47%	-26%	40%	4%	-10%	-13%
356.193	6.5	M+H-H2O	0	Tripeptide (Gln Val Gln, Leu Gln Asn, Ile Gln Asn)	2	RP(+)	Peptide	0%	-9%	-16%	<b>-16%</b>	0%	-1%	-10%	-9%
374.1231	7.1	M+H-H2O	9	Tripeptide (Glu Asp Glu)	1	RP(+)	Peptide	-4%	14%	<b>36%</b>	<b>33%</b>	-2%	23%	<b>43%</b>	16%
420.1205	1.1	M+Na	1	Tripeptide (Glu Cys Phe)	3	RP(+)	Peptide	<b>-26%</b>	-20%	<b>37%</b>	<b>32%</b>	-4%	10%	14%	4%
336.1389	1.1	M+H	4	Tripeptide (Glu Ser Thr, Thr Thr Asp)	5	RP(+)	Peptide	-3%	-14%	<b>-26%</b>	<b>-25%</b>	1%	<b>-24%</b>	<b>-32%</b>	-10%
400.1453	1.1	M+K	8	Tripeptide (Glu Thr Leu/ Glu Thr Ile)	4	RP(+)	Peptide	-8%	-5%	-9%	-19%	-11%	-16%	<b>-22%</b>	-8%
267.111	8.3	M+NH4	5	Tripeptide (Gly Ala Cys)	4	HILIC(+)	Peptide	<b>-37%</b>	-24%	4%	-21%	-24%	24%	14%	-8%
456.1796	1.1	M+K	10	Tripeptide (Gly Arg Trp)	2	RP(+)	Peptide	17%	9%	<b>-49%</b>	<b>-61%</b>	-24%	-1%	-30%	-29%
248.0718	1.7	M+H-H2O	7	Tripeptide (Gly Cys Ser)	1	HILIC(+)	Peptide	<b>-36%</b>	-14%	-3%	4%	7%	-10%	29%	44%

m/z	t <sub>R</sub> min	Adduct	Error ppm	Name	IDs /mf	Analysis	Class	% of change							
								TR-t vs CS-t	TR-s vs CS-s	CS-t vs CS-b	CS-s vs CS-b	CS-s vs CS-t	TR-t vs TR-b	TR-s vs TR-b	TR-s vs TR-t
266.0811	1.1	M+H	2	Tripeptide (Gly Cys Ser)	1	RP(+)	Peptide	-18%	-23%	43%	10%	<b>-23%</b>	44%	4%	<b>-28%</b>
296.1014	5.1	M+Cl	2	Tripeptide (Gly Val Ser, Ala Ala Thr)	4	HILIC(-)	Peptide	-14%	-6%	<b>-65%</b>	<b>-68%</b>	-9%	-16%	-16%	0%
399.1435	1.1	M+K	2	Tripeptide (Gly Val Trp)	2	RP(+)	Peptide	-4%	1%	<b>-22%</b>	<b>-22%</b>	0%	<b>-26%</b>	<b>-22%</b>	6%
400.1453	1.1	M+H	2	Tripeptide (His Glu Asp)	4	RP(+)	Peptide	-8%	-5%	-9%	-19%	-11%	-16%	<b>-22%</b>	-8%
478.1612	1.1	M+K	3	Tripeptide (His His Phe)	1	RP(+)	Peptide	16%	2%	<b>-43%</b>	<b>-50%</b>	-12%	5%	-20%	-23%
332.1813	5.5	M-H	4	Tripeptide (Ile Thr Thr, Leu Thr Thr)	2	HILIC(-)	Peptide	-40%	-21%	<b>174%</b>	387%	78%	30%	203%	134%
430.1504	1.1	M+K	4	Tripeptide (Met Asn Lys)	1	RP(+)	Peptide	<b>-32%</b>	<b>-29%</b>	<b>60%</b>	<b>43%</b>	-11%	29%	21%	-6%
336.1389	1.1	M+H-H <sub>2</sub> O	3	Tripeptide (Met Gly Phe)	5	RP(+)	Peptide	-3%	-14%	<b>-26%</b>	<b>-25%</b>	1%	<b>-24%</b>	<b>-32%</b>	-10%
413.1239	6.5	M+K	4	Tripeptide (Met Pro Gln)	1	RP(+)	Peptide	3%	10%	-22%	-20%	3%	<b>-27%</b>	-20%	10%
404.0921	7.1	M+K	9	Tripeptide (Met Thr Asp, Ser Glu Met, Cys Glu Met)	1	RP(+)	Peptide	19%	9%	64%	<b>73%</b>	5%	<b>159%</b>	<b>150%</b>	-3%
420.1205	1.1	M+K	10	Tripeptide (Phe Asp Thr, Phe Glu Ser, Ala Tyr Glu)	3	RP(+)	Peptide	<b>-26%</b>	-20%	<b>37%</b>	<b>32%</b>	-4%	10%	14%	4%
408.1024	1.2	M+K	9	Tripeptide (Phe Cys Thr, Met Gly Tyr)	2	RP(+)	Peptide	-23%	<b>-23%</b>	<b>43%</b>	18%	-17%	6%	-13%	-18%
318.0828	1.2	M+K	8	Tripeptide (Phe Gly Gly)	2	RP(+)	Peptide	-1%	<b>-32%</b>	53%	<b>78%</b>	16%	40%	11%	-20%
367.1504	4.6	M+K	4	Tripeptide (Pro Arg Gly)	1	RP(+)	Peptide	-4%	-9%	-10%	<b>-18%</b>	-9%	-1%	-14%	-13%
397.1138	1.2	M+K	5	Tripeptide (Pro Glu Asn, Gln Asp Pro)	2	RP(+)	Peptide	31%	13%	<b>-48%</b>	-38%	20%	-38%	-36%	4%
288.1176	1.1	M+H	5	Tripeptide (Pro Gly Asp)	3	RP(+)	Peptide	0%	-4%	<b>-29%</b>	-23%	9%	-27%	-24%	5%
400.1453	1.1	M+Na	7	Tripeptide (Pro Phe Asp)	4	RP(+)	Peptide	-8%	-5%	-9%	-19%	-11%	-16%	<b>-22%</b>	-8%
288.1176	1.1	M+H-H <sub>2</sub> O	5	Tripeptide (Ser Glu Ala/Thr Asp Ala/Gly Thr Glu)	3	RP(+)	Peptide	0%	-4%	<b>-29%</b>	-23%	9%	-27%	-24%	5%
259.1055	2.4	M+H-H <sub>2</sub> O	6	Tripeptide (Ser Gly Asn)	4	RP(+)	Peptide	-7%	10%	<b>-36%</b>	<b>-40%</b>	-7%	-28%	-20%	10%

m/z	t <sub>R</sub> min	Adduct	Error ppm	Name	IDs /mf	Analysis	Class	% of change								
								TR-t vs CS-t	TR-s vs CS-s	CS-t vs CS-b	CS-s vs CS-b	CS-s vs CS-t	TR-t vs TR-b	TR-s vs TR-b	TR-s vs TR-t	
246.1084	1.2	M+H-H <sub>2</sub> O	1	Tripeptide (Ser Thr Gly, Ser Ser Ala)	3	RP(+)	Peptide	-2%	-6%	-6%	<b>-27%</b>	-23%	-4%	<b>-29%</b>	-26%	
493.152	1.1	M+K	8	Tripeptide (Ser Trp Tyr)	3	RP(+)	Peptide	<b>61%</b>	<b>68%</b>	-33%	-27%	9%	-10%	2%	14%	
276.1029	7.1	M+H-H <sub>2</sub> O	5	Tripeptide (Thr Cys Ala, Met Ser Gly)	2	RP(+)	Peptide	17%	9%	-12%	-9%	4%	<b>-25%</b>	<b>-27%</b>	-3%	
291.1668	8.0	M+NH <sub>4</sub>	2	Tripeptide (Thr Gly Pro, Pro Ala Ser)	2	HILIC(+)	Peptide	62%	<b>57%</b>	-30%	-31%	-1%	29%	23%	-4%	
276.154	1.1	M+H	5	Tripeptide (Thr Gly Val, Ser Ile Gly, Ser Leu Gly, Val Ser Ala)	2	RP(+)	Peptide	<b>886%</b>	<b>896%</b>	-33%	-28%	6%	<b>247%</b>	<b>273%</b>	8%	
356.193	6.5	M+H	0	Tripeptide (Thr Val His, Leu Ser His, Ile Ser His)	2	RP(+)	Peptide	0%	-9%	-16%	<b>-16%</b>	0%	-1%	-10%	-9%	
456.1796	1.1	M+H-H <sub>2</sub> O	6	Tripeptide (Tyr Glu Tyr)	2	RP(+)	Peptide	17%	9%	<b>-49%</b>	<b>-61%</b>	-24%	-1%	-30%	-29%	
493.152	1.1	M+Na	1	Tripeptide (Tyr Trp Cys)	3	RP(+)	Peptide	<b>61%</b>	<b>68%</b>	-33%	-27%	9%	-10%	2%	14%	
454.1554	1.4	M+Na	7	Tripeptide (Tyr Tyr Ser)	1	RP(+)	Peptide	5%	17%	<b>-35%</b>	<b>-48%</b>	-21%	-19%	<b>-29%</b>	-12%	
332.1813	5.5	M+FA-H	5	Tripeptide (Val Gly Leu, Val Gly Ile, Ala Val Val)	2	HILIC(-)	Peptide	-40%	-21%	<b>174%</b>	387%	78%	30%	203%	134%	
384.1502	1.3	M+K	9	Tripeptide (Val Val Glu, Val Asp Ile, Val Asp Leu)	3	RP(+)	Peptide	1%	-13%	-19%	-21%	-2%	-14%	<b>-28%</b>	-16%	
417.1936	1.1	M+H-H <sub>2</sub> O	5	Tripeptide(Met Arg Glu, Val Met Trp)	1	RP(+)	Peptide	42%	<b>72%</b>	<b>-49%</b>	<b>-61%</b>	-23%	-24%	-29%	-7%	
291.1668	8.0	M+H	2	Tripetide (Gly Ser Lys)	2	HILIC(+)	Peptide	62%	<b>57%</b>	-30%	-31%	-1%	29%	23%	-4%	
400.1453	1.1	M+H-H <sub>2</sub> O	5	Tripetide (His Met Met)	4	RP(+)	Peptide	-8%	-5%	-9%	-19%	-11%	-16%	<b>-22%</b>	-8%	
384.2239	6.5	M+Na	6	Tripetide (Lys Ser Lys)	1	RP(+)	Peptide	-1%	-5%	<b>-41%</b>	<b>-42%</b>	-3%	-7%	-13%	-7%	
181.0483	6.6	M+H	7	2-Hydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)propenoic acid	6	RP(+)	Phenol	19%	-15%	<b>-28%</b>	-25%	4%	19%	-11%	-25%	
211.0618	5.4	M+FA-H	4	Desaminotyrosine	4	HILIC(-)	Phenol	-73%	-19%	<b>554%</b>	<b>134%</b>	-64%	90%	103%	7%	
134.0611	5.8	M-H-H <sub>2</sub> O	3	Dopamine	3	HILIC(-)	Phenol	2%	24%	75%	55%	-11%	125%	<b>142%</b>	8%	

m/z	t <sub>R</sub> min	Adduct	Error ppm	Name	IDs /mf	Analysis	Class	% of change								
								TR-t vs CS-t	TR-s vs CS-s	CS-t vs CS-b	CS-s vs CS-b	CS-s vs CS-t	TR-t vs TR-b	TR-s vs TR-b	TR-s vs TR-t	
337.0837	1.2	M+K	0	Enterolactone	4	RP(+)	Phenol	61%	23%	<b>-68%</b>	-59%	29%	-50%	-51%	-1%	
184.0961	7.3	M+H	4	Epinephrine	2	RP(+)	Phenol	14%	15%	172%	<b>185%</b>	5%	352%	<b>379%</b>	6%	
123.0445	1.6	M-H	5	Hydroxybenzyl alcohol	2	HILIC(-)	Phenol	23%	32%	66%	70%	3%	<b>65%</b>	<b>82%</b>	10%	
109.0291	1.6	M-H	4	Hydroxyphenol (Hydroquinone)	1	HILIC(-)	Phenol	-5%	16%	<b>85%</b>	82%	-2%	<b>131%</b>	<b>176%</b>	20%	
211.0618	5.4	M+FA-H	4	Hydroxyphenylpropionic acid	4	HILIC(-)	Phenol	-73%	-19%	<b>554%</b>	<b>134%</b>	-64%	90%	103%	7%	
181.0483	6.6	M+H	7	Hydroxyphenylpyruvic acid	6	RP(+)	Phenol	19%	-15%	<b>-28%</b>	-25%	4%	19%	-11%	-25%	
123.0445	1.6	M-H	5	Methylcatechol	2	HILIC(-)	Phenol	23%	32%	66%	70%	3%	<b>65%</b>	<b>82%</b>	10%	
184.0961	7.3	M+H	4	Normetanephrine	2	RP(+)	Phenol	14%	15%	172%	<b>185%</b>	5%	352%	<b>379%</b>	6%	
181.0483	6.6	M+H-H <sub>2</sub> O	7	Vanillylmandelic acid	6	RP(+)	Phenol	19%	-15%	<b>-28%</b>	-25%	4%	19%	-11%	-25%	
181.0701	5.8	M-H	9	Hexanehexol (sorbitol, glucitol, iditol)	1	HILIC(-)	Polyol	<b>122%</b>	<b>190%</b>	<b>-74%</b>	-69%	18%	<b>-57%</b>	-33%	54%	
183.087	5.7	M+H	4	Hexanehexol (sorbitol, glucitol, iditol)	2	HILIC(+)	Polyol	<b>81%</b>	<b>108%</b>	-54%	-49%	11%	-33%	-15%	27%	
205.0676	1.1	M+Na	4	Hexanehexol (sorbitol, glucitol, iditol)	1	RP(+)	Polyol	79%	<b>147%</b>	-33%	-35%	-3%	-22%	5%	34%	
195.0526	4.7	M-H	8	Pentahydroxyhexanoic acid (gluconate/ galactonate/ gulonate)	5	HILIC(-)	Polyol	-22%	22%	81%	83%	1%	40%	<b>121%</b>	58%	
197.0678	3.5	M+FA-H	7	Pentanepentol (Xylitol/Arabitol)	1	HILIC(-)	Polyol	-8%	49%	71%	53%	-11%	104%	<b>195%</b>	44%	
117.0555	5.5	M-H-H <sub>2</sub> O	2	Pentanetetrol (deoxy-ribitol/ deoxy-arabinitol)	4	HILIC(-)	Polyol	75%	28%	<b>-59%</b>	<b>-53%</b>	14%	-38%	<b>-49%</b>	-17%	
191.0557	6.6	M-H	2	Quinic acid	8	HILIC(-)	Polyol	5%	50%	<b>115%</b>	95%	-9%	<b>178%</b>	<b>261%</b>	30%	
193.0713	1.3	M+H	3	Quinic acid	2	RP(+)	Polyol	-5%	13%	<b>112%</b>	<b>94%</b>	-9%	<b>197%</b>	<b>222%</b>	9%	
165.0418	2.8	M-H	8	Tetrahydroxypentanoic acid (Arabinonate/Xylonate)	4	HILIC(-)	Polyol	-34%	6%	70%	62%	-5%	39%	<b>113%</b>	53%	

m/z	t <sub>R</sub> min	Adduct	Error ppm	Name	IDs /mf	Analysis	Class	% of change							
								TR-t vs CS-t	TR-s vs CS-s	CS-t vs CS-b	CS-s vs CS-b	CS-s vs CS-t	TR-t vs TR-b	TR-s vs TR-b	TR-s vs TR-t
167.0563	6.4	M+H	8	Tetrahydroxypentanoic acid (ex Ribonic acid)	2	RP(+)	Polyol	-29%	-5%	<b>107%</b>	98%	-4%	85%	<b>137%</b>	28%
222.0981	1.2	M+H-H2O	2	1-hydroxy-2-Oxopropyl tetrahydropterin	6	RP(+)	Pterin and deriv.	9%	16%	-20%	<b>-29%</b>	-11%	7%	1%	-6%
222.0967	2.5	M+H-H2O	8	1-hydroxy-2-Oxopropyl tetrahydropterin	5	RP(+)	Pterin and deriv.	-15%	-8%	-18%	<b>-32%</b>	-17%	-5%	-15%	-10%
240.1094	2.6	M+H	1	1-hydroxy-2-Oxopropyl tetrahydropterin	5	RP(+)	Pterin and deriv.	-6%	5%	<b>-23%</b>	<b>-24%</b>	-2%	<b>-27%</b>	-20%	10%
204.0872	1.2	M+H-H2O	4	2'-Deoxysepiapterin	3	RP(+)	Pterin and deriv.	2%	1%	<b>-27%</b>	<b>-22%</b>	6%	-20%	-15%	6%
222.0981	1.2	M+H	2	2'-Deoxysepiapterin	6	RP(+)	Pterin and deriv.	9%	16%	-20%	<b>-29%</b>	-11%	7%	1%	-6%
222.0967	2.5	M+H	8	2'-Deoxysepiapterin	5	RP(+)	Pterin and deriv.	-15%	-8%	-18%	<b>-32%</b>	-17%	-5%	-15%	-10%
222.0981	1.2	M+H-H2O	2	4a-Carbinolamine tetrahydrobiopterin	6	RP(+)	Pterin and deriv.	9%	16%	-20%	<b>-29%</b>	-11%	7%	1%	-6%
240.1094	2.6	M+H	1	4a-Carbinolamine tetrahydrobiopterin	5	RP(+)	Pterin and deriv.	-6%	5%	<b>-23%</b>	<b>-24%</b>	-2%	<b>-27%</b>	-20%	10%
240.1094	2.6	M+H-H2O	1	5,6,7,8-Tetrahydromonapterin	5	RP(+)	Pterin and deriv.	-6%	5%	<b>-23%</b>	<b>-24%</b>	-2%	<b>-27%</b>	-20%	10%
209.1013	1.1	M+H-H2O	9	6-(Erythro-1,2- Dihydroxypropyl)-5,6,7,8- tetrahydro-4a-hydroxypterin	2	RP(+)	Pterin and deriv.	<b>47%</b>	14%	<b>-41%</b>	<b>-47%</b>	-10%	-9%	<b>-36%</b>	<b>-30%</b>
222.0981	1.2	M+H-H2O	2	Dihydrobiopterin	6	RP(+)	Pterin and deriv.	9%	16%	-20%	<b>-29%</b>	-11%	7%	1%	-6%
222.0967	2.5	M+H-H2O	8	Dihydrobiopterin	5	RP(+)	Pterin and deriv.	-15%	-8%	-18%	<b>-32%</b>	-17%	-5%	-15%	-10%
240.1094	2.6	M+H	1	Dihydrobiopterin	5	RP(+)	Pterin and deriv.	-6%	5%	<b>-23%</b>	<b>-24%</b>	-2%	<b>-27%</b>	-20%	10%
240.1094	2.6	M+H-H2O	1	Hydroxytetrahydrobiopterin	5	RP(+)	Pterin and deriv.	-6%	5%	<b>-23%</b>	<b>-24%</b>	-2%	<b>-27%</b>	-20%	10%
146.0446	1.6	M+H-H2O	10	Pterin	3	RP(+)	Pterin and deriv.	-4%	-25%	<b>-39%</b>	<b>-32%</b>	11%	-27%	<b>-37%</b>	-13%
204.0872	1.2	M+H-H2O	4	Pyrimidodiazepine	3	RP(+)	Pterin and deriv.	2%	1%	<b>-27%</b>	<b>-22%</b>	6%	-20%	-15%	6%
222.0981	1.2	M+H	2	Pyrimidodiazepine	6	RP(+)	Pterin and deriv.	9%	16%	-20%	<b>-29%</b>	-11%	7%	1%	-6%
222.0967	2.5	M+H	8	Pyrimidodiazepine	5	RP(+)	Pterin and deriv.	-15%	-8%	-18%	<b>-32%</b>	-17%	-5%	-15%	-10%

m/z	t <sub>R</sub> min	Adduct	Error ppm	Name	IDs /mf	Analysis	Class	% of change							
								TR-t vs CS-t	TR-s vs CS-s	CS-t vs CS-b	CS-s vs CS-b	CS-s vs CS-t	TR-t vs TR-b	TR-s vs TR-b	TR-s vs TR-t
242.1242	1.2	M+H	2	Tetrahydrobiopterin	2	RP(+)	Pterin and deriv.	6%	40%	<b>-53%</b>	<b>-50%</b>	7%	-34%	-7%	41%
153.0399	2.5	M+H	5	6,8-Dihydroxypurine	3	RP(+)	Purine and deriv.	-19%	25%	-17%	<b>-51%</b>	-41%	-33%	<b>-39%</b>	-9%
195.0526	4.7	M-H	1	Dimethyluric acid	5	HILIC(-)	Purine and deriv.	-22%	22%	81%	83%	1%	40%	<b>121%</b>	58%
197.0678	7.0	M+H	5	Dimethyluric acid	2	RP(+)	Purine and deriv.	-25%	-1%	<b>118%</b>	<b>104%</b>	-7%	107%	<b>155%</b>	23%
225.063	3.6	M+FA-H	0	Dimethylxanthine	5	HILIC(-)	Purine and deriv.	-20%	82%	<b>136%</b>	85%	-21%	112%	<b>282%</b>	80%
181.0733	2.7	M+H	7	Dimethylxanthine	1	HILIC(+)	Purine and deriv.	-17%	16%	57%	51%	-4%	61%	<b>117%</b>	34%
159.028	2.4	M+Na	2	Hypoxanthine	8	RP(+)	Purine and deriv.	2%	-10%	-23%	<b>-29%</b>	-8%	-22%	<b>-36%</b>	-18%
195.0526	4.7	M+FA-H	2	Methylhypoxanthine	5	HILIC(-)	Purine and deriv.	-22%	22%	81%	83%	1%	40%	<b>121%</b>	58%
183.0513	5.2	M+H	0	Methyluric acid	1	RP(+)	Purine and deriv.	-18%	3%	<b>100%</b>	95%	-3%	90%	<b>132%</b>	22%
165.0418	2.8	M-H	0	Methylxanthine	4	HILIC(-)	Purine and deriv.	-34%	6%	70%	62%	-5%	39%	<b>113%</b>	53%
167.0563	6.4	M+H	0	Methylxanthine	2	RP(+)	Purine and deriv.	-29%	-5%	<b>107%</b>	98%	-4%	85%	<b>137%</b>	28%
165.0418	2.8	M+FA-H	0	Purine	4	HILIC(-)	Purine and deriv.	-34%	6%	70%	62%	-5%	39%	<b>113%</b>	53%
103.0392	1.4	M+H-H <sub>2</sub> O	10	Purine	7	RP(+)	Purine and deriv.	6%	4%	<b>-28%</b>	<b>-30%</b>	-3%	-6%	-11%	-5%
482.124	7.1	M+K	10	Tetrahydrofolic acid	1	RP(+)	Purine and deriv.	13%	2%	33%	<b>41%</b>	6%	<b>47%</b>	<b>41%</b>	-4%
167.0213	6.2	M-H	1	Uric acid	1	HILIC(-)	Purine and deriv.	-9%	7%	<b>36%</b>	23%	-9%	14%	22%	6%
153.0399	2.5	M+H	5	Xanthine	3	RP(+)	Purine and deriv.	-19%	25%	-17%	<b>-51%</b>	-41%	-33%	<b>-39%</b>	-9%
231.0513	1.7	M+K	9	2,6-Dihydroxy-N-methylmyosmine	2	HILIC(+)	Pyridine and deriv.	-53%	-33%	7%	<b>28%</b>	20%	-19%	40%	73%
154.0497	6.3	M+H	1	3-Hydroxy-2-methylpyridine-5-carboxylate	1	RP(+)	Pyridine and deriv.	<b>159%</b>	<b>114%</b>	-24%	-10%	18%	<b>55%</b>	<b>51%</b>	-3%
154.0513	6.7	M+H	9	3-Hydroxy-2-methylpyridine-5-carboxylate	1	RP(+)	Pyridine and deriv.	-14%	-5%	<b>135%</b>	65%	-30%	<b>157%</b>	<b>99%</b>	-23%
144.0458	2.0	M-H-H <sub>2</sub> O	5	4-Oxo-1-(3-pyridyl)-1-butanone	2	HILIC(-)	Pyridine and deriv.	169%	<b>184%</b>	-52%	-49%	6%	-1%	10%	12%
208.0623	5.7	M+FA-H	5	4-Oxo-1-(3-pyridyl)-1-butanone	3	HILIC(-)	Pyridine and deriv.	-19%	30%	227%	80%	-45%	101%	<b>77%</b>	-12%

m/z	t <sub>R</sub> min	Adduct	Error ppm	Name	IDs /mf	Analysis	Class	% of change							
								TR-t vs CS-t	TR-s vs CS-s	CS-t vs CS-b	CS-s vs CS-b	CS-s vs CS-t	TR-t vs TR-b	TR-s vs TR-b	TR-s vs TR-t
196.0621	6.8	M+H	9	6-Hydroxy-3-succinoylpyridine	4	RP(+)	Pyridine and deriv.	-50%	-34%	<b>202%</b>	160%	-14%	102%	129%	14%
161.0908	1.1	M+H	8	N-Acetyldiaminobutyrate	3	RP(+)	Pyridine and deriv.	25%	-18%	6%	42%	34%	<b>59%</b>	39%	-13%
156.0771	9.2	M+NH4	3	Nicotinamide N-oxide	4	HILIC(+)	Pyridine and deriv.	1%	1%	<b>-39%</b>	<b>-32%</b>	10%	-28%	-21%	10%
139.0513	1.6	M+H	8	Nicotinamide N-oxide	6	RP(+)	Pyridine and deriv.	-20%	-6%	<b>-29%</b>	<b>-35%</b>	-7%	<b>-38%</b>	<b>-33%</b>	9%
120.044	5.7	M+H-H2O	3	Trigonelline	2	HILIC(+)	Pyridine and deriv.	-15%	15%	49%	31%	-12%	42%	<b>70%</b>	19%
138.0546	7.5	M+H	3	Trigonelline	2	HILIC(+)	Pyridine and deriv.	-17%	-4%	<b>69%</b>	<b>69%</b>	0%	<b>82%</b>	<b>110%</b>	16%
176.012	8.3	M+K	8	Trigonelline	2	HILIC(+)	Pyridine and deriv.	<b>-50%</b>	-13%	<b>330%</b>	<b>182%</b>	-34%	444%	<b>522%</b>	14%
138.0555	1.5	M+H	4	Trigonelline	2	RP(+)	Pyridine and deriv.	-17%	-8%	<b>95%</b>	<b>91%</b>	-2%	<b>131%</b>	<b>154%</b>	10%
172.0239	7.2	M+FA-H	10	Trihydroxypyridine	1	HILIC(-)	Pyridine and deriv.	6%	29%	15%	10%	-4%	27%	<b>49%</b>	18%
141.0659	1.4	M+H	0	1,3-Dimethyluracil	4	RP(+)	Pyrimidines and deriv.	-2%	<b>-24%</b>	-16%	-6%	12%	-23%	<b>-33%</b>	-13%
141.0659	1.4	M+H-H2O	0	5-Hydroxyectoine	4	RP(+)	Pyrimidines and deriv.	-2%	<b>-24%</b>	-16%	-6%	12%	-23%	<b>-33%</b>	-13%
218.0446	6.8	M+K	4	7-Aminomethyl-7-carbaguanine	1	RP(+)	Pyrimidines and deriv.	-50%	-31%	<b>240%</b>	<b>188%</b>	-15%	189%	240%	18%
129.0659	1.2	M+H	0	Dihydrothymine	6	RP(+)	Pyrimidines and deriv.	20%	21%	<b>-49%</b>	<b>-40%</b>	18%	-24%	-8%	20%
132.0762	7.4	M+NH4	5	Dihydrouracil	3	HILIC(+)	Pyrimidines and deriv.	132%	25%	-62%	-55%	17%	-44%	<b>-65%</b>	-37%
209.0921	4.3	M+H-H2O	0	Porphobilinogen	3	RP(+)	Pyrrole and deriv.	1034%	<b>1004%</b>	-71%	-77%	-22%	188%	<b>119%</b>	-24%
202.0495	7.1	M+H-H2O	2	8-Methoxykynurenate	2	RP(+)	Quinoline and deriv.	5%	8%	<b>63%</b>	<b>63%</b>	0%	<b>105%</b>	<b>109%</b>	2%
162.0554	7.1	M+H	3	Dihydroxyquinoline	2	RP(+)	Quinoline and deriv.	13%	16%	49%	39%	-7%	<b>121%</b>	<b>112%</b>	-4%
204.0672	5.7	M-H-H2O	5	Salsolinol 1-carboxylate	6	HILIC(-)	Quinoline and deriv.	-15%	42%	18%	-1%	-16%	29%	<b>80%</b>	40%
132.0452	1.7	M-H-H2O	2	Dopamine quinone	4	HILIC(-)	Quinone	<b>-35%</b>	-28%	-4%	23%	28%	-1%	41%	43%
132.0455	5.8	M-H-H2O	4	Dopamine quinone	4	HILIC(-)	Quinone	4%	33%	51%	26%	-16%	109%	<b>123%</b>	7%
134.0592	1.7	M+H-H2O	6	Dopamine quinone	4	HILIC(+)	Quinone	<b>-35%</b>	-19%	-3%	12%	15%	-10%	28%	43%
134.0595	7.2	M+H-H2O	4	Dopamine quinone	4	RP(+)	Quinone	<b>-26%</b>	<b>-30%</b>	-10%	16%	29%	-4%	18%	23%
337.0837	1.2	M+K	0	Vitamin K1 aglycone I	4	RP(+)	Quinone	61%	23%	<b>-68%</b>	-59%	29%	-50%	-51%	-1%
209.0677	3.7	M+FA-H	6	1,5-Anhydrosorbitol	4	HILIC(-)	Saccharide and deriv.	10%	76%	13%	8%	-4%	75%	<b>166%</b>	52%

m/z	t <sub>R</sub> min	Adduct	Error ppm	Name	IDs /mf	Analysis	Class	% of change							
								TR-t vs CS-t	TR-s vs CS-s	CS-t vs CS-b	CS-s vs CS-b	CS-s vs CS-t	TR-t vs TR-b	TR-s vs TR-b	TR-s vs TR-t
387.0076	1.6	M+K	4	2-(alpha-D-Mannosyl)-3-phosphoglycerate	3	RP(+)	Saccharide and deriv.	27%	12%	<b>-45%</b>	<b>-43%</b>	5%	-27%	<b>-32%</b>	-8%
145.0497	6.7	M+H-H2O	1	2-Dehydro-3-deoxy-fuconate	11	RP(+)	Saccharide and deriv.	32%	<b>66%</b>	-14%	-29%	-17%	34%	39%	4%
387.0076	1.6	M+K	4	2-O-(6-Phospho-alpha-mannosyl)-D-glycerate	3	RP(+)	Saccharide and deriv.	27%	12%	<b>-45%</b>	<b>-43%</b>	5%	-27%	<b>-32%</b>	-8%
259.1055	2.4	M+H-H2O	6	5-Amino-6-ribitylamino uracil	4	RP(+)	Saccharide and deriv.	-7%	10%	<b>-36%</b>	<b>-40%</b>	-7%	-28%	-20%	10%
181.0529	1.5	M+H	0	5-Methylthioribose	1	RP(+)	Saccharide and deriv.	19%	3%	<b>-42%</b>	<b>-41%</b>	3%	<b>-27%</b>	<b>-36%</b>	-11%
145.0497	6.7	M+H-H2O	0	Anhydrohexose	11	RP(+)	Saccharide and deriv.	32%	<b>66%</b>	-14%	-29%	-17%	34%	39%	4%
336.1389	1.1	M+H	4	Aspartylglycosamine	5	RP(+)	Saccharide and deriv.	-3%	-14%	<b>-26%</b>	<b>-25%</b>	1%	<b>-24%</b>	<b>-32%</b>	-10%
285.0834	5.9	M+K	5	Bis(acetamido)trideoxy-pyranose	3	RP(+)	Saccharide and deriv.	-16%	-7%	-9%	<b>-19%</b>	-11%	-13%	-14%	-2%
516.0752	7.2	M+H-H2O	5	CDP-3,6-dideoxy-hexose	1	RP(+)	Saccharide and deriv.	<b>-41%</b>	-24%	<b>-53%</b>	<b>-52%</b>	3%	-41%	-22%	32%
246.1084	1.2	M+H-H2O	1	Creatine riboside	3	RP(+)	Saccharide and deriv.	-2%	-6%	-6%	<b>-27%</b>	-23%	-4%	<b>-29%</b>	-26%
159.028	2.4	M+H-H2O	5	Dehydro-scylo-inosose	8	RP(+)	Saccharide and deriv.	2%	-10%	-23%	<b>-29%</b>	-8%	-22%	<b>-36%</b>	-18%
209.0677	3.7	M+FA-H	6	Deoxy-hexose	4	HILIC(-)	Saccharide and deriv.	10%	76%	13%	8%	-4%	75%	<b>166%</b>	52%
229.1189	1.3	M+H-H2O	2	Diacetamido-trideoxy-hexose	4	RP(+)	Saccharide and deriv.	24%	-4%	-30%	-18%	18%	-27%	<b>-33%</b>	-9%
229.119	1.4	M+H-H2O	2	Diacetamido-trideoxy-hexose	4	RP(+)	Saccharide and deriv.	1%	-16%	-13%	-3%	12%	-25%	<b>-29%</b>	-6%
247.1293	3.4	M+H	2	Diacetamido-trideoxy-hexose	2	RP(+)	Saccharide and deriv.	<b>96%</b>	<b>76%</b>	-23%	-20%	4%	<b>42%</b>	<b>32%</b>	-7%
159.028	2.4	M+H-H2O	5	Glucuronolactone	8	RP(+)	Saccharide and deriv.	2%	-10%	-23%	<b>-29%</b>	-8%	-22%	<b>-36%</b>	-18%
238.0906	1.1	M+H	6	Glycolyl-hexoseamine	2	RP(+)	Saccharide and deriv.	13%	-2%	-6%	-14%	-8%	-4%	<b>-24%</b>	<b>-21%</b>
225.063	3.6	M+FA-H	8	Hexose	5	HILIC(-)	Saccharide and deriv.	-20%	82%	<b>136%</b>	85%	-21%	112%	<b>282%</b>	80%
203.0512	7.1	M+Na	8	Hexose	2	RP(+)	Saccharide and deriv.	12%	8%	68%	<b>66%</b>	-1%	<b>116%</b>	<b>107%</b>	-4%
145.0497	6.7	M+H-H2O	0	L-Rhamnono-1,4-lactone	11	RP(+)	Saccharide and deriv.	32%	<b>66%</b>	-14%	-29%	-17%	34%	39%	4%
225.063	3.6	M+FA-H	8	myo-Inositol	5	HILIC(-)	Saccharide and deriv.	-20%	82%	<b>136%</b>	85%	-21%	112%	<b>282%</b>	80%
203.0512	7.1	M+Na	8	myo-Inositol	2	RP(+)	Saccharide and deriv.	12%	8%	68%	<b>66%</b>	-1%	<b>116%</b>	<b>107%</b>	-4%

m/z	t <sub>R</sub> min	Adduct	Error ppm	Name	IDs /mf	Analysis	Class	% of change								
								TR-t vs CS-t	TR-s vs CS-s	CS-t vs CS-b	CS-s vs CS-b	CS-s vs CS-t	TR-t vs TR-b	TR-s vs TR-b	TR-s vs TR-t	
336.1389	1.1	M+H	4	N4-(N-Acetyl-glucosaminy)- asparagine	5	RP(+)	Saccharide and deriv.	-3%	-14%	<b>-26%</b>	<b>-25%</b>	1%	<b>-24%</b>	<b>-32%</b>	-10%	
204.0872	1.2	M+H-H2O	2	N-Acetylhexosamine	3	RP(+)	Saccharide and deriv.	2%	1%	<b>-27%</b>	<b>-22%</b>	6%	-20%	-15%	6%	
222.0981	1.2	M+H	4	N-Acetylhexosamine	6	RP(+)	Saccharide and deriv.	9%	16%	-20%	<b>-29%</b>	-11%	7%	1%	-6%	
222.0967	2.5	M+H	2	N-Acetylhexosamine	5	RP(+)	Saccharide and deriv.	-15%	-8%	-18%	<b>-32%</b>	-17%	-5%	-15%	-10%	
384.1502	1.3	M+H	0	N-acetylhexosesamine	3	RP(+)	Saccharide and deriv.	1%	-13%	-19%	-21%	-2%	-14%	<b>-28%</b>	-16%	
292.1038	1.4	M+H-H2O	3	N-Acetylneuraminic acid	1	RP(+)	Saccharide and deriv.	-2%	2%	-18%	<b>-32%</b>	-17%	0%	-14%	-14%	
348.0705	6.8	M+K	4	N-Acetylneuraminic acid	4	RP(+)	Saccharide and deriv.	<b>-29%</b>	<b>-27%</b>	10%	18%	7%	-8%	1%	10%	
239.081	1.1	M+H-H2O	8	Nicotinate ribonucleoside	2	RP(+)	Saccharide and deriv.	6%	12%	<b>-47%</b>	-43%	8%	<b>-51%</b>	<b>-44%</b>	14%	
288.1176	1.1	M+H	5	N-Ribosylhistidine	3	RP(+)	Saccharide and deriv.	0%	-4%	<b>-29%</b>	-23%	9%	-27%	-24%	5%	
209.0677	3.7	M-H	5	Sedoheptulose	4	HILIC(-)	Saccharide and deriv.	10%	76%	13%	8%	-4%	75%	<b>166%</b>	52%	
191.0557	6.6	M-H-H2O	1	Sedoheptulose	8	HILIC(-)	Saccharide and deriv.	5%	50%	<b>115%</b>	95%	-9%	<b>178%</b>	<b>261%</b>	30%	
103.0392	1.4	M+H-H2O	1	Tetrose	7	RP(+)	Saccharide and deriv.	6%	4%	<b>-28%</b>	<b>-30%</b>	-3%	-6%	-11%	-5%	
159.028	2.4	M+H-H2O	5	Xylo-Hexulonolactone	8	RP(+)	Saccharide and deriv.	2%	-10%	-23%	<b>-29%</b>	-8%	-22%	<b>-36%</b>	-18%	
656.2002	1.5	M+Na	1	Sialyllactose	1	RP(+)	Saccharide and deriv.	11%	15%	<b>-33%</b>	<b>-42%</b>	-13%	-22%	<b>-30%</b>	-10%	
377.2474	6.9	M+Na	6	Cholatrienoic Acid	2	RP(+)	Sterol and deriv.	-56%	<b>-52%</b>	7%	12%	4%	69%	92%	14%	
313.2177	8.3	M+H	5	Didehydroprogesterone	2	HILIC(+)	Sterol and deriv.	1%	-12%	<b>49%</b>	<b>47%</b>	-1%	<b>63%</b>	<b>40%</b>	-14%	
309.127	1.1	M+K	7	Estradienedione	4	RP(+)	Sterol and deriv.	3%	-4%	-14%	<b>-18%</b>	-4%	<b>-17%</b>	<b>-26%</b>	-10%	
309.127	1.1	M+K	7	Estratetraenediol	4	RP(+)	Sterol and deriv.	3%	-4%	-14%	<b>-18%</b>	-4%	<b>-17%</b>	<b>-26%</b>	-10%	
309.127	1.1	M+K	7	Estrone	4	RP(+)	Sterol and deriv.	3%	-4%	-14%	<b>-18%</b>	-4%	<b>-17%</b>	<b>-26%</b>	-10%	
285.1873	1.7	M+H-H2O	8	Hydroxyandrostenedione	3	RP(+)	Sterol and deriv.	<b>-40%</b>	-14%	<b>85%</b>	63%	-12%	41%	80%	27%	
285.1873	1.7	M+H-H2O	8	Hydroxyestradiol-methyl ether	3	RP(+)	Sterol and deriv.	<b>-40%</b>	-14%	<b>85%</b>	63%	-12%	41%	80%	27%	
309.127	1.1	M+K	7	Hydroxyestratrienone	4	RP(+)	Sterol and deriv.	3%	-4%	-14%	<b>-18%</b>	-4%	<b>-17%</b>	<b>-26%</b>	-10%	
313.2177	8.3	M+H-H2O	4	Hydroxyprogesterone	2	HILIC(+)	Sterol and deriv.	1%	-12%	<b>49%</b>	<b>47%</b>	-1%	<b>63%</b>	<b>40%</b>	-14%	
285.1873	1.7	M+H-H2O	8	Oxotestosterone	3	RP(+)	Sterol and deriv.	<b>-40%</b>	-14%	<b>85%</b>	63%	-12%	41%	80%	27%	

m/z	t <sub>R</sub> min	Adduct	Error ppm	Name	IDs /mf	Analysis	Class	% of change								
								TR-t vs CS-t	TR-s vs CS-s	CS-t vs CS-b	CS-s vs CS-b	CS-s vs CS-t	TR-t vs TR-b	TR-s vs TR-b	TR-s vs TR-t	
245.0137	2.9	M-H-H <sub>2</sub> O	7	3-Methoxy-4-hydroxyphenyl- ethyleneglycol sulfate	1	HILIC(-)	Sulfate-ester	<b>-57%</b>	-41%	<b>189%</b>	<b>151%</b>	-13%	153%	204%	20%	
329.0291	1.6	M+Na	3	Hydroxy-(dihydroxyphenyl)- valeric acid-O-sulphate	1	RP(+)	Sulfate-ester	<b>-29%</b>	-13%	<b>109%</b>	<b>73%</b>	-17%	<b>80%</b>	<b>83%</b>	2%	
291.0518	1.3	M+H	5	Hydroxy-(hydroxyphenyl)- valeric acid-O-sulphate	1	RP(+)	Sulfate-ester	-5%	26%	39%	50%	8%	<b>92%</b>	<b>176%</b>	44%	
199.0827	1.8	M+H	1	5-Acetylamino-6-amino-3- methyluracil	3	RP(+)	Urea and deriv.	-12%	53%	81%	51%	-16%	112%	<b>207%</b>	45%	
199.0827	1.8	M+H	1	Amino-[N-methylformyl- amino]-methyluracil	3	RP(+)	Urea and deriv.	-12%	53%	81%	51%	-16%	112%	<b>207%</b>	45%	
139.0251	4.6	M-H-H <sub>2</sub> O	3	Allantoin	1	HILIC(-)	Urea and deriv.	<b>29%</b>	15%	6%	7%	1%	-6%	-15%	-10%	
262.1221	5.0	M+NH <sub>4</sub>	0	Biotin	1	HILIC(+)	Urea and deriv.	69%	-38%	<b>-83%</b>	-67%	87%	-60%	-72%	-32%	
153.0303	4.2	M-H-H <sub>2</sub> O	2	Hydantoin-5-propionic acid	2	HILIC(-)	Urea and deriv.	10%	-1%	<b>-29%</b>	<b>-27%</b>	3%	-16%	-22%	-8%	
190.9859	1.6	M+Cl	4	Orotic acid	1	HILIC(-)	Urea and deriv.	31%	40%	58%	63%	4%	<b>81%</b>	<b>101%</b>	11%	
209.0677	3.7	M-H	1	Trimethyluric acid	4	HILIC(-)	Urea and deriv.	10%	76%	13%	8%	-4%	75%	<b>166%</b>	52%	
191.0557	6.6	M-H-H <sub>2</sub> O	6	Trimethyluric acid	8	HILIC(-)	Urea and deriv.	5%	50%	<b>115%</b>	95%	-9%	<b>178%</b>	<b>261%</b>	30%	
193.0713	1.3	M+H-H <sub>2</sub> O	4	Trimethyluric acid	2	RP(+)	Urea and deriv.	-5%	13%	<b>112%</b>	<b>94%</b>	-9%	<b>197%</b>	<b>222%</b>	9%	
129.0659	1.2	M+H-H <sub>2</sub> O	0	Ureidoisobutyric acid	6	RP(+)	Urea and deriv.	20%	21%	<b>-49%</b>	<b>-40%</b>	18%	-24%	-8%	20%	

IDs/mf: number of identifications by *molecular feature*. The percentage of change in bold are significant by univariate analysis (p < 0.05).

## Súmula Curricular

### Dados pessoais

- Nome: Andréa Tedesco Faccio
- Local e data de nascimento: São Paulo, SP - 08/02/1988

### Educação

- Doutorado em Ciências (Química) *atual*  
Instituto de Química - USP  
“Estudo do efeito de estatinas e antiplaquetários na evolução do infarto agudo do miocárdio: uma abordagem metabolômica multiplataforma”  
Orientadora: Prof. Marina Franco Maggi Tavares – Universidade de São Paulo  
Período de sanduíche: Universidad CEU San Pablo (Espanha) *2015-2017*  
Supervisor: Prof. Francisco Javier Rupérez
- Mestrado em Ciências (Químicas) *2015*  
Instituto de Química - USP  
“Abordagem metabolômica no estudo da exposição gestacional à poluição atmosférica”  
Orientadora: Prof. Marina Franco Maggi Tavares – University of Sao Paulo
- Bacharelado em Química *2011*
- Instituto de Química - USP

### Bolsas de Estudo

- INOVA Talentos *2019- atual*  
Agência de fomento: CNPq/ Grupo Fleury/ IEL
- Doutorado  
Agência de fomento: CNPq *2018- 2019*  
Agência de fomento (sanduíche): EADS-CASA e Força Aerea brasileira *2015-2017*
- Mestrado *2013-2015*  
Agência de fomento: CNPq
- Iniciação científica *2008-2010*  
Agência de fomento: FAPESP

### Trabalho

- Estágio *2011-2012*  
Company: Braskem S.A. Area: Controle de Qualidade

### Publicações

- Siqueira, F. A., Ishikawa, E. E., Fogaça, A., Faccio, A. T., Carneiro, V. M. T., Soares, R. R. S, Utaka, A., Tébeka, I. R. M., Bielawski, M., Olofsson, B, Silva Jr, L. F. (2011) “Metal-free synthesis of indanes by iodine(III)-mediated ring contraction of 1,2-dihydronaphthalenes” **J. Braz. Chem. Soc.**, 22(9), 1795-1807.
- Canuto, G.A., da Cruz, P.L.R., Faccio, A. T., Klassen, A., Tavares, M.F.M. (2015) “Neglected diseases prioritized in Brazil under the perspective of metabolomics. A Review” **Electrophoresis**, 18, 2336-2347.

- Canuto, G. A. B., Costa, J. L., Cruz, P. L. R., Souza, A. R. L., Faccio, A. T., Klassen, A., Rodrigues, K. T., Tavares, M. F. M. (2017) "Metabolômica: Definições, Estado-da-arte e Aplicações Representativas". **Quím. Nova**, 41, 75-91.
- Faccio, A. T., Ruperez, F. J., Singh, N. S., Angulo, S., Tavares, M. F.M., Bernier, M., Barbas, C., Wainer, I. W. (2018) "Stereochemical and structural effects of (2R,6R)-hydroxynorketamine on the mitochondrial metabolome in PC-12 cells" **Biochim. Biophys. Acta**, 1862(6), 1505-1515.
- Santos, J. R., Waitzberg, D. L., da Silva, I., Junior, T., Barros, L., Canuto, G., Faccio, A. T., Yamaguchi, L. F., Kato, M. J., Tavares, M., Martinez, A. C., Logullo, Â. F., Torrinhas, R., & Ravacci, G. (2020). "Distinct pattern of one-carbon metabolism, a nutrient-sensitive pathway, in invasive breast cancer: A metabolomic study". **Oncotarget**, 11(18), 1637–1652.
- Capítulo de livro: Klassen, Aline ; Faccio, Andréa Tedesco ; Canuto, Gisele André Baptista ; da Cruz, Pedro Luis Rocha ; Ribeiro, Henrique Caracho ; Tavares, Marina Franco Maggi ; Sussulini, Alessandra "Metabolomics: Definitions and Significance in Systems Biology". *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 1ed.: Springer International Publishing, 2017, 3-17.

### Eventos científicos

- Secretaria do "34th International Symposium on Microscale Separations and Bioanalysis" (MSB 2018)
- Secretaria do "21st International Symposium on Electro- and Liquid Phase-Separation Techniques and 20th Latin-American Symposium on Biotechnology, Biomedical, Biopharmaceutical, and Industrial Applications of Capillary Electrophoresis and Microchip Technology" (ITP & LACE 2014)
- Apresentação de poster no "31st International Symposium on Chromatography" (ISC 2016). "Towards increasing metabolite coverage by combination of sample preparation, HILIC and reversed-phase LC/MS"  
Autores: Andrea T. Faccio, Marina F. M. Tavares, Coral Barbas, Francisco J. Rupérez
- Apresentação de poster no "21st International Symposium on Electro- and Liquid Phase-Separation Techniques and 20th Latin-American Symposium on Biotechnology, Biomedical, Biopharmaceutical, and Industrial Applications of Capillary Electrophoresis and Microchip Technology" (ITP & LACE 2014)  
"HILIC-MS method optimization for untargeted urinary metabolomics"  
Autores: Faccio, A. T., Klassen, A., Dörr, F. A., Pinto Jr., E., Tavares, M. F. M.
- Apresentação de poster na "33ª Reunião anual da Sociedade Brasileira de Química" (SBQ 2010)  
"1,2-dihydronaphthalenes oxidation with I(III) in fluorinated alcohols"  
Autores: Faccio, A. T., Carneiro, V. M. T., Silva Jr, L.F.
- Apresentação oral no "34th International Symposium on Microscale Separations and Bioanalysis" (MSB 2018)  
"Metabolomics approach to the study of gestational exposure to air pollution"  
Autores: Faccio, A. T., Klassen, A., Kato, J. M., Yamaguchi, L. F., Veras, M. M., Saldiva, P.H. N., Tavares, M.F.M.
- 2º lugar – Melhor apresentação oral no "28th International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis" (PBA 2017)  
"Mitochondrial Response of PC-12 cells to Ketamine and hydroxynorketamine evaluated by a multiplatform approach"  
Autores: Andrea Tedesco Faccio; Francisco J. Rupérez; Marina F. M. Tavares; Kayley Govinden; Michel Bernier; Irving Wainer; Coral Barbas