UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas
Área de Toxicologia

Investigação metabolômica da toxicidade da cocaína em ratos
submetidos à privação de sono, utilizando cromatografia
líquida acoplada à espectrometria de massas

Lucas André Lobo Gomes

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Marina F. M. Tavares

São Paulo
2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas
Área de Toxicologia

Investigação metabolômica da toxicidade da cocaína em ratos
submetidos à privação de sono, utilizando cromatografia
líquida acoplada à espectrometria de massas

Versão original encontra-se disponível no Serviço de Pós-Graduação da FCF/USP.

Lucas André Lobo Gomes

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Marina F. M. Tavares

São Paulo
2013

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

G633i Gomes, Lucas André Lobo
Investigação metabolômica da toxicidade da cocaína em ratos submetidos à privação de sono, utilizando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa / Lucas André Lobo Gomes. -- São Paulo, 2013.
148p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientador: Tavares, Marina Franco Maggi

1. Toxicologia forense 2. Toxicologia clínica 3. Cocaína : Toxicologia I. T. II. Tavares, Marina Franco Maggi, orientador.

615.9 CDD

Lucas André Lobo Gomes

Investigação metabolômica da toxicidade da cocaína em ratos submetidos à privação de sono, utilizando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Marina F. M. Tavares
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me permitido chegar até este ponto de minha vida.

À minha família que, por mais que eu quisesse, é quem me apoia para estar nesta empreitada. Especialmente ao meu amado pai, Paulo André, por tudo o que ele já dedicou e dedica a mim e à minha mãe, Eliude Lobo, pelo forte amor e apoio mesmo de longe.

Agradeço à minha orientadora Marina Tavares pela oportunidade de crescer na ciência brasileira, aprendendo a cada vez mais me superar e ao professor João Farah por me ensinar a diferença entre “pesquisador” e “cientista”.

Agradeço à minha colaboradora Monica Andersen pela oportunidade, conhecimento e inigualável força e motivação quando eu mais precisei.

Agradeço ao professor Massuo Jorge Kato e à Lydia Fumiko do IQ/USP, pela preciosa colaboração com a cromatografia e espectrometria de massas e principalmente pela boa vontade. Agradeço também ao mestrando Celso Ricardo do mesmo laboratório pelas dicas.

Agradeço imensamente pelo conhecimento tanto acadêmico com pessoal que obtive com o Altay Lino. Suas palavras edificavam minha estrada como argamassa, cimentando as pedras soltas que apareciam. E ao Augusto Tomba, que me inspirava com conversas imensamente construtivas sobre praticamente qualquer coisa.

Aos meus amigos de laboratório LACE que me ajudaram com fundamentações mínimas como a Aline Klassen e a Aline Vitor; à Gisele Canuto e à Karina Trevisan pelas dicas e conselhos no laboratório; ao Daniel Polesel pelo apoio e pelas palavras do começo desta jornada; à Maryane Bertelli e Grazielle Anaia pelas conversas interessantes, ajuda e descontração.

Aos meus queridos amigos da UNIFESP: Karen Tieme pelas doces palavras e pela confiança; Gabriel Pires pelas dicas e pelas agradáveis conversas; à Tathiana Alvarenga e a Gabriela pelo apoio lógico e acadêmico; à Andréia Gomes Bezerra pelo apoio logístico com os animais solicitados, com os quais esse trabalho não seria possível; ao “Renato-Guilherme”, codinome dos inseparáveis Renato Watanabe e Guilherme Silva, pelas conversas descontraídas.

Em especial, à Camila Hirotsu, pela ajuda imprescindível, apoio metodológico e finalmente pelo inesquecível aprendizado sobre a imagem incorruptível de um “cientista exemplar”.

Às pessoas que conheci em São Paulo que tanto me apoiaram nesta caminhada pela nova cidade: Johnny Lapís, Ana Carolina Cruz, Júlia Van Langendonck, Camila Abecassis, Walter Elisio, Othon, Evandro José, Inaê Santiago, Fernanda Santana e Fernanda Shinagawa, Mary Szabó, Michel Munro e vários outros o qual, por meio de encontros e desencontros, fizeram meus dias aqui um pouco mais felizes.

Àquelas pessoas que eu amo e não posso ter perto a mim hoje, que representam tantas coisas em minha vida, obrigado pelas memórias e me desculpem pelos erros.

Aos animais pelos quais foram eutanasiados em prol deste trabalho e da ciência.

Agradeço, por fim à Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (CAPES), à Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Associação Fundo de Incentivo à Pesquisa (AFIP) pelo apoio financeiro e técnico neste estudo.

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação à minha filha Beatriz Lobo por ser o farol que guia minha vida, hoje. Passei e passarei por qualquer mal se eu tiver sua presença em meu lado, pois serei inabalável.

Dedico à minha nova família também, cujos representantes são minha filha e a Nair Cristina do Nascimento Araújo, por ter me dado esta graça e pelo incansável apoio nesta jornada. Obrigado por representarem o azimute atual de minha vida.

Dedico também à memória de minha amada amiga Amanda Figueiredo que faleceu devido à correria do mundo moderno enquanto eu estava em São Paulo. Seus ensinamentos em vida e o que sua partida me representou, são lições que eu nunca vou esquecer.

“Ser feliz deve, acima de tudo, ser nosso maior alvo.”

“Scientia et respectu conatu stipendium”
(“A ciência e o respeito pagam o esforço”)

RESUMO

Em uma sociedade que lida com pressão diariamente para completar suas tarefas, a privação de sono é uma consequência comum. Como artifício para manter-se apto a trabalhar ou se divertir à noite, algumas pessoas utilizam a cocaína, cujo consumo é estudado há décadas, mas cuja associação com a privação de sono ainda não foi avaliada pela toxicologia. Este estudo utiliza a metabolômica para gerar um mapa de alterações metabólicas associadas a estas condições e sua interação. Utilizando análise cromatográfica líquida no modo HILIC e espectrometria de massas com um analisador do tipo “tempo de voo” (TOF), os cromatogramas e espectros urinários de 60 ratos Wistar machos foram analisados utilizando o pacote *XCMS (Bioconductor)* na plataforma *R*. Os tratamentos estatísticos de dados (PCA, OPLS-DA, MANOVA) foram realizados através dos programas *SIMCA 11 P+* e *IBM SPSS*, culminando em atribuições putativas dos metabólitos discriminantes nas condições estudadas (efeito da cocaína, efeito da privação total de sono e seu efeito combinado). Foram então evidenciados cinco marcadores biológicos de dano associados à cocaína, três associados à privação de sono e dois à sua interação. Estes metabólitos foram identificados putativamente através de busca em banco de dados (*Metlin*, *MassTrix*, *HMDB*, *Lipidmaps*) e tiveram suas rotas metabólicas associadas através do banco de rotas metabólicas *KEGG*. Há diferenças metabólicas estatisticamente evidenciáveis e inclusive duradouras nas vias do ciclo da tirosina e do sistema dopaminérgico, além do ciclo do citrato.

Palavras-chaves: Metabolômica; Cocaína; Privação de sono; HILIC-EM;

ABSTRACT

In a society that deals daily with pressure to complete its tasks, sleep deprivation is a common consequence. As an excuse to keep oneself fit to work but to have fun at night some people use cocaine, whose consumption is studied for decades, but the association with sleep deprivation had not yet been evaluated by toxicology. This study uses metabolomics to generate a map of metabolic abnormalities associated with these conditions and its iteration. Using liquid chromatographic in HILIC mode and "time of flight" mass spectrometry (TOF), mass chromatograms of urine from 60 male Wistar rats were analysed using XCMS package (Bioconductor) running on R platform. Statistical data treatment (PCA, OPLS-DA, MANOVA) were performed using the programs SIMCA P + 11 and IBM SPSS, culminating in putative metabolites assignments that discriminate the conditions in the study (cocaine effect, total sleep deprivation effect and their combined effect). We highlighted five biological markers of damage associated with cocaine, three associated with sleep deprivation and their iteration. These metabolites were putatively identified by public databases (Metlin, MassTriX, HMDB, Lipidmaps) and their associated metabolic pathways were assessed through KEGG database. There are significant differences on metabolic pathways of the tyrosine cycle, the dopaminergic system and the citrate cycle.

Keywords: Metabolomics, Cocaine, Sleep Deprivation, HILIC-MS;

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Score plot de componentes principais e seus vetores de influência	23
FIGURA 2 – Representação esquemática da fase estacionária HILIC contendo sulfoalquenobetainas zwitteriônicas.....	30
FIGURA 3 – Quantidade de produção mundial de cocaína em toneladas segundo vários estudos	44
FIGURA 4 – Interface do programa G*POWER3 para cálculo de tamanho amostral	52
FIGURA 5 – Fotos das gaiolas metabólicas.....	53
FIGURA 6 – Fotos das gaiolas metabólicas.....	53
FIGURA 7 – Protocolo experimental	55
FIGURA 8A E 8B – Gráficos do desvio do tempo de retenção após realinhamento pelo XCMS	61
FIGURA 9 – PCA dos QC para teste de qualidade e estabilidade das análises	63
FIGURA 10A – PCA das amostras urinárias basais de todos os 60 animais.....	64
FIGURA 10B – PCA das amostras urinárias basais de todos os 58 animais restantes	64
FIGURA 10C – Histograma de frequência e estatísticas prévias dadas pelo SIMCA	65
FIGURA 11A – Gráfico de dispersão (PCA) das amostras urinárias de 12h dos grupos sob Salina ou Cocaína.	66
FIGURA 11B – Gráfico de dispersão (OPLS-DA) das amostras urinárias de 12h dos grupos sob Salina ou Cocaína	66
FIGURA 11C – Gráfico de validação (PLS) com 100 permutações de 2 componentes das amostras urinárias de 12h dos grupos sob Salina ou Cocaína	67
FIGURA 11D – Gráfico-S (OPLS-DA) de variância contra correlação das amostras urinárias de 12h dos grupos sob Salina ou Cocaína.....	67
FIGURA 11E – Gráfico de variáveis importantes na projeção (OPLS-DA) das amostras urinárias de 12h dos grupos sob Salina ou Cocaína	68
FIGURA 12A – Gráfico de dispersão (PCA) das amostras urinárias de 12h dos grupos Salina x Privação total de sono (PTS).....	69
FIGURA 12B – Gráfico de dispersão (OPLS-DA) das amostras urinárias de 12h dos grupos Salina x Privação total de sono (PTS).....	69
FIGURA 12C – Gráfico de validação (PLS) com 100 permutações de 2 componentes das amostras urinárias de 12h dos grupos Salina x Privação total de sono (PTS).....	70
FIGURA 12D – Gráfico-S (OPLS-DA) de variância contra correlação das amostras urinárias de 12h dos grupos Salina x Privação total de sono (PTS)	70
FIGURA 12E – Gráfico de variáveis importantes na projeção (OPLS-DA) das amostras urinárias de 12h dos grupos Salina x Privação total de sono (PTS).....	71
FIGURA 13A – Gráfico de dispersão (PCA) das amostras urinárias de 12h dos grupos Salina x Cocaína+Privação total de sono (PTS)	72
FIGURA 13B – Gráfico de dispersão (OPLS-DA) das amostras urinárias de 12h dos grupos Salina x Cocaína+Privação total de sono (PTS)	73
FIGURA 13C – Gráfico de validação (PLS) com 100 permutações de 2 componentes das amostras urinárias de 12h dos grupos Salina x Cocaína+Privação total de sono (PTS)	73
FIGURA 13D – Gráfico-S (OPLS-DA) de variância contra correlação das amostras urinárias de 12h dos grupos Salina x Cocaína+Privação total de sono (PTS)	74

FIGURA 13E – Gráfico de variáveis importantes na projeção (OPLS-DA) das amostras urinárias de 12h dos grupos Salina x Cocaína+Privação total de sono (PTS).....	74
FIGURA 14A – Gráfico de dispersão (PCA) das amostras urinárias de 12h dos grupos Salina+ PTS x Cocaína+ PTS	76
FIGURA 14B – Gráfico de dispersão (OPLS-DA) das amostras urinárias de 12h dos grupos Salina+ PTS x Cocaína+ PTS	76
FIGURA 14C – Gráfico de validação (PLS) com 100 permutações de 2 componentes das amostras urinárias de 12h dos grupos Salina+ PTS x Cocaína+ PTS	77
FIGURA 14D – Gráfico-S (OPLS-DA) de variância contra correlação das amostras urinárias de 12h dos grupos Salina+ PTS x Cocaína+ PTS.....	77
FIGURA 14E – Gráfico de variáveis importantes na projeção (OPLS-DA) das amostras urinárias de 12h dos grupos Salina+ PTS x Cocaína+ PTS	78
FIGURA 15A – Gráfico de dispersão (PCA) das amostras urinárias de 12h dos grupos Cocaína x Cocaína+ PTS.....	79
FIGURA 15B – Gráfico de dispersão (OPLS-DA) das amostras urinárias de 12h dos grupos Cocaína x Cocaína+ PTS.....	80
FIGURA 15C – Gráfico de validação (PLS) com 100 permutações de 2 componentes das amostras urinárias de 12h dos grupos Cocaína x Cocaína+ PTS	80
FIGURA 15D – Gráfico-S (OPLS-DA) de variância contra correlação das amostras urinárias de 12h dos grupos Cocaína x Cocaína+ PTS	81
FIGURA 15E – Gráfico de variáveis importantes na projeção (OPLS-DA) das amostras urinárias de 12h dos grupos Cocaína x Cocaína+ PTS.....	81
FIGURA 16A – Gráfico de dispersão (PCA) das amostras urinárias de 12h pós-agudo de Salina x Cocaína.	83
FIGURA 16B – Gráfico de dispersão (OPLS-DA) das amostras urinárias de pós-agudo de Salina x Cocaína	83
FIGURA 16C – Gráfico de validação (PLS) com 100 permutações de 2 componentes das amostras urinárias de 12h pós-agudo de Salina x Cocaína.....	84
FIGURA 16D – Gráfico-S (OPLS-DA) de variância contra correlação das amostras urinárias de 12h pós-agudo de Salina x Cocaína.....	84
FIGURA 16E – Gráfico de variáveis importantes na projeção (OPLS-DA) das amostras urinárias de 12h pós-agudo de Salina x Cocaína	85
FIGURA 17A – Gráfico de dispersão (PCA) das amostras urinárias de 12h dos grupos pós-agudo de Salina x PTS.....	86
FIGURA 17B – Gráfico de dispersão (OPLS-DA) das amostras urinárias de 12h pós-agudo de Salina x PTS.....	87
FIGURA 17C – Gráfico de validação (PLS) com 100 permutações de 2 componentes das amostras urinárias de 12h pós-agudo de Salina x PTS	87
FIGURA 17D – Gráfico-S (OPLS-DA) de variância contra correlação das amostras urinárias de 12h pós-agudo de Salina x PTS	88
FIGURA 17E – Gráfico de variáveis importantes na projeção (OPLS-DA) das amostras urinárias de 12h pós-agudo de Salina x PTS	88
FIGURA 18A – Desenho de rota metabólica derivada do banco de dados KEGG evidenciando a Metoxitiramina no ciclo da Tirosina.	98
FIGURA 18B – Desenho de rota metabólica derivada do banco de dados KEGG evidenciando a metoxitiramina nos processos sinápticos	99
FIGURA 19 – Desenho de rota metabólica derivada do banco de dados KEGG evidenciando o ácido cítrico no ciclo do citrato.	100

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Parâmetros sugeridos para utilização do XCMS na metabolômica	32
TABELA 2 – Consequências evidenciadas na literatura sobre privação de sono	40
TABELA 3 – Tempo de ação, pico de efeitos, duração da euforia e tempo de meia-vida de acordo com as rotas de administração	45
TABELA 4 – Tabela de massas-carga de alta correlação e variância ($\rho > 0,7$) no modelo de amostras urinárias de 12h dos grupos sob Salina ou Cocaína	68
TABELA 5 – Tabela de massas-carga de alta correlação ($\rho > 0,7$) com o modelo de amostras urinárias de 12h dos grupos Controle e sob Privação total de sono.....	71
TABELA 6 – Tabela de massas-carga de alta correlação ($\rho > 0,7$) com o modelo de amostras urinárias de 12h dos grupos Salina contra o de iteração Cocaína + PTS .	75
TABELA 7 – Tabela de massas-carga de alta correlação ($\rho > 0,7$) com o modelo de amostras urinárias de 12h do grupo Salina + PTS contra o de Cocaína + PTS.....	78
TABELA 8 – Tabela de massas-carga de alta correlação ($\rho > 0,7$) com o modelo de amostras urinárias de 12h do grupo Cocaína contra o de Cocaína + PTS	82
TABELA 9 – Tabela de massas-carga de alta correlação ($\rho > 0,7$) com o modelo de amostras urinárias de 12h após 1 mês da exposição do grupo Salina x Cocaína.....	85
TABELA 10 – Tabela de massas-carga de alta correlação ($\rho > 0,7$) com o modelo de amostras urinárias de 12h após 1 mês da exposição do grupo PTS contra o Controle.....	89
TABELA 11 – Tabela de massas-carga de alta correlação ($\rho > 0,7$) derivados de todos os protocolos	89
TABELA 12 – Tabela de massas-carga de alta correlação ($\rho > 0,7$) e com significância direta com as condições de estudo após tratamento estatístico MANOVA e post-hoc Bonferroni	90
TABELA 13 – Tabela de identificações putativas das massas estudadas por cálculo teórico e por pesquisa em banco de dados.....	92

SUMÁRIO

<u>RESUMO</u>	10
<u>ABSTRACT</u>	11
<u>1 - INTRODUÇÃO</u>	17
<u>2 - REVISÃO DE LITERATURA</u>	20
2.1 – METABOLÔMICA.....	20
2.1.2 – Biomarcadores.....	24
2.1.3 – Etapas de um estudo metabolômico.....	25
2.1.3.1 – Desenho experimental.....	26
2.1.3.2 – Protocolo experimental.....	26
2.1.3.3 – Técnicas analíticas.....	27
2.1.3.4 – Análise de dados	31
2.1.3.5 – Interpretação de dados	35
2.2 – O SONO E SUA PRIVAÇÃO	36
2.2.1 – Fisiologia do sono.....	37
2.2.2 – Efeitos da privação do sono.....	39
2.3 – O USO DA COCAÍNA.....	42
2.3.1 – Contextualização.....	42
2.3.2 – Vias de administração.....	45
2.3.3 – Toxicodinâmica	45
<u>3 - OBJETIVOS</u>	49
<u>4 - MATERIAL E MÉTODOS</u>	51
4.1 – ANIMAIS	51
4.2 – COLETA DE AMOSTRAS DE URINA.....	53
4.3 – PRIVAÇÃO TOTAL DE SONO (PTS)	53
4.4 – GRUPOS EXPERIMENTAIS	54
4.5 – PREPARO DAS AMOSTRAS.....	56
4.6 – REAGENTES E PADRÕES.....	56
4.7 – INSTRUMENTAÇÃO CLAE-EM.....	56
4.8 – TRATAMENTO DE DADOS	57
<u>5 - RESULTADOS</u>	60
5.1 – PROTOCOLO EXPERIMENTAL	60
5.2 – ANÁLISE CROMATOGRÁFICA.....	60
5.3 – PRÉ-ANÁLISE DOS DADOS	60
5.4 – RESULTADOS DAS ANÁLISE DOS DADOS.....	62
5.4.1 – Resultados dos controles.....	62
5.4.1.1 – PCA das amostras QC	62
5.4.1.2 – PCA do controle da variabilidade biológica dos animais.....	63
5.4.2 – Resultados do experimento Salina x Cocaína.....	65
5.4.3 – Resultados do experimento Salina x Privação total de sono (PTS).....	68
5.4.4 – Resultados do experimento Salina x Cocaína+Privação total de sono (PTS)	75
5.4.5 – Resultados do experimento Salina+ PTS x Cocaína+ PTS.....	78
5.4.6 – Resultados do experimento Cocaína x Cocaína+ PTS.....	82
5.4.7 – Resultados do experimento pós-agudo de Salina x Cocaína	85
5.4.8 – Resultados do experimento pós-agudo de Salina x PTS.....	89
5.4.9 – Conjunção dos dados interestudo	89
<u>6 - DISCUSSÃO E CONCLUSÕES</u>	96
<u>7 - COLABORAÇÕES</u>	102
<u>8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	104
<u>9 - ANEXOS</u>	115

INTRODUÇÃO

---

1. INTRODUÇÃO

A falta de descanso tende a ser convertida em uma ameaça para a segurança do sistema de vida e, no mesmo sentido, poucos fenômenos fisiológicos têm sofrido modificações tão importantes no contexto social e ambiental como o sono. Atualmente, 45% da população de cidades industrializadas estão submetidas a uma restrição crônica de sono (SCHWARTZHAUPT *et al.*, 2008, TUFUK, *et al.*, 2008).

Uma boa noite de sono é fundamental para uma boa saúde mental e emocional. Ela é essencial na manutenção de uma vida saudável e na fisiologia do organismo, regulando processos de reparo corporal, regulação homeostática diversa e para a consolidação da memória (ANDERSEN *et al.*, 2005; TUFUK *et al.*, 2008). Fatores aditivos a estas condições, como horários estendidos de estudo ou trabalho, hábitos alimentares inadequados, comportamentos sedentários aliados à necessidade de entretenimento geram padrões alterados de ciclo vigília-sono incompatíveis com as necessidades ideais de sono (CARSKADON *et al.*, 2004; MOORE *et al.*, 2008). É por esta necessidade de descontração e diversão que a utilização de estimulantes do sistema nervoso central se tornaram tão requisitados, tanto nas noites de festas, como na volta ao trabalho, para dar conta do débito de sono acumulado.

Com a venda controlada dos compostos anfetamínicos e a relativa facilidade atual de encontrar fornecedores de drogas ilícitas (derivado do grande apelo dos grupos sociais noturnos), a cocaína acaba se tornando um acompanhante quase rotineiro em festas e baladas noturnas de metrópoles, particularmente em São Paulo. O uso da cocaína como alternativa para resistir ao cansaço derivado da privação de sono, pode potencializar o estresse que o corpo enfrenta até que possa se recuperar, causando danos latentes que podem levar a condições nocivas graves ao usuário.

Os usuários “recreativos” (não problemáticos), particularmente pela própria censura, não tem um acompanhamento quanto aos possíveis danos que podem ser gerados subcl clinicamente, fazendo com que enfermidades latentes não possam ser reconhecidas em tempo hábil de resolução. Esta situação de uso, integrada ao atual contexto crônico de privação já foi percebida e relatada na literatura (ANDERSEN *et al.*, 2000; 2002; 2005; 2010), mas ainda não foi avaliado, de forma abrangente, o real potencial toxicológico desta associação ao organismo como um todo (seja aguda ou crônica), e se o corpo é capaz de se recuperar destes danos com o

tempo. Muitos outros sistemas podem conter danos que podem ser explorados utilizando uma técnica mais abrangente, podendo até levar a novas conclusões e efeitos antes não esperados.

A partir desta necessidade, a metabolômica se tornou uma ferramenta muito cobiçada na era pós genômica, particularmente pela toxicologia, por sua capacidade técnica de estudar a resposta biológica e o metabolismo de organismos de forma exploratória e abrangente (VILLAS-BÔAS *et al.*, 2005).

Através da análise de tecidos ou biofluidos, cuja composição é derivada de reações celulares causadas por predisposições genéticas e interação com o ambiente, a metabolômica mostra-se uma ferramenta que propõe evidenciar e classificar pequenos padrões de alterações metabólicas representantes de estados fisiológicos ou adversos. Esta técnica está cada vez mais sendo utilizada nas mais diversas áreas da ciência (TERABE *et al.*, 2001; ROBERTSON *et al.*, 2005, 2011; BARBAS *et al.*, 2008, 2011; NORDSTROM E LEWENSOHN, 2010).

O acúmulo destes fatores potencialmente tóxicos causam alterações profundas dos padrões homeostáticos nas sociedades modernas, assim sendo, a discriminação destes malefícios poderia nos dar uma nova gama de marcadores, que antecedem os sintomas de alguma patologia já estabelecida. Este trabalho é pioneiro em aplicar a técnica metabolômica em um modelo animal, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada à espectrometria de massas como ferramenta analítica, além de métodos quimiométricos e estatísticos apropriados para a melhor evidenciação e caracterização dos potenciais metabólitos marcadores de dano, focando drogas ilegais de abuso associadas à privação de sono.

REVISÃO DE LITERATURA

---

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 METABOLÔMICA

Os metabólitos são produtos finais do metabolismo gerados de todas as reações químicas necessitadas de um ser vivo. Os metabólitos primários estão envolvidos com o crescimento, desenvolvimento e reprodução normal do organismo, enquanto que os secundários não são diretamente envolvidos nestes processos, mas normalmente tem uma importante função ecológica, como pigmentos, defesa, comunicação (inclusive interespecies), mas não são essenciais à vida.

O metabolismo (do grego *metabolismos*, μεταβολισμός, que significa "mudança" ou "troca") é o conjunto de reações químicas, organizadas em vias metabólicas, que são sequências de reações enzimáticas, em que o produto de uma reação é utilizado como reagente na reação seguinte. Este processo dinâmico é influenciado por fatores endógenos e exógenos, e pode ser encontrado em equilíbrio dinâmico (homeostase), desequilibrado, ou em um novo equilíbrio com algum fator estressante (alostase). Na última situação, estes fatores levam a pequenas mudanças potencialmente mapeáveis, podendo revelar uma nova sequele bioquímica, uma nova visão mecanística, ou identificação de um biomarcador de causa e/ou efeito.

A *metabolômica*, portanto, seria a ciência que estuda os perfis metabólicos produzidos por uma célula, tecido, órgão ou organismo, como produto final dos processos celulares em condições homeostáticas ou adversas (NICHOLSON *et al.*, 1999; FIEHN, 2001; LI XIAYAN *et al.*, 2008). A prática sistemática de correlacionar observações analíticas em biofluidos à saúde humana data à época de Hipócrates (KOUBA *et al.*, 2007). O conceito de que indivíduos podem ter um "perfil metabólico", e que este perfil reflete em seus fluidos biológicos, foi introduzido por Roger Williams, no final de 1940. Ele utilizou a cromatografia em papel para sugerir alguns parâmetros metabólicos característicos existentes na urina e saliva e que, mais tardiamente, foram associados a doenças como a esquizofrenia. Porém, o primeiro verdadeiro vestígio moderno da metabolômica data de 40 anos atrás com Linus Pauling e sua ideia de "medicina ortomolecular". (PAULING *et al.*, 1971).

Nos últimos anos, tanto disciplinas teóricas como experimentais têm se deparado com a vinda de uma metodologia baseada em sistemas biológicos (KITANO *et al.*, 2000; IDEKER *et al.*, 2001; NICHOLSON *et al.*, 2004). Mesmo que,

historicamente, o termo “biologia de sistemas” tenha sido aplicado exclusivamente a estratégias de modelos matemáticos em metabolismo de microrganismos, a genômica se apossou deste termo e agora o usa em larga escala. Estudos biológicos de sistemas são tipicamente mudanças de uma visão mais reducionista, tradicional, para uma mais holística, onde estratégias experimentais se focam em explicar interações através de múltiplas entidades moleculares.

Além disso, enquanto a transcriptômica e a proteômica não são ainda capazes de revelar tudo o que realmente acontece no interior da célula, o perfil metabólico pode-nos revelar, através de sua análise, a fisiologia daquela amostra estudada. Um dos desafios da biologia sistêmica e da genômica funcional é justamente integrar as informações das quatro ciências “ômicas” para redefinir, de forma mais completa, o sistema biológico (FIEHN, 2001; NICHOLSON *et al.*, 2004).

A metabolômica é uma técnica bastante revisada (FIEHN, 2001a, 2002; NICHOLSON *et al.*, 2002; LINDON *et al.*, 2003, 2005, 2008; ALISDAIR *et al.*, 2004; CUBBON *et al.*, 2007; EBBELS *et al.*, 2007; VERPOORTE *et al.*, 2008; GARCÍA-PÉREZ *et al.*, 2008; NORDSTROM *et al.*, 2010; BAKER *et al.*, 2011; EVANS *et al.*, 2013) e complementar a estas outras ciências, pois a análise genética identifica predisposições individuais a certas doenças e, assim, o risco em longo prazo. A análise proteômica e/ou metabolômica oferece a oportunidade de detectar as doenças, quando elas já estão instaladas (BOCK *et al.*, 2004). Portanto, medições diretas da expressão de proteínas e metabólitos são essenciais ao estudo dos processos biológicos em condições normais e adversas (ISSAQ *et al.*, 2008).

A metabolômica tem tido um aumento significativo de importância seguindo suas ciências irmãs, chegando perto tanto em número de publicações quanto em qualidade destas (ROBERTSON *et al.*, 2011). Esta explosão de literatura se dá em várias áreas de aplicação desta, seja botânica, ambiental, clínica, toxicológica ou nutricional. Existe hoje uma literatura tão vasta que não seria possível cobrir em apenas um trabalho todos os nichos da pesquisa metabolômica.

Mas, em vez de sinalizar um aparente declínio de interesse dos toxicologistas, este dado simplesmente reflete o fato que a expansão do uso desta tecnologia em outros nichos de atuação que não a toxicologia, supera em muito a expansão das aplicações toxicológicas. Adicionalmente, embora estudos de perfil metabólico em resposta à toxicantes ainda detêm interesse pelos toxicologistas, atualmente

observa-se um interesse maior em focar estudos descritivos na identificação e validação de biomarcadores e sua mecanística.

Estes estudos tendem a ser mais complexos e difíceis a conduzir e interpretar, porém, apesar do reduzido número, suas publicações têm muito mais importância. Dito isto, a importância desta tecnologia é enfatizada pelo fato de que em 2009, a taxa relativa de publicações na toxicologia relacionadas à metabolômica superou as relacionadas à genômica e proteômica em duas ou três vezes (ROBERTSON *et al.*, 2011).

Algumas aplicações nos últimos anos da metabolômica se focaram mais ao detalhamento descritivo de sequelas bioquímicas na administração de xenobióticos, porém este novo interesse na identificação de mecanismos e biomarcadores, tanto em testes pré-clínicos como clínicos, evidencia a metamorfose desta de ciência descritiva para uma atividade de maior valor agregado.

Esta visão de “avaliação multiparamétrica da resposta biológica a estímulos patofisiológicos ou modificações genéticas” foi originado pelo *Imperial College London* e tem sido usada tanto na toxicologia como também na fitoquímica, no diagnóstico de doenças, no desenvolvimento e avaliação de novas drogas ou terapias, estudos clínicos e subclínicos, além de classificação e predição de danos derivados de múltiplos fatores de forma ampla. Esta utilidade preditiva para a toxicologia já foi percebida pelo Consórcio pela Toxicologia Metabolômica (COMET) formado por indústrias farmacêuticas e o *Imperial College London* (UK). Um de seus objetivos é gerar um banco de dados metabonômicos para um sistema modelo de toxicologia preditiva, baseado em biofluido de roedores, com a ajuda da bioinformática. Atualmente com mais de 100 estudos *in vivo* tanto em ratos e em camundongos, já foram testados mais de 150 toxinas modelo (LINDON *et al.*, 2009).

Além da análise aguda da interferência de condições no metaboloma, podemos também tentar avaliar a melhora ou decorrência de tratamentos através do acompanhamento quimiométrico das respostas através do tempo de um agente terapêutico, por exemplo. Podemos, por exemplo, mapear a condição “saudável” e “doente” em uma configuração metabólica (ou de outra “ômica”), e tentar visualizar a progressão de uma condição teste com o uso de um evento terapêutico, com técnicas de reconhecimento de padrão.

Este mapeamento pode ser visualizado como resultado da interação de uma série multivariada de “vetores de influência”, que exercem uma pressão metabólica

no indivíduo. A partir de um controle metodológico podemos inferir como esses vetores influenciam o fluxo metabólico. Uma representação simples desta ideia é retratada na Figura 1, onde um mapa de componentes principais (PC) foi criado para representar a composição urinária de 5000 ratos da raça *Sprang-Dawley* controle.

Figura 1 – *Score plot* de componentes principais e seus vetores de influência (LINDON, 2005).

Nesta figura cada ponto representa um perfil de espectro de ressonância magnética nuclear (*NMR*) da urina de um rato controle e sua posição no gráfico é condicional à composição de cada característica. O deslocamento dos pontos em uma direção espacial, por intermédio da influência de uma determinada condição (neste caso a idade ou o tipo de nutrição), cria um vetor (hipotético e simplista) de influência que representa o sentido em que ele influencia a dispersão. Este vetor indica a provável direção da pressão metabólica e, conseqüentemente, sua influência exercida por estes fatores macroscópicos interagindo segundo este modelo quimiométrico.

A vantagem deste tipo de abordagem não é necessariamente apontar cada parâmetro ou componente em uma célula em particular e sim, a identificação de mudanças importantes de modo holístico para uma doença ou condição em particular. Isto iria permitir que intervenções na forma de viver ou tratamentos com medicamentos possam ser avaliados em termos de largos movimentos metabólicos

de sistemas integrados em hiperespaços “benéficiais” e “adversos”, criando uma nova métrica de eficácia ou toxicidade baseada em probabilidades.

Baseada nisso, a BASF criou um banco de dados metabolômicos (*MetaMap® Tox*), contendo os dados de 500 agentes químicos, agroquímicos e drogas. Este banco de dados foi criado baseado em estudos de 28 dias (adaptados do *OECD 407 guideline*), com retirada de sangue. Com a padronização destes dados, o reconhecimento dos padrões de efeitos será mais rápido e irá acelerar o desenvolvimento e a caracterização de novos compostos com perfis mais toxicologicamente favoráveis, reduzindo assim o número de estudos realizados em animais necessários para este fim. Portanto, esta tecnologia contribui para o bem estar animal, no sentido do refinamento de técnicas (BASF, 2012), segundo a ideologia bioética 3R (*Replace, Refine, Reduce*), reduzindo o número de animais a serem utilizados nos testes metabolômicos. Respeitando a tendência da bioética atual, modelos animais ainda continuarão sendo usados para estes estudos, porém a metabolômica se mostra uma das técnicas promissoras para a redução destes tipos de experimento, com as possíveis correlações dos dados de estudos equivalentes já realizados.

2.1.2 Biomarcadores

Os biomarcadores ou marcadores biológicos são biomoléculas muito procuradas pelos cientistas, particularmente por servirem como provas ou bases de medição de condições adversas à homeostase. A maioria das análises bioquímicas hoje em dia se baseia na ideia dos biomarcadores, pois as alterações metabólicas são observadas em condições experimentais e verdadeiramente correlacionadas às situações de que foram derivadas. Estes biomarcadores são pesquisados e monitorados para, por exemplo, auxiliar na avaliação sobre determinado processo em um organismo, ou se a pessoa está exposta à determinada droga ou produto químico (DASZYKOWSKI *et. al.* 2007). O FDA (*Food and Drug Administration*) americano emitiu uma publicação onde definiu que biomarcador seria “*uma característica que é medida de forma objetiva com o propósito de servir como indicadora de: um processo biológico normal do organismo, um processo patológico associado a uma doença, ou um padrão de resposta a uma dada intervenção terapêutica*”.

Em aplicações clínicas, são fornecidos indícios do estado de um organismo ou são apontados processos biológicos normais, processos patogênicos, ou respostas farmacológicas a uma intervenção terapêutica. No meio científico, há um amplo entendimento de que proteínas e metabólitos podem ser utilizados como biomarcadores em diagnósticos clínicos, no monitoramento terapêutico, no estudo de condições patológicas e doenças (RIFAI, N. *et. al.* 2006).

Convencionalmente, biomarcadores têm sido definidos como espécies moleculares ou atividades enzimáticas que causam alterações fora dos limites homeostáticos normais, em algumas situações patológicas. De acordo com a Academia Americana de Ciências (*U.S. National Academy of Sciences Committee on Biological Markers*), existem três tipos de biomarcadores inter-relacionados e com vários *end-points* biológicos diferentes, em relação à exposição às substâncias:

- Marcador de exposição
- Marcador de resposta
- Marcador de suscetibilidade

A intenção principal da metabolômica é conseguir, em uma única análise, uma medida abrangente do metaboloma, E como ele muda na presença de um estressante, através da observação biológica da relação entre as perturbações e efeitos causados às vias bioquímicas, podendo assim mapeá-las, para identificar um marcador deste efeito (KOUBA *et al.*, 2007).

2.1.3 Etapas do estudo metabolômico

Por ser uma técnica que abrange vários fatores a serem analisados, a metabolômica necessita de uma série de passos, que devem ser atendidos para uma correta aplicação de sua força, com a devida capacidade de resposta requerida pelo estudo. Devido à necessidade de controlar o máximo de variáveis possíveis, devemos estabelecer parâmetros adequados nas etapas de:

- Desenho experimental
- Protocolo experimental
- Técnicas analíticas
- Análise de dados
- Interpretação de dados

2.1.3.1 Desenho experimental

O desenho experimental é um método racional e com alto custo-efetividade para experimentações, que permite a avaliação de certas variáveis, usando o mínimo de recursos. No começo de cada estudo devemos sempre fazer uma análise crítica do desenho experimental, que responderá adequadamente a nossa pergunta. No desenho, devemos definir através da literatura qual é o melhor modelo a ser utilizado no estudo (amostras humanas, animais *inbreed* ou *out-breed*, raças especiais geneticamente modificadas, animais *knock-out*, animais livre de patógenos, tecidos ou biofluidos, etc.), e a quantidade amostral apropriada deste modelo, para o desenvolvimento adequado do estudo e, particularmente, das análises estatísticas. É importante tomar o cuidado de sempre assegurar uma margem de 10% de seu número amostral, para casos de perdas, desistências ou imprevistos.

O tamanho da amostra (n) advém de um cálculo bem definido e pode ser obtido através de programas próprios para análise amostral, como o *G*Power 3.1.5*. Objetivando uma análise multivariada de variância (MANOVA), necessária para o estudo, os seguintes parâmetros são requisitados : erro probabilístico (α) de no máximo 5% (arbitrário pela literatura científica), tamanho do efeito mínimo (η^2) e o poder estatístico ($1-\beta$). Estes parâmetros são estabelecidos através de estudos estatísticos de referência, e servem para assegurar um valor amostral que sirva tanto para os testes quimiométricos, quanto para os tipos de testes estatísticos que venham a ser requeridos, como análise múltipla de variância ou um modelo linear geral (COHEN *et al.*, 1989; MURPHY *et al.*, 2003; MILES *et al.*, 2010).

2.1.3.2 Protocolo experimental

Com o modelo e desenho experimental definido, outro ponto a ser pesquisado é qual será a amostra de análise, e se esta requisitará alguma preparação especial, tendo em vista a técnica analítica de escolha.

Para a devida análise metabolômica devemos assegurar que o mínimo de interferências e modificações sejam feitas, pois poderia incorrer em supressão ou modificação da intensidade real dos analitos, ou mesmo o desaparecimento total de algum deles. Tendo em vista que a análise é exploratória, a modificação anterior pode gerar erros na interpretação dos dados.

Mesmo com um estudo bem projetado, devemos ressaltar que embora o metaboloma se refira ao conjunto completo de metabólitos expressos pelo organismo (como intermediários metabólicos, hormônios e outras moléculas sinalizadoras, além de metabólitos secundários), não é possível se analisar toda a gama de metabólitos por um único método analítico (LINDON *et al.*, 2008).

2.1.3.3 Técnicas analíticas

A análise global dos metabólitos, mesmo que em uma única matriz biológica, é praticamente impossível, pois os inúmeros analitos ali presentes têm propriedades físico-químicas muito diversas e se apresentam em diferentes níveis de abundância, tornando esta análise um desafio para a química analítica. Portanto, a meta principal de gerar todo o metaboloma em uma única análise não é válida, pois para que seja gerado um número eficiente de informações, faz-se necessário o uso de múltiplas plataformas congregadas.

A espectroscopia por ressonância nuclear magnética (NMR), bastante usada na metabolômica (ZUPPI *et al.*, 1998; NICHOLSON *et al.*, 1999; LINDON *et al.*, 2001; POTTS *et al.*, 2001, 2003, 2005, 2008; BRINDLE *et al.*, 2002, 2003; HART *et al.*, 2003; LENZ *et al.*, 2004; ODUNSI *et al.*, 2005; EBBELS *et al.*, 2007; GARCÍA-PÉREZ *et al.*, 2008), é a única técnica metabolômica que não depende da separação prévia dos analitos – fazendo com que a amostra seja recuperada integralmente após a análise. Com este pensamento, todo tipo de metabólito poderia ser medido simultaneamente – fundamentalmente, assim, o NMR seria perto de um detector universal. NMR é muito usado para criar perfis metabólicos, sendo considerado, inclusive pelo COMET, como uma técnica ouro de análise, uma vez que tem caráter não destrutivo, robusto e requer preparações mínimas da amostra. Alguns pontos desfavoráveis que desafiam sua hegemonia é que sua capacidade de detecção é muito limitada (10^{-6} mol) se comparada à espectrometria de massas (10^{-15} mol) (SUMNER *et al.*, 2003) e que os dados espectrais podem ser bastante difíceis de interpretar em misturas complexas.

Recentemente, a espectrometria de massas se tornou uma das ferramentas mais poderosas na era científica chamada “ômica”. O objetivo principal de todas essas áreas de pesquisa é compreender a biologia do sistema como um todo.

A espectrometria de massas pode ser entendida como uma técnica analítica que permite a identificação da composição química de um determinado composto

isolado, ou de diferentes compostos em misturas complexas, através da determinação de suas massas moleculares na forma iônica, (ou seja, com carga elétrica líquida, positiva ou negativa), e está baseada na movimentação de cargas sob ação de um campo elétrico ou magnético. Esta movimentação é determinada pela razão entre a massa de um determinado composto (analito) e sua carga líquida, designada por sua razão massa/carga (m/z ou “*mass to charge ratio*”). Assim, conhecendo o valor de m/z de uma molécula é possível inferir sua composição química elementar, e com isso determinar sua estrutura (BRAMER *et al.*, 1998).

A base da espectrometria de massas é a separação de íons por suas diferenças de m/z , através de diferentes formas de controle de suas trajetórias, realizadas por campos elétricos e magnéticos. A escolha do analisador de massas é crucial na obtenção dos resultados mais compatíveis com a proposta de pesquisa. É desejado que o analisador de massas seja capaz de detectar uma ampla faixa de m/z e também que ofereça uma alta sensibilidade, exatidão e poder de resolução.

Detectores de tempo de voo são bastante requisitados em estudos metabolômicos devido às características de desempenho citadas acima. Eles se baseiam no princípio de que dois íons com mesma carga, mas com massas diferentes, são acelerados sob um campo elétrico de potencial constante, desenvolvendo velocidades que são dependentes de suas massas. Assim, os íons atingirão o detector com “tempos de voo” diferentes. Como refletores são posicionados nos analisadores, aumentando a distância percorrida, isso permite aumentar a precisão do analisador, pois o íon de menor valor de m/z (menor massa neste caso) atingirá o detector primeiro, enquanto que o de maior massa levará mais tempo para chegar ao detector, permitindo uma alta resolução de massa (HERBERT, 2002).

Nesse sentido, os analisadores de massas baseados em tempo de voo, além de apresentarem uma alta sensibilidade para detecção de uma grande variedade de analitos, geram informações que facilitam a determinação da fórmula estrutural das moléculas de interesse (LANDERS *et al.*, 2007); porém, muitas vezes, a separação cromatográfica primária é necessária, para a melhor resolução destes dados.

Algumas técnicas de separação usadas para a metabolômica já são bem exploradas como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (ALPERT *et al.*, 1990; CHEN *et al.*, 2006; CUBBON *et al.*, 2007; TAUTENHAHN *et al.*, 2008; GIKA

et al., 2008; BAKER *et al.*, 2011; CIBOROWSKI *et al.*, 2012, EVANS *et al.*, 2013), a cromatografia gasosa (CG) (PAULING, 1971; VILLAS-BÔAS *et al.*, 2005, 2006; FIEHN, 2008; PASIKANTI *et al.*, 2008a, 2008b; KIND *et al.*, 2009; SMART *et al.*, 2010) e a eletroforese capilar (EC) (MA *et al.*, 2004; BENAVENTE *et al.*, 2006; HUCK *et al.*, 2006; MONTON *et al.*, 2007; TIMISCHL *et al.*, 2008; BARBAS *et al.*, 2008, 2011a, 2011b; RAMAUTAR *et al.*, 2008, 2009, 2010; SANTIAGO *et al.*, 2009; ISSAQ *et al.*, 2009).

Devido à alta eficiência e poder de resolução aliados à menor necessidade de amostra (nanolitros) e uso restrito de solventes orgânicos, a eletroforese capilar (EC) ganhou popularidade dentro do cenário forense, como uma técnica alternativa ou complementar à cromatografia. Esta técnica tem uma maior eficiência de separação teórica que o *CLAE* e é a mais apropriada para analitos carregados e hidrossolúveis, podendo acessar metabólitos polares como aminoácidos, ácidos carboxílicos e carboidratos, além de analitos biotransformados (RAUMATAR *et al.*, 2008). Porém a EC requer que os analitos sejam solúveis e polares, fazendo com que apenas uma parte dos analitos seja eficientemente separada. A EC também sofre de dificuldades técnicas, a falta de robustez e hifenação com o EM podem se tornar problemáticas, apesar de existirem soluções técnicas. As aplicações de EC-EM na área metabolômica têm sido revistas sistematicamente (RAUMATAR *et al.*, 2008; BARBAS *et al.*, 2011; BRITZ-McKIBBIN, 2012).

A cromatografia gasosa, especialmente quando em interface com a espectrometria de massas (CG-EM), demonstra grande potencial para metabolômica, pela alta repetibilidade e resolução, aliada à possibilidade de obtenção de limites de detecção na ordem de ng/mL. No entanto, não é apropriada para substâncias não voláteis, termolábeis e/ou componentes muito polares, requerendo, assim, derivatização química para muitas biomoléculas. Alguns instrumentos mais modernos permitem realizar a cromatografia “2D”, usando uma pequena coluna polar depois da coluna analítica principal, aumentando um pouco a resolução, porém não o suficiente para ser considerada eficaz. Além disso, algumas moléculas grandes e polares não podem ser analisadas por CG.

O *CLAE*, em comparação ao CG, tem menor resolução cromatográfica, mas tem a vantagem de analisar potencialmente uma gama maior de analitos. Porém, muitos compostos são altamente polares e iônicos, fazendo sua separação problemática, o que acontece particularmente com biofluidos. Existe a possibilidade

de utilizar colunas especiais para estas situações particulares que utilizam a *CLAE* em fase normal. Estas características são o que fazem esta técnica ser a mais utilizada na metabolômica atualmente. A técnica de separação mais comum para metabolômica usando EM é a cromatografia líquida de fase reversa (FR), particularmente com a C18, pela sua confiabilidade, robustez, repetibilidade e mecanismos esclarecidos de separação. Porém, para uma área como a metabolômica, onde muitos biofluidos são predominantemente aquosos, a grande quantidade de compostos polares são fracamente retidos nas fases estacionárias de FR. A cromatografia líquida de interação hidrofílica (HILIC), originalmente chamada de “cromatografia de interação hidrofílica” ou “fase normal aquosa”, é designada às separações de compostos carregados ou neutros através de interações com uma fase estacionária hidrofílica. A ZIC-HILIC é uma coluna apropriada para separação de analitos polares, pois detém compostos altamente polares chamados *zwitteriônicos* ligado à sílica desta coluna, que são potentes ligantes à água. Este composto é utilizado por suas camadas ativas conterem tanto ácidos sulfônicos carregados negativamente altamente ácidos, quanto sais quaternários de amônio, carregados positivamente e altamente básicos. Estes estão separados por uma pequena cadeia *alquil*, produzindo interfaces com esta associação, sendo apropriadas para a separação de metabólitos (ver Figura 2).

Figura 2 – Representação esquemática da fase estacionária HILIC contendo sulfoalquenabetaínas *zwitteriônicas* (adaptado do *Practical Guide to HILIC*, 2005).

O uso da HILIC então, como uma alternativa à fase normal (FN), demonstra desempenho similar à cromatografia líquida FR e por usar um eluente com alta concentração de solvente orgânico miscível em água (tipicamente acetonitrila ou um tampão volátil), se torna apropriada para a hifenação com o EM através de um ionizador por elétron-spray (IES; do inglês *electron spray ionization*).

Antes de ser usada para a metabolômica, a HILIC já tinha sido usada com sucesso para a retenção de metabólitos polares em biofluidos (ALPERT *et al.*, 1990). IDBORG *et al.* (2005) utilizaram esta coluna na análise de urina de ratos, para aumentar a abrangência de cobertura metabólica e acessar compostos polares, focando em obter um *fingerprint* (impressão digital) mais representativo deste animal. CUBBON *et al.* (2007) mostraram o uso de HILIC em urina humana, provendo resultados que eram comparáveis aos gerados pela FR. O uso dessa hifenação HILIC-IES-EM gera uma técnica muito poderosa, que permite não somente uma boa separação de compostos polares, mas permite principalmente a identificação das moléculas através de analisadores de massas com alta resolução (WOHLGEMUTH *et al.* 2010).

2.1.3.4 Análise de dados

As técnicas quimiométricas têm contribuído fundamentalmente para os estudos metabolômicos, na medida em que permitem a racionalização de conjuntos amplos de dados, facilitando sua interpretação. A aplicabilidade das análises multivariadas a estudos metabolômicos é indiscutível, dada à quantidade e variedade de trabalhos da área que fazem uso dessa abordagem. Porém, considerando-se a ampla caixa de ferramentas que representam, essas técnicas devem ser adequadamente operadas para o tipo de questão levantada, a fim de que se extraia delas as respostas mais completas. Esta análise é realizada por programas informáticos já desenvolvidos, muito orientados a cada plataforma analítica.

As técnicas de reconhecimento de padrões (TRP) e outras ferramentas de análise estatística multivariada são usadas para extrair o máximo de informação em dados de espectroscopia (LINDON *et al.*, 2001). Dependendo do modelo matemático em construção, as técnicas estatísticas utilizadas na metabolômica podem ser divididas em técnicas não supervisionadas e em técnicas supervisionadas.

Os dados provenientes de um CLAE-EM devem ser pré-tratados antes das análises quimiométricas em si. Este pré-tratamento dos dados pode corrigir aspectos que atrapalham a interpretação biológica dos dados metabolômicos, enfatizando a informação e aprimorando sua interpretação.

Normalmente os dados de CLAE-EM necessitarão passar por etapas de alinhamento e correção do tempo de retenção, normalização e, se necessário, padronização. Alguns programas estão disponíveis e detêm amplo uso na literatura. Como nosso foco será CLAE-EM, iremos nos concentrar no pré-tratamento utilizando o pacote *XCMS* (SMITH *et al.*, 2006; SIUZDAK *et al.*, 2006; SIUZDAK *et al.*, 2008; TAUTENHAHN *et al.*, 2008), utilizando a plataforma livre *R* versão 2.15.1 (*The R Foundation for Statistical Computing*).

Este pacote lê e processa dados de CLAE-EM nos formatos *netcdf*, *mzXML*, *mzData* e *mzML*, fornecendo um método de detecção de picos, alinhamento de tempos de retenção não linear (*LOESS*), agrupamento de *features* (*m/z* selecionado em um dado tempo de retenção), visualização e quantificação relativa das amostras. Ele pode pré-processar, analisar e visualizar dados de centenas de amostras concomitantemente (SMITH *et al.*, 2006; SIUZDAK *et al.*, 2006). O método é muito interessante, pois não há necessidade da utilização de padrões internos, ele apenas identifica as substâncias endógenas e utiliza o método de regressão local para ajustar os tempos de retenção. A habilidade deste método em alinhar os picos depende diretamente de encontrar os mesmos picos em um grupo razoável de amostras. Os devidos parâmetros de uso devem ser bem estudados (PATTI *et al.*, 2012) e estruturados segundo a técnica analítica (Tabela 1).

Tabela 1 – Parâmetros sugeridos para utilização do *XCMS* na metabolômica (adaptado de PATTI *et al.*, 2012).

Instrumento	p.p.m.	Peak width*	bw	Mzwid	Prefilter
HPLC/Q-TOF	30	c(10,60)	5	0.025	c(0,0)
HPLC/Q-TOF (high resolution)	15	c(10,60)	5	0.015	c(0,0)
HPLC/Orbitrap	2.5	c(10,60)	5	0.015	c(3,5000)
Ultraperformance liquid chromatography (UPLC)/Q-TOF	30	c(5,20)	2	0.025	c(0,0)
UPLC/Q-TOF (high resolution)	15	c(5,20)	2	0.015	c(0,0)
UPLC/Orbitrap	2.5	c(5,20)	2	0.015	c(3,5000)

*Este parâmetro refere-se aos valores mínimo e máximo da largura do pico quando se utiliza o “*Centwave*” como método de leitura de dados.

Depois deste pré-processamento com o XCMS, podemos exportar uma tabela de intensidades com os *features* detectados e alinhados para realizar a devida normalização e padronização, se necessários. A normalização muitas vezes é necessária para poder se comparar habilmente estes perfis metabólicos de um ponto biológico, uma vez que as concentrações interamostrais podem ter variações, e.g. na diluição de biofluidos ou na massa de células ou tecidos, afetando a comparação da concentração dos metabólitos como um todo.

Uma vez se veja a necessidade de aprimorar a homogeneidade dos resultados (acessada por testes de normalidade e de homogeneidade), podemos utilizar uma padronização dos dados que podem estabilizar a variância, combater a sensibilidade das técnicas de reconhecimento de padrão a escalas numéricas, melhorando a visualização dos dados e da variação sistemática (VESSELKOV *et al*, 2011).

As técnicas de padronização são equivalentes entre si, apesar de haver preferências de uso. As padronizações mais usadas são:

- o Z-score, que transforma as intensidades em valores relativos ao desvio padrão;
- o logaritmo, recomendado para além de padronizar, diminuir a amplitude dos valores. Esta característica é boa para reconhecimento de padrões
- a escala 0-1, onde os valores são convertidos em uma relação entre seu maior e menor valor.

Uma vez que os dados forem alinhados, normalizados e padronizados, o reconhecimento de padrões e classificação poderá ser feito utilizando uma primeira abordagem com técnicas quimiométricas multivariadas como uma análise de dados não supervisionada, tal como PCA (*Principal Component Analysis*), seguida de métodos supervisionados, como PLS (*Partial Least Square Discriminant Analysis*) e o OPLS-DA (*Orthogonal Partial Least Square Discriminant Analysis*).

A importância desta etapa é bem documentada e as TRP já são vastamente utilizadas na investigação metabolômica para, por exemplo, separar com sucesso os casos e controles na doença cardiovascular (BRINDLE *et al.*, 2002; BARBAS *et al.*, 2012), esclerose múltipla (HART *et al.*, 2003), hipertensão (BRINDLE *et al.*, 2003), para a detecção de erros inatos do metabolismo, para espécies de animais (POTTS, 2001), para estirpes de animais dentro de espécies (LINDON *et al.*, 2003),

para animais tratados com fármacos (NICHOLSON *et al.*, 2002), para avaliar a evolução de uma doença parasitária (BARBAS *et al.*, 2010) e até para classificar humanos de diferentes regiões geográficas (ZUPPI *et al.*, 1998; LENZ *et al.*, 2004).

As *features* (definidas ainda como variáveis) geradas agora devem passar por uma análise quimiométrica de reconhecimento de padrões (*PCA*, *PLS-DA*, *OPLS-DA*) para a seleção das massas mais importantes e correlacionadas com o estudo selecionado. Há vários programas para este fim, porém o *SIMCA*® P+12.0 (*Umetrics*, Suécia) é muito utilizado para estudos metabolômicos, por sua boa interface e seus algoritmos bem fundamentados.

As técnicas não supervisionadas como a análise dos componentes principais (*PCA*) são geralmente aplicadas para explorar a variância estatística global com o objetivo de aglomerar perfis semelhantes e detectar valores atípicos. Este algoritmo não supervisionado (que não requerem conhecimento a priori da classe da amostra), de aglomeração relativamente simples, permite a visualização de dados biológicos baseados nas semelhanças e diferenças inerentes às amostras e é aplicado nos estágios iniciais de uma investigação, a fim de apresentar uma visão geral da informação contida em cada conjunto de dados.

Dentro das várias técnicas supervisionadas, as mais populares na investigação em metabolômica são aquelas baseadas no método de regressão multivariada dos mínimos quadrados parciais (*PLS*) e sua variante ortogonal (*OPLS*) ou de regressão multivariada dos componentes principais (*RCP*). Estas técnicas utilizam o conhecimento obtido durante o desenho do estudo, o que permite separar as observações através de um gráfico de dispersão (*score plot*) em, pelo menos duas classes diferentes e, desta forma, usar outros métodos multivariados mais avançados como a análise discriminante (*DA*), para corroborar seus resultados (TRYGG, 2007).

Diferentes métodos de escalonamento enfatizam diferentes aspectos dos dados e cada método tem seus méritos e fraquezas. O *PCA* dos dados são usados para se obter uma revelação de agrupamentos ou tendências de separação. O *PLS-DA* e o *OPLS-DA* são métodos de classificação supervisionada recomendados para casos de duas classes ou múltiplas classes (TRYGG, 2006).

Além da separação visual dos perfis das amostras através dos gráficos de dispersão, devemos observar outros parâmetros como a validação do modelo

gerado, através de técnicas de reamostragem como *bootstrapping* ou *jackknifing* e validação cruzada. Através do *software SIMCA* podemos obter:

1. o gráfico de Sumário (*Summary plot*), que mostra a *razão de explicação e de predição* (R^2 e Q^2) do modelo analisado;
2. os gráficos de Validação do Modelo (*Validation plot*) com 100 permutações em duas componentes, que demonstra a confiabilidade do modelo;
3. o gráfico da Importância da Variável na Projeção (*VIP plot*), que é derivado da técnica de reamostragem chamada *Jack-Knife*;
4. o Gráfico-S (*S-plot*), que mostra a integração e classificação das variáveis com maior correlação e variância entre os grupos, evidenciando os metabólitos de maior relevância no estudo;
5. e a tabela do CV-ANOVA, que diagnostica o teste da hipótese nula com os resíduos preditivos da validação-cruzada em ambos os modelos comparados (ERIKSSON, *et al.*, 2008).

Depois de selecionadas as variáveis de maior correlação e variância (pelo gráfico-S), naqueles modelos validados, podemos selecionar e exportar essas variáveis mais importantes para uma análise estatística mais profunda, como uma análise múltipla de variância (MANOVA) e sua análise *post-hoc*, caso necessário.

A análise multivariada da variância (MANOVA) dos valores estatisticamente significantes ($p < 0,05$) e intervalos de confiança pode nos fornecer importantes confirmações dessas possíveis alterações metabólicas, isto é, confirmar se há realmente uma forte resposta a um estímulo específico. Uma análise cuidadosa destes valores é essencial para se determinar a importância real do dado. Um programa com fácil interface e com bons relatórios é o *software IBM SPSS®*, mesmo com outros que podem ser escolhidos como o *STATISTICA®*.

2.1.3.5 Interpretação dos dados

Após este estudo, e determinação das variáveis significantes em cada experimento, as massa-cargas de alta correlação e com significância estatística são selecionadas e comparadas às de bancos públicos espectrais de referência (*MassTrix*, *Metlin*, *HMDB*, *LipidMaps*) para identificação putativa. Na sequência,

rotas metabólicas são pesquisadas no banco de dados KEGG, para evidênciação de qual rota é associada aos marcadores previamente identificados.

Esta é provavelmente uma das partes mais problemáticas, pois a identificação depende muito de uma biblioteca que possa servir de comparação dos espectros dos íons precursores e dos fragmentos. Particularmente na CLAE-EM, essa identificação pode ser bem complicada por depender da congruência do protocolo que foi utilizado à biblioteca e as suas análises. Para tal, é muitas vezes necessária a fragmentação de um padrão autêntico, para confirmar a atribuição até então tentativa da m/z selecionada, por comparação do perfil de fragmentação do pico na amostra e do composto padrão.

Por estas características únicas, a metabolômica está tomando uma proporção incrível do interesse científico pela gama de possibilidades de atuação através da análise de vários fatores ao mesmo tempo, voltando à ciência ao seu lado mais abrangente e utilizando menos processos experimentais para analisar vários fatores e, conseqüentemente, refinando a experimentação animal (MCGRATH, 2010; NC3Rs, 2010).

Com esta capacidade abrangente de exploração de dados biológicos uma motivação se cria para explorar assuntos cada vez menos elucidados pela ciência. Uma dessas condições, muito estudada em âmbito comportamental, é bastante estudada, embora ainda há muito a se descobrir sobre o sono e sua privação, de modo abrangente, na área fisiológica ou mesmo patológica.

2.2 O SONO E SUA PRIVAÇÃO

Com o aumento do tempo requerido para completar todas as tarefas diárias, a privação de sono é uma das consequências mais comuns. Está cada vez mais frequente encontrar pessoas que trabalham ou estudam muitas horas em detrimento do sono, e que também o substituam por lazer, para ter mais tempo para se divertir. No século passado, nós reduzimos o tempo médio de sono em 20% e, nos últimos 25 anos adicionamos um mês à média anual de tempo de trabalho (NATIONAL SLEEP FOUNDATION, 1999). Esta privação de sono é considerada um fator de risco, que contribui para várias doenças, reduzindo longevidade e levando a alterações comportamentais, hormonais, e neuroquímicas (ANDERSEN *et al*, 2002).

O sono é uma atividade que ocupa cerca de um terço da vida humana, e apesar de importante, ainda detêm significância secundária para a sociedade. Uma boa noite de sono é fundamental para uma boa saúde mental e emocional, além de ser essencial na manutenção de uma vida saudável e na fisiologia do organismo. Porém, a restrição crônica do sono tem se tornado cada vez mais comum nas sociedades contemporâneas, afetando aproximadamente 45% da população (TUFIK, 2008).

2.2.1 Fisiologia do sono

O sono pode ser descrito como um estado fisiológico caracterizado pela flutuação dinâmica no sistema nervoso central, e hemodinâmica, ventilatória e dos parâmetros metabólicos. Apesar do seu propósito ainda não ser evidentemente consolidado, sabe-se que ele é importante para os processos de reparo corporal, regulação homeostática diversa e para a consolidação da memória (ANDERSEN *et al.*, 2005).

O seu conceito e estudo têm evoluído ao longo dos anos. Nos primórdios da nossa existência, os ritmos de sono/vigília eram intrinsecamente ligados a uma única variável, “a luz solar”; dependendo assim sua adequação, derivada da quantidade de luz que havia durante o dia, criando ciclos de 8 a 12 horas de sono. A invenção da luz elétrica tem permitido a extensão do dia para a noite, criando novos horários de atividade e o trabalho noturno. Com a chegada da revolução industrial e a invenção da lâmpada, toda a estrutura das novas sociedades industrializadas se baseou numa nova fundamentação do ciclo de sono – as necessidades do trabalho.

O próprio tempo teve de ser organizado de forma a responder às exigências da fonte de renda e isso tem gerado problemas na adaptação do ritmo circadiano. Acreditou-se por algum tempo que existiam “centros” neurais responsáveis pela indução de sono. Todavia, este conceito foi abandonado pelas novas demonstrações de que o ciclo vigília-sono na verdade depende da integração de vários sistemas neurais e condições fisiológicas, responsáveis pelas diferentes características das diversas fases do sono (TUFIK *et al.*, 2008).

Em 1935, Loomis, Harvey e Hobart estudaram sistematicamente os padrões do eletro encefalograma (EEG) do sono humano e descreveram as fases do sono do que hoje chamamos de sono NREM (do inglês, *Non Rapid Eye Movement*). Em

1953, Aserinsky e Kleitman observaram infantes dormindo e notaram seus movimentos oculares, determinando assim o sono REM (REM, do inglês *Rapid Eye Movement*), que edificou esta classificação. Nesta fase, eles relataram algumas condições clínicas relacionadas com o sono, como: o movimento rápidos dos olhos e os sonhos, associando-os com a dessincronização do traçado eletroscilográfico (CARSKADON E DEMENT *et al.*, 1994). As características polissonográficas não serão discutidas neste trabalho.

O sono tem quatro fases, e cada uma delas é responsável por uma atividade diferente – seja a liberação de hormônios, seja a consolidação da memória e do aprendizado. É durante o sono sincronizado (composto dos estágios 1, 2 e 3) é onde ocorre a parada dos movimentos de vigília e diminuição do tônus muscular, redução da pressão sanguínea sistêmica, metabolismo e da formação de urina, dentre outras variações. No sono sincronizado mais profundo (estágio 3) há ainda hipotonia muscular estriatal esquelética, metabolismo reduzido no córtex e tálamo, baixa regulação da temperatura corpórea e, várias outras situações fisiológicas adaptativas (TIMO-IARIA *et al.*, 1985).

Enfim, o sono REM ocupa o quarto estágio e também recebe as denominações de sono paradoxal e de sono dessincronizado. Apesar de ser um estágio profundo de sono, o indivíduo nesta fase exibe padrão eletroencefalográfico que se assemelha ao da vigília com olhos abertos, ou mesmo do sono NREM superficial (estágio 1), sendo este um dos seus aparentes paradoxos. Além disto, apesar da atonia muscular que acompanha este estágio, observam-se movimentos corporais fásicos e erráticos, de diversos grupamentos musculares, principalmente na face e nos membros, bem como, emissão de sons e os rápidos movimentos rítmicos dos olhos, e atividade intensa do sistema visual. Ou seja, mesmo em meio à inibição motora, há liberação fásica de atividade muscular de localização multifocal, outro aparente paradoxo (GARDNER *et al.*, 1975; JOUVET *et al.*, 1972; OSWALD *et al.*, 1962; PESSAH e ROFFWARG *et al.*, 1972; TUFIK *et al.*, 2008). Em 1960, os ciclos de vigília e sono do rato Wistar foram minuciosamente estudados e sua utilização no estudo do sono passou a se justificar plenamente, quando se demonstrou que ele apresenta quase todas as fases do sono humano (TIMO-IARIA *et al.*, 1985).

Segundo TRULSON e colaboradores (1984), os ativadores da vigília estão presentes principalmente no tronco encefálico e possuem características

específicas. Os neurônios colinérgicos, por exemplo, utilizam a acetilcolina como principal neurotransmissor indutor da ativação cortical. Já os neurônios monoaminérgicos como a noradrenalina, aumentam a atividade cortical. Os dopaminérgicos possuem um papel importante sobre o alerta comportamental, mas diferente dos noradrenérgicos, possuem um padrão de atividade que não se diferencia ao longo do ciclo vigília-sono (TRULSON *et al.*, 1984). Entretanto, todos estes neurônios apresentam um padrão característico de disparos durante o reforço positivo e também durante o sono paradoxal (MALONEY *et al.*, 2002). Recentemente, por meio de outras abordagens, DZIRASA (2006) corroborou o papel da dopamina, mediado pelo receptor D2, na geração do sono paradoxal.

Fisiologicamente, vários fatores podem modificar a atividade do sistema vascular durante o sono. É comum a pressão arterial e a frequência cardíaca atingirem valores inferiores ao basal durante o estágio 3 e do sono NREM, e níveis significativamente superiores até à vigília na fase REM (TRULSON *et al.*, 1984).

2.2.2 Efeitos da privação do sono

A falta de descanso tende a ser convertida em uma ameaça para a segurança do sistema de vida (SCHWARTZHAUPT, 2008) e, no mesmo sentido, poucos fenômenos fisiológicos têm sofrido modificações tão importantes no contexto social e ambiental. Há várias linhas de pesquisa que estudam o sono e a interação dele com doenças, como epilepsias ou as próprias doenças típicas do sono, bem como as consequências da privação de sono sobre o organismo. Sabe-se que privação de sono provoca diversas alterações cognitivas e comportamentais (Tabela 2), hormonais, e neuroquímicas, assim como redução da longevidade, seja em humanos ou em animais.

A depleção de sono tem uma característica muito significativa que é o acúmulo da necessidade de sono REM. Quanto mais tempo o indivíduo se priva de sono, este débito vai acumulando para, quando finalmente adormecer, a frequência e incidência do sono REM aumentará. Este aumento específico na duração do sono REM, sem que se altere o tempo total de sono é chamado de rebote de sono REM. Ele vem sendo considerado como um dos fenômenos fisiológicos mais importantes deste contexto (SALLANON *et al.*, 1983). A compensação de sono REM, após um período de privação, foi mostrada em seres humanos (DEMENT *et al.*, 1960).

Tabela 2 – Consequências evidenciadas na literatura sobre privação de sono (adaptado de DEMENT *et al.*, 1965; 1967; 1968; OWEN & BLISS, 1970; TUFIK, 1978; 2008; ANDERSEN *et al.*, 2004; 2010; ANTUNES *et al.*, 2006; KAHAN *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2004).

Consequências evidenciadas da privação de sono	
• Diminuição da longevidade. • Alterações do controle glicêmico e seu metabolismo. • Aumento do risco de mortalidade cardiovascular. • Diminuição da regeneração tecidual. • Fadiga e dor muscular. • Diminuição da capacidade imunológica. • Diminuição do limiar de convulsão. • Aumento do estresse oxidativo. • Alteração de neuroreceptores (principalmente monoaminérgicas) • Alteração no eixo Hipotalâmico-pituitário-adrenal. • Aumento do risco de fibromialgia	• Aumento da capacidade aditiva às drogas pela sensibilização dos receptores dopaminérgicos na via nigro-estriatal. • Danos à integridade da pele. • Alterações na atividade dos nervos simpáticos, principalmente no coração e rim e consequente hipertensão crônica. • Alterações hormonais, como diminuição da liberação de hormônio do crescimento (HGH). • Diminuição da capacidade de aprendizado e prejuízo de memória. • Alteração no ciclo estral (animal) • Capacidade antidepressiva.

Parece haver uma relação entre o aumento de cada uma das fases do sono e o tipo e duração da privação do sono. A privação total de sono por 12 a 24 horas resulta no aumento do sono NREM segundo revisão de Tufik e colaboradores (TUFIK, 2008 *apud* TOBLER e BORBÉLY, 1986; FRANKEN *et al.*, 1991; SCHWIERIN *et al.*, 1998). Quando há privação total de sono por 96 horas, ocorre um aumento mais intenso de sono REM, quando comparado com a privação do sono por 24 horas (ZAGER, 2007 *apud* RECHTSCHAFFEN *et al.*, 1999).

Também foi notado comprometimento da aquisição de tarefas, concentrações diminuídas de testosterona e de corticosterona aumentadas, aumentado nível de lipoproteína de baixa densidade e efeitos genotóxicos sobre vários órgãos após

privação de sono dessincronizado em ratos Wistar (ANDERSEN *et al.*, 2004, 2010; KAHAN *et al.*, 2010). A privação do sono dessincronizado resulta em ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e redução das concentrações do hormônio testosterona.

Hoje em dia, um grande número de adolescentes se encontra em uma situação crônica de privação do sono, seja pelo acúmulo de atividades acadêmicas ou pela necessidade de um emprego, especialmente nos grandes centros urbanos (GIBSON, 2006; PEREZ-CHADA, 2007; BERNARDO, 2009). A redução de sono na adolescência está associada tanto a fatores maturacionais (CARSKADON, 2004), como socioambientais (MOORE, 2008). Fatores aditivos a estas condições como os horários escolares, hábitos alimentares inadequados, comportamentos sedentários e baixo nível de atividade física aliados há um tempo enorme na TV e/ou computador geram padrões alterados de ciclo vigília-sono que se tornam incompatíveis com as necessidades ideais de sono e do relógio biológico.

O trabalho também é um importante sincronizador social do ciclo vigília/sono nos adolescentes. Em um estudo de TEIXEIRA *et al.* (2010) foi identificada uma média de duração do sono de 7,1h para jovens trabalhadores ao passo que os não trabalhadores apresentaram uma média de 8,6h ($p < 0,01$) nos dias com aula. Para comparação, veja a média de sono populacional na figura 11. Neste estudo também foi identificado que o trabalho é um importante fator para o aumento da sonolência diurna excessiva entre os adolescentes.

Embora não esteja claro na literatura uma quantidade de sono diária ideal, uma recomendação possível é que os jovens durmam, pelo menos, nove horas por noite (BERNARDO, 2009). E, neste contexto, jovens trabalhadores podem apresentar redução de duas ou mais horas de sono por dia, o que pode levar a uma importante redução da atenção entre outras desordens fisiológicas (TEIXEIRA *et al.*, 2010). No estudo de MACHADO *et al.* (1998), com universitárias, foi observada uma duração média de sono bastante inferior à encontrada neste estudo. A duração média do sono identificada nas adolescentes trabalhadoras foi de 6,7h nos dias com aula, o que era compensado com uma duração superior nos finais de semana, o que também não foi observado no estudo com os estudantes trabalhadores de São Paulo.

Estes jovens que trabalhavam, continuavam dormindo menos nos finais de semana quando comparados aos não trabalhadores. Esta característica pode ser

devida ao fato da continuidade do trabalho pelo fim de semana, pela regularidade no padrão de sono destes jovens, com horários mais rígidos durante toda a semana, ou pela escolha de não se utilizar este maior tempo em dormir e sim em interações sociais e festas.

É por esta necessidade de descontração e diversão depois de uma semana de trabalho, que a utilização de estimulantes do sistema nervoso central se tornam tão requisitados tanto nas noites de festas, como na volta ao trabalho, para dar conta do débito de sono acumulado. Com a venda controlada dos compostos anfetamínicos e a facilidade (junto ao grande apelo dos grupos sociais noturnos) de encontrar cocaína, esta substância acaba se tornando um acompanhante quase rotineiro em festas e baladas noturnas, particularmente em São Paulo.

2.5 O USO DA COCAÍNA

2.5.1 Contextualização

Há mais de 1200 anos as folhas do arbusto do qual a cocaína é extraída (*Erythroxylon coca*) são usadas pelos povos nativos da América do Sul, com objetivo puramente medicinal, por sua ação anorexiantes (supressora da fome), ajudando a suportar o cansaço, e permitindo-lhes trabalhar a altas altitudes. A cocaína foi isolada pela primeira vez em 1860 por *Albert Niemann* que, como muitos químicos da época, experimentou seu composto recém-isolado, descrevendo a “sensação de analgesia da língua” após contato (REINARMAN *et al.*, 1997). Niemann nomeou o alcaloide acoplando o nome do arbusto “coca” (*Quechua*, na forma indígena) com o sufixo “-ina”. Devido ao seu uso como anestésico local, o sufixo “-caina” foi utilizado para definir os nomes de outros anestésicos locais sintéticos (BAHLS *et al.*, 2002).

As propriedades da cocaína foram sendo conhecidas e absorvidas através da história, mas a motivação do uso se perpetua até hoje. Cientistas italianos após visitas à América do Sul levaram amostras da planta para o seu país, onde o químico *Angelo Mariani* desenvolveu, em 1863, o “*Vin Mariani*”, uma infusão alcoólica de folhas de coca (mais poderosa que as infusões de água ou chás usadas antes), que era muito apreciada pelo Papa Leão XIII, que premiou Mariani com uma medalha honorífica (BAHLS *et al.*, 2002).

Em 1884, *Sigmund Freud* fez o primeiro estudo dos efeitos fisiológicos da cocaína e, na mesma época, *Carl Koller* introduziu a cocaína na anestesia local da

córnea, e *Halstead*, amigo do Freud, na odontologia (FRANÇA *et al.*, 2004). Os escritos de Freud sobre alívio da depressão e cura da dependência de morfina pela cocaína tornaram-se bastante famosos, contudo, paradoxalmente, uma das primeiras vítimas da farmacodependência à cocaína com este intuito foi seu amigo Halstead (OGA, 2010).

Em 1886, *John Styth Pemberton* criou um “soft drink” chamado “Coca-Cola”. Inspirada no formidável sucesso do vinho Mariani, era promovida como um “tônico cerebral valioso e cura para todas as aflições nervosas” e que “oferecia as virtudes da coca sem os vícios do álcool” (FRANÇA *et al.*, 2004). Até 1903, uma dose normal continha cerca de 60 mg de cocaína (FRANÇA *et al.*, 2004; BAHLS *et al.*, 2002; COCA-COLA COMPANY, 2012).

O aumento do uso da substância levou, em 1891, aos primeiros relatos sobre intoxicações relacionadas à cocaína, incluindo 13 mortes, o que eventualmente contribuiu para sua proibição pelo *Harrison Act* em 1914, que a catalogou com as mesmas restrições e penalidades imputadas à morfina (FRANÇA, 2004).

O Reino Unido criou em 2008 o “*Government’s drugs strategy*”, que fez uma distinção entre “usuários problemáticos de drogas”, e os “usuários recreacionais” que são definidos como usuários prevalentes, que não apresentam sinais ou sintomas claros do abuso da substância (UNITED KINGDOM HOME AFFAIRS COMMITTEE, 2008). A agência britânica SOCA (*Serious Organised Crime Agency*) descreveu que quase 90% destes usuários são moderados e, apesar dos riscos de *overdose*, dos riscos dos adulterantes e das exposições crônicas de longo prazo serem perigosos, estes usuários controlam o uso da substância e possuem funcionalidade social normal entre seu uso, e a utilizam, pagando por ela com fontes de renda legítimas (SOCA, 2010).

Estima-se que o mercado de cocaína nos EUA ultrapassou US\$ 70 bilhões em 2005, superando as receitas de empresas como a empresa *Starbucks* (HAVOCSCOPE, 2009). O estudo de GOOREMBERG no relatório “*World Drug Report*” da UNODC (2008) demonstra que a produção de cocaína vem se mantendo constante, pelo menos na última década, depois de uma progressiva ascensão nas décadas de 80 e 90, mostrando assim o valor médio de consumo mundial (Figura 3).

Admite-se que este aumento decorra da escassa literatura demonstrando a toxicidade dessa droga na década de 70 e, justamente na década posterior, com o

aumento da oferta, ela ressurgue como a droga de escolha para um suposto uso “recreacional”, que colaborava para a crença de que a droga é segura, sem risco de causar dependência (GAWIN et al., 1994).

Global cocaine manufacture – legal and illegal, 1903-2007

Figura 3 – Quantidade de produção mundial de cocaína em toneladas segundo vários estudos (UNODC, DELTA, 2008).

Esta maior oferta, aliada a uma melhor distribuição dos cartéis sul-americanos, diminuiu o preço da droga e fez com que o uso de cocaína aumentasse e se diversificasse bastante (DIAMOND *et al.*, 1994; LARANJEIRA, 1996). Segundo informe do NIDA (*National Institute of Drug Abuse*), em 1994, o consumo ocasional e o regular de cocaína diminuíram, ao passo que o consumo frequente aumentou (KOPP *et al.*, 1998). No II levantamento domiciliar sobre uso de drogas psicotrópicas no Brasil, datado de 2005, é evidenciado que a cocaína, detém a maior taxa de prevalência de uso mensal diante de todos os outros psicotrópicos, com exceção do álcool e do tabaco (CARLINI *et al.*, 2006).

De acordo com relatório mundial sobre drogas, realizado pelo Escritório das Nações Unidas contra Drogas e Crimes (UNODC), fundamentando-se em 10 anos (1998-2008) de pesquisa, o Brasil possui cerca de 870 mil usuários de cocaína, cujo consumo aumentou de 0,4% para 0,7% na faixa etária de 12 a 65 anos, no período entre 2001 e 2004, o que equivale a um acréscimo de 75%. A prevalência de uso anual na América do Sul está entre 0,9% e 1% da população entre 15 e 64 anos, índice comparável ao uso de cocaína observado na Europa, embora muito menor do que o da América do Norte (dados do UNODC, 2010).

2.3.2 Vias de administração

A cocaína pode ser administrada por aspiração intranasal, pela inalação do fumo da base livre, por injeção intravenosa ou aplicada diretamente nas mucosas e tecidos do corpo, sendo a aspiração intranasal e o fumo as formas de uso mais difundidas atualmente. O ato de fumá-la surgiu na década de 90, através da prática da administração da mistura de base livre da cocaína com bicarbonato de sódio, formando o *crack*.

A aspiração intranasal era a via mais utilizada, consistindo em dispor cristais de cocaína em fileiras com aproximadamente 10 a 30 mg, absorvidos pela mucosa nasal, dos quais 30% são efetivamente absorvidos com concentração máxima plasmática atingida em tempos variáveis de 35 a 120 minutos (NORA, 1990). Com a virada do século, houve uma avanço fortíssimo do *crack* devido possivelmente à sua característica de gerar um rápido efeito devido ao processo de queima (pirólise) (CARLINI *et al.*, 2006).

Tabela 3 – Tempo de ação, pico de efeitos, duração da euforia e tempo de meia-vida de acordo com as rotas de administração (alterado de GOLD *et al.*, 1992).

Rota	Ação	Pico de efeitos (min)	Duração (min)	Meia-Vida (min)
Inalação (pirólise)	7 s	1-5	20	40-60
Intravenoso	15 s	3-5	20-30	40-60
Aspiração	3 min	15	45-90	60-90
Oral	10 min	60	60	60-90

2.3.3 Toxicodinâmica

A cocaína age como um poderoso agente simpatomimético. Ele bloqueia a recaptação neuronal das monoaminas, aumentando sua concentração na fenda sináptica e, assim, alterando as transmissões sinápticas de dopamina (DA) pela inativação do transportador de membrana de dopamina (DAT₁) pré-sináptico (BROTONS *et al.*, 2009 *apud* ZAHNISER, 2004), de norepinefrina (NE) e serotonina (5-HT) nos neurônios pós-sinápticos. A DA é o neurotransmissor principal das vias mesolímbicas e meso-estriadas, responsáveis por produzir prazer. Ela também é o

percussor natural da epinefrina e da NE, neurotransmissores de caráter excitatório do sistema nervoso, características que são procuradas nesta substância.

A liberação de dopamina (particularmente na área do córtex pré-frontal e *núcleo accumbens*) está associada ao sistema de recompensa natural de ações prazerosas, como comer e fazer sexo e está diretamente ligada à teoria neurobiológica da drogadição, relacionada à recompensa mesolímbica (WISOR, 2001).

A cocaína atua ativando mecanismos dopaminérgicos como resultado do aumento da concentração deste na fenda sináptica. O aumento da concentração de dopamina (que pode chegar a 150% dos parâmetros dopaminérgicos normais) ativa os receptores da família D1 e da família D2, causando prazer e euforia. No núcleo accumbens particularmente, este aumento da resposta do D1 e D2 proporciona o estímulo de recompensa à ingestão de cocaína. Esta sinalização se propaga até outras regiões, induzindo mudanças de longa duração em suas vias correlatas e estas alterações, quando promovidas no sistema límbico, reforçam o desejo pela droga (*craving*), potencialmente ajudando na dependência (CHIARA *et al*, 2004).

Em certa concentração, a dopamina, com percussor da noradrenalina, pode também atuar diretamente sobre receptores β_1 -adrenérgicos do coração (efeito ionotrópico positivo) e dos receptores α_1 e α_2 , aumentando a resistência periférica e vasoconstrição renal e no músculo liso, além de poder interagir com receptores muscarínicos (HOFFMAN *et al*, 1993).

As consequências para a psique e para o corpo são progressivas de acordo com o padrão do usuário. Os usuários pesados (*binge*) que utilizam todo dia ou já desenvolveram uma dependência, apresentam estes sinais e sintomas tóxicos mais proeminentes e mais visíveis. Porém, alguns usuários moderados a leves, considerados “*não problemáticos*” como classificado pelo NIDA detêm um uso controlado desta, variando semanalmente a quinzenalmente, não apresentando os sinais e sintomas clássicos de dano. Estes, no entanto, apesar de não perceberem, podem estar acumulando danos subclínicos que, se percebidos em fase inicial, podem ser revertidos ou minimizados por alguma intervenção.

Com esses dados vemos que o uso da cocaína é bem estabelecido mundialmente, particularmente entre indivíduos jovens e de várias classes sociais, com alta probabilidade de estar cronicamente sob privação de sono. Grande parte dos artigos na literatura não se preocupa em realizar buscas tão abrangentes e se

referem apenas a uma única medida no tempo, sem avaliar as interações complexas que podem surgir no organismo. Por exemplo, estudos em ratos demonstram que mesmo com permissão de dormir e de, teoricamente se recuperar da privação de sono precedente, alguns aspectos fisiológicos não retornam ao seu estado basal (ANDERSEN *et al.*, 2003; 2005).

Portanto alterações profundas dos padrões homeostáticos e farmacodinâmicos poderão ser evidenciadas com a metabolômica, nos dando uma visão amplificada das mudanças fisiológicas e metabólicas provenientes desta interação potencialmente fatal.

OBJETIVOS

---

3. OBJETIVOS

- GERAL:
  - Colocar em prática a abordagem metabolômica global para avaliar os metabólitos existentes em urina de ratos, associados ao consumo de cocaína e privação total de sono.

- ESPECÍFICOS:
  - Analisar amostras de urina de ratos por HILIC-MS seguindo protocolos de análise pré-estabelecidos no grupo.
  - Converter os dados metabolômicos obtidos em tabelas de "features", utilizando *softwares* de pré-processamento de dados (XCMS).
  - Selecionar metabólitos candidatos nos diversos protocolos de exposição à cocaína, à privação de sono e a interação das duas condições, por meio de técnicas quimiométricas de reconhecimento de padrão e estatística.
  - Identificar tentativamente os metabólitos candidatos por comparação da massa exata com bibliotecas públicas e, quando possível, por fragmentação em EM e comparação com um composto padrão autêntico.
  - Associar os metabólitos identificados a rotas metabólicas e prover uma explicação biológica quando cabível.

MATERIAL E MÉTODOS

---

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Este protocolo foi baseado na literatura e sua inteira descrição segue a guia ARRIVE de apresentação de experimentos *in vivo* (MCGRATH, 2010; NC3Rs, 2010). Este trabalho segue as Normas Internacionais de Pesquisa envolvendo Animais, respeitando os princípios éticos de experimentação animal, postulados pela SBCAL (Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório) e pela FELASA (Federação Europeia de Associações com Ciência de Animais de Laboratório). Ademais, todos os seus parâmetros foram apreciados e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEP) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), sob o protocolo nº 0012/12 e acatados pelo comitê de ética da Universidade de São Paulo (USP) como demonstrado em documentos anexos (ver ANEXO 1 e 2).

Neste estudo a amostra de análise escolhida foi a urina, por este biofluido ser um real *end-point* metabólico, representativo de todo o sistema e não receber tanta interferência fisiológica direta como o sangue. Esta é uma amostra biológica segura, não invasiva, de fácil conservação, estéril e passível de coleta sistemática durante o curso de um evento toxicológico ou patológico, fornecendo a capacidade única de se averiguar a sua progressão ou gravidade. Estes dados contínuos não só podem mostrar as consequências fisiológicas do evento testado, mas também possibilita o monitoramento da sua reversão. Além destas vantagens, estudos de estabilidade (GIKA *et al.*, 2008) e de reprodutibilidade (GIKA *et al.*, 2007) foram feitos, mostrando que este tipo de biofluido se mantém estável em temperaturas de pelo menos -20° Celsius por pelo menos 6 meses.

Uma vez definida nossa amostra de análise, ratos Wistar machos (para evitar variações hormonais devido ao ciclo estral) foram escolhidos por serem animais modelo para este tipo de estudo, além de produzirem uma quantidade de urina suficiente para as múltiplas análises requeridas, e serem compatíveis com as gaiolas metabólicas necessárias para a coleta estéril da urina, com máxima eficiência.

O número amostral foi calculado através do programa *G*Power 3.1.5* com os parâmetros de erro probabilístico (α) de no máximo 5%, tamanho do efeito mínimo (η^2) de 9% e com um poder estatístico ($1-\beta$) de 80%, cujos critérios são referenciados da literatura (Figura 4).

Foram então, depois do cálculo, solicitados ao Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para a Medicina e Biologia (CEDEME) da UNIFESP, 60 ratos machos da raça Wistar, com 90 dias de idade.

The screenshot shows the G*Power 3.1.5 window with the 'Protocol of power analyses' tab selected. The main text area displays the following information:

```
[15] -- Monday, September 03, 2012 -- 16:08:31
F tests - MANOVA: Global effects
Options: Pillai V, O'Brien-Shieh Algorithm
Analysis: A priori: Compute required sample size
Input: Effect size f²(V) = 0.09
      α err prob = 0.05
      Power (1-β err prob) = 0.80
      Number of groups = 6
      Response variables = 5
Output: Noncentrality parameter λ = 27.0000000
       Critical F = 1.5469301
       Numerator df = 25.0000000
       Denominator df = 270
       Total sample size = 60
```

Below the text area, the 'Test family' is set to 'F tests' and the 'Statistical test' is 'MANOVA: Global effects'. The 'Type of power analysis' is 'A priori: Compute required sample size - given α, power, and effect size'.

The 'Input Parameters' section shows:

- Effect size $f^2(V)$: 0.09
- α err prob: 0.05
- Power ($1-\beta$ err prob): 0.80
- Number of groups: 6
- Response variables: 5

The 'Output Parameters' section shows:

- Noncentrality parameter λ : 27.0000000
- Critical F: 1.5469301
- Numerator df: 25.0000000
- Denominator df: 270
- Total sample size: 60
- Actual power: 0.8500194
- Pillai V: 0.4128440

Buttons at the bottom include 'Options', 'X-Y plot for a range of values', and 'Calculate'.

Figura 4 – Interface do programa *G*POWER3* para cálculo de tamanho amostral.

Estes animais assim que disponíveis para transporte do CEDEME foram deslocados para o biotério do local de estudo, onde permaneceram em gaiolas-moradia ventiladas por 15 dias, antes do começo do estudo para adaptação, assegurando que a ansiedade e estresse fossem devidamente controlados, e não fossem fontes de variação no dia do experimento. Eles também foram apresentados às gaiolas metabólicas anteriormente ao experimento por três dias consecutivos, por pelo menos 1 hora, para familiarização ao novo local de estudo, pelo mesmo fim de controle da ansiedade e estresse.

Os animais foram mantidos sob a temperatura de $22 \pm 1^\circ\text{C}$ e com ciclo de claro-escuro de 12 horas (das 7 às 19h) controlado automaticamente, com ração e água à vontade. Os ratos permaneceram em gaiolas de polipropileno ventiladas (*Techniplast*, Buguggiate, Itália), que garantem proteção através da utilização de filtros HEPA (*Efficiency Particulate Air-High*) e cuja limpeza foi feita diariamente pela troca da forração.

4.2 COLETA DE AMOSTRAS DE URINA

As coletas de urina foram feitas em 10 gaiolas metabólicas (modelo 3700M071, *Techniplast*, Buguggiate, Itália), cujo sistema é ideal para estudos relacionados ao metabolismo, pois proporcionam a separação das fezes e urina através de um sistema projetado especialmente para este fim (Figuras 5 e 6), permitindo facilmente o seu manuseio sem perturbar o animal em experimento (NICHOLSON *et al.*, 2008; BARBAS *et al.*, 2010).

Figuras 5 e 6 – Fotos das gaiolas metabólicas.

4.3 PRIVAÇÃO TOTAL DE SONO (PTS)

Os animais foram submetidos a um episódio de privação total de sono contínuo durante as primeiras 6 ou 12 horas de fotoperíodo claro (período de sono típico para ratos) dentro da gaiola metabólica, conforme o protocolo de seu grupo. A

privação total de sono foi conduzida pelo método do *gentle handling*, que consiste na manipulação gentil do animal com um pincel ou similar, se os animais apresentarem sonolência. Os animais não são incomodados durante a alimentação ou quando bebem água (PAPALE *et al.*, 2010).

4.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS

No local do estudo, os animais foram distribuídos nos 6 grupos experimentais deste estudo compostos de 10 animais cada. Para evitar qualquer viés derivado de manipulação ou condições ambientais, os animais foram randomizados no estudo e foi feito um delineamento fatorial das condições estudadas, sendo um dos fatores a droga utilizada (Salina ou Cocaína) e outro o protocolo experimental de sono (Controle, Privação de sono total ou Rebote pós-privação de sono), como ilustrado na Figura 5. Estes grupos são definidos pelas seguintes características:

- O grupo CONTROLE não teria interferência em seu sono ao longo das 12 horas;
- O grupo PTS foi privado de sono por 12 horas pelo método de *gentle handling*;
- O grupo REBOTE foi privado de sono por 6 horas e depois permitido dormir pelas 6 horas restantes do experimento.
- Em cada um desses grupos, 10 animais eram selecionados para receber SALINA e outros 10 a solução de COCAÍNA.

Em todos os animais foram administradas a salina (solução 0,9% de NaCl) ou a cocaína às 7h e colocados nas gaiolas metabólicas individualmente. A droga foi diluída a uma concentração de 7 mg/mL em solução salina estéril, pois nesta dose já é possível observar efeito comportamental diferenciado do habitual, segundo estudo prévio (ANDERSEN *et al.*, 2004) e, através de injeção intraperitoneal (i.p.), foi aplicada aos animais designados segundo o protocolo do experimento.

Os animais tiveram suas urinas coletadas 6 horas após administração da droga/salina e ao fim de 12 horas. Após o estudo agudo, dois grupos totalizando 20 dos animais foram mantidos por mais um mês no biotério sem interferência, para que se fosse possível a avaliação de alguma mudança de longo prazo do metaboloma, decorrente daquela exposição aguda única. Quatro grupos, totalizando 40 animais, foram designados para permanecerem em um experimento

subcrônico (adaptado do *OECD 407 guideline*), com uma exposição semanal ao protocolo por um mês.

Todos os animais foram eutanasiados ao fim de todo o experimento pelo método da decapitação por um profissional bioterista capacitado, e tiveram adicionalmente o plasma sanguíneo e os órgãos: cérebro (divididos em Pré-frontal, Hipocampo e Córtex), rim e fígado coletados. Todas as amostras coletadas foram divididas em 2 alíquotas e mantidas sob refrigeração -80°C até a análise instrumental. As amostras do subcrônico apesar de terem sido analisadas, não foram tratadas estatisticamente para este estudo. O sangue e órgãos coletados foram congelados e serão processados em um estudo posterior,

Figura 7 – Protocolo experimental.

4.5 PREPARO DAS AMOSTRAS

As amostras de urina foram descongeladas, homogeneizadas por vórtex e centrifugadas por 10 minutos a 10000 rotações por minuto (rpm). Foi coletado 125 µL do sobrenadante e este transferido para um vaio de CLAE, sendo diluído em água deionizada (1:3) antes das análises.

Uma mistura de alíquotas de 5 µL de todas as amostras de urina, obtidas dos animais controle e dos animais experimentais, serviu para a preparação das amostras de controle de qualidade e estabilidade (QC). Estas amostras QC foram analisadas inicialmente cinco vezes (quintuplicata) para assegurar a estabilidade inicial das análises e reanalisadas a cada cinco corridas de amostras reais, para os procedimentos de controle, avaliação do método e estabilidade do equipamento.

4.6 REAGENTES E PADRÕES

Uma amostra padrão sólida de cocaína foi adquirida através do pesquisador e perito criminal do Estado de São Paulo, Dr. José Luiz Costa (ANEXO 3), obtida por purificação e recristalização de amostras apreendidas, com pureza confirmada por GC-FID, GC-MS e CLAE-DAD, além de RMN e DSC, como requisitada por protocolos internacionais. O padrão foi solubilizado estequiometricamente através do uso de ácido clorídrico PA e diluído até a concentração de trabalho (7 mg/mL). Um padrão de creatinina PA também foi obtido pela *Merck* (Darmstadt, Alemanha). Foi utilizado ácido fórmico PA, obtido pela *Fluka* (Buchs, Suíça) com pureza de 95%, acetonitrila e ácido clorídrico PA obtida pela *Merck* (Darmstadt, Alemanha) e água ultrapura deionizada, fornecida por uma unidade Milli-Q RG da *Millipore* (Bedford, MA, EUA).

4.7 INSTRUMENTAÇÃO CLAE-EM

Foi utilizado no estudo um cromatógrafo líquido de alta eficiência (modelo LC-20AD - Shimadzu, Japão) com sistema binário de bombas, e injetor automático (modelo SIL-20A - Shimadzu, Japão), utilizando coluna zwitteriônica *ZIC®-HILIC* (5,5 mm, 200 Å, 2,1 mm x 100 mm) da *SeQuant* (*Merck*, Darmstadt, Alemanha). O espectrômetro de massas foi um *Bruker micrOTOF – QII*, com ionização feita por elétron-spray (ESI).

As condições de análise foram baseadas em protocolos já estabelecidos na literatura (IDBORG *et al.*, 2005; LINDON *et al.*, 2005; NICHOLSON *et al.*, 2007;

BARBAS *et al.*, 2010); a composição da fase móvel foi otimizada por um desenho fatorial (MORAES *et al.*, 2008). Os seguintes parâmetros cromatográficos foram estabelecidos:

- Como fase móvel:
  - FASE A: 90% de acetonitrila : 10% de 5 mM acetato de amônio (pH 6,8).
  - FASE B: 2% de acetonitrila : 98% de 5 mM acetato de amônio (pH 6,8).
- O gradiente começa com 1% da fase A e aumenta linearmente até 99% de fase A, em 30 min. Ao fim de cada corrida, a coluna é deixada em condição isocrática de 1% de fase A por 30 segundos antes de começar a próxima corrida da sequência.
- O volume de injeção foi de 5 µL de amostra, a vazão da fase móvel foi de 100 µL/min, tendo um tempo de análise 30 minutos e uma temperatura de 25°C.

A interface *ESI* foi operada no modo positivo com 4,5 kV no capilar e 0,5 kV no *end plate offset*. A pressão do gás de nebulização foi de 0,4 Bar; o gás secante foi mantido com vazão de 4L/min a 200 °C. O EM foi mantido com um *mass range* de 50 a 1000 *m/z*, com 3 aquisições por segundo no modo centroide e tempo de transferência de 70 µs. A voltagem dos cones (*Funnels* 1 e 2), do hexapolo e da câmara de colisão foram mantidos com 150 Vpp.

4.8 TRATAMENTO DE DADOS

O pacote XCMS foi utilizado para detecção de picos o algoritmo *CentWave* (TAUTENHAHN *et al.*, 2008; PATTI *et al.*, 2012) e *LOESS* para o alinhamento do tempo de retenção dos picos (CLEVELAND *et al.*, 1991; PRINCE *et al.*, 2006;), como indicado por Smith e coautores (SMITH *et al.*, 2006) para análises metabolômica. Os parâmetros de agrupamento e largura de banda foram estabelecidos conforme recomendado por PATTI *et al.* (2012) para HPLC/Q-TOF (ver Tabela 1).

Após os dados extraídos, devemos normalizar os dados de acordo com a diluição urinária, que podemos alcançar pelas seguintes técnicas:

- (i) normalização pela intensidade ou concentração da creatinina

- (ii) pela área total do perfil;
- (iii) pela variação normal padrão (SNV);
- (iv) ou pela mediana dos sinais.

Normalmente a normalização é feita pelo pico da creatinina nas ciências médicas ou biológicas quando se tem certeza que o experimento não promove alteração neste composto (CUBBON *et al*, 2007). Além desse parâmetro, a massa corpórea dos animais no dia da coleta também é utilizada, nivelando a proporção de quantidade de metabólitos dos animais. Porém, após pesquisa na literatura, utilizamos a mediana do sinal como fator normalizador neste trabalho, seguindo protocolo estabelecido e testado anteriormente em estudo similar por VESSELKOV *et al*. (2011).

Depois da normalização das intensidades dos *features* (ou caracteres de massa-carga), escolhemos também padronizá-los pelo seu logaritmo de base 10, sendo depois importados para as análises de reconhecimento de padrões com o software SIMCA® P+12.0 para a classificação pelo PCA, seguida de PLS e OPLS-DA. Foi utilizada a escala de Pareto nestas análises, para uma evidenciação dos resultados (SIMCA, 2012).

Massas (m/z) encontradas com correlação significativa para o modelo em diferentes comparações foram selecionadas para a análise estatística pelo programa IBM SPSS®. As massas que se mostraram estatisticamente significantes tiveram suas massas exatas comparadas a bancos de compostos públicos de referência (HMDB, METLIN, MassTrix, LIPIDMAPS) para identificação putativa.

Após caracterização dos grupos e identificação dos metabólitos importantes, estes tiveram suas rotas metabólicas pesquisadas pelo KEGG, para avaliação de quais delas eram afetadas e seu sentido fisiopatológico.

RESULTADOS

---

5. RESULTADOS

5.1 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Assim que os animais provindos do CEDEME chegaram ao biotério do departamento, estes foram deixados sem interferência por 10 dias para adaptação ao novo ambiente. Depois desta adaptação, os animais foram colocados nas gaiolas metabólicas, com a finalidade também de reconhecimento do novo local de experimento, durante uma hora em três dias consecutivos. Estas ações permitiram que o animal não se sentisse tão ameaçado quando retirado de sua gaiola-moradia, e que o estresse não se torne um interferente nos experimentos.

Depois da adaptação requerida com o local e às gaiolas metabólicas, o protocolo descrito foi utilizado nos animais distribuídos randomicamente pelos grupos. Ao fim, as amostras urinárias foram congeladas e carreadas em embalagem isolante com gelo seco até a USP para as devidas análises cromatográficas.

5.2 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

Com a supervisão da Dra. Lydia Fumiko (laboratório do Prof. Massuo Kato, IQ-USP), as amostras foram analisadas em um único bloco de 405 horas, para diminuir a interferência interamostral. Porém, devido a uma baixa energética nos laboratórios do IQ/USP, as análises tiveram uma parada no meio; assim sendo essas análises foram descartadas e a análise do total de amostras foi reiniciada assim que a força elétrica foi reestabelecida. As amostras do experimento crônico foram analisadas, porém não serão relatadas neste trabalho. As amostras de 6 h de todos os protocolos também não foram analisadas, pois o estudo piloto mostrou que as mudanças metabolômicas são mais evidentes nas amostras de urinárias de 12 h.

5.3 PRÉ-ANÁLISE DOS DADOS

Com o pacote *XCMS*, na plataforma *R*, foi possível fazer processamento dos arquivos cromatográficos depois de uma otimização dos parâmetros de análise do *XCMS*. Esta otimização consumiu um bom tempo de pesquisa para se obter propriedade na escolha destes.

Na Figura 8A podemos ver que os dados detêm um desvio de 20% no alinhamento dos picos. Após o alinhamento com o algoritmo *LOESS* do *XCMS*,

vemos que este desvio fica com apenas 3%, mostrado na Figura 8B, o que é aceitável nesta técnica.

Figura 8A – Gráfico do desvio do tempo de retenção.

Figura 8B – Gráfico do desvio do tempo de retenção após realinhamento pelo XCMS.

Após o alinhamento, estes dados foram normalizados, ainda no ambiente *R*, pela mediana das intensidades dos picos encontrados (etapa de normalização), e depois padronizados pelo logaritmo de base 10 de sua intensidade já normalizada (VESSELKOV *et al*, 2011). Após este processamento, os valores foram importados para o Excel (MICROSOFT OFFICE®), onde os dados relevantes para o processo quimiométrico foram separados para continuação do estudo. Depois deste passo, os dados foram importados para o *software SIMCA P+12.0*, onde se realizou as análises de PCA para exploração dos dados, PLS-DA e OPLS-DA para discriminação das classes e obtenção dos gráficos necessários.

5.4 RESULTADOS DAS ANÁLISES DE DADOS

5.4.1 Resultados dos controles

5.4.1.1 PCA controle das amostras QC

Como o PCA mostra o perfil de dispersão dos dados, ele pode demonstrar através das amostras de controle de qualidade (QC), constituídas de alíquotas homogeneizadas de 5 µL de todas as amostras (*pool*), cuja análise a cada 5 corridas de amostras reais demonstra como está se comportando a aquisição de dados. Destes dados viu-se que o PCA das amostras QC demonstraram uma perturbação com a interrupção da análise devido à perda de força no laboratório, porém que dentro de cada bloco de análise houve pequena variação (Figura 9). Normalmente as primeiras análises podem apresentar variação até a estabilização do regime, comum em técnicas com CLAE.

Figura 9 – PCA dos QC para teste de qualidade e estabilidade das análises.

5.4.1.2 PCA do controle da variabilidade biológica dos animais

Outra análise de controle é a observação do perfil dos animais em estado basal, ou seja, sem interferência experimental. Esta análise nos garante que os animais não são significativamente diferentes entre si, causando um viés biológico. Este animal muito diferente, também chamado de *outlier*, pode ser reconhecido quando ele sai da área T^2 de Hotteling. Esta área que aparece como uma elipse dentro do gráfico de PCA e PLS seria basicamente a região de confiança de valores, desde a origem do plano-modelo (espaço dos valores). Se a observação se apresenta fora desta elipse, ele já é significativamente diferente do resto da amostra.

Nesta parte do estudo vemos que a distribuição dos animais apresenta um valor fora dos parâmetros normais (Figura 10A). Dentro do programa temos a capacidade de rastrear a identificação do animal e, assim poder retirá-lo do estudo. Outro animal que no meio do experimento apresentou-se com disenteria, também foi retirado do estudo, totalizando 58 animais. Após a retirada destes animais, a nova distribuição apresenta nenhum dos animais fora da área T^2 de Hotteling, ou seja, significativamente diferentes (Figura 10B). Outra boa caracterização dos animais foi obtida pela distribuição das frequências e uma prévia estatística dada pelo SIMCA (Figura 10C).

Figura 10A – PCA das amostras urinárias basais de todos os 60 animais.

Figura 10B – PCA das amostras urinárias basais de todos os 58 animais restantes.

Figura 10C – Histograma de frequência e estatísticas prévias dadas pelo *SIMCA*.

5.4.2 Resultados do experimento Salina x Cocaína.

Este experimento exhibe o efeito da cocaína sobre o perfil metabólico dos animais. Inicialmente é necessária uma exploração não supervisionada por PCA para que se possa observar alguma tendência dos perfis. Neste caso vemos que as classes em questão já mostram uma separação típica (Figura 11A), com um $R^2=0,53$ e $Q^2=0,08$ na quarta componente. Quando utilizamos o OPLS com análise discriminante, temos uma ótima separação e classificação (Figura 11B) com valores de $R^2=0,98$ e $Q^2=0,85$.

Para podermos avaliar se este modelo é adequado, utilizamos um gráfico de validação derivado do PLS que faz 100 permutações de valores nas 2 componentes do modelo (ERIKSSON *et al.*, 2008). Neste caso mostra um valor real muito maior que o de suas permutas, validando o modelo (Figura 11C). Para ter uma certeza estatística, o valor do CV-ANOVA deste modelo se mostra fortemente significativo ($F_{(1,4)}= 20,0$; $p= 1,12853e-005$).

Através do Gráfico-S (OPLS-DA) podemos ver a projeção da variância contra a correlação das variáveis (os metabólitos neste caso) de maior importância no modelo (Figura 11D). Neste estudo foram escolhidas as variáveis que detinham uma correlação “forte”, com um valor mínimo do coeficiente de correlação de Pearson de $\rho > 0,7$ (COHEN, 1989).

Por fim, ficamos com 5 variáveis que se enquadram em nossos parâmetros (4 variáveis com correlação positiva e 1 com correlação negativa) cujas validades como candidatos foram corroboradas com o gráfico da importância da variável na projeção (OPLS-DA), por seus intervalos de confiança, que precisam ser pequenos

e nunca podem passar por zero (Figura 11E). Por fim estas massas-carga foram separadas na Tabela 3 para posterior etapa de identificação.

Figura 11A – Gráfico de dispersão (PCA) das amostras urinárias de 12h dos grupos sob Salina ou Cocaína.

Figura 11B – Gráfico de dispersão (OPLS-DA) das amostras urinárias de 12h dos grupos sob Salina ou Cocaína.

Figura 11C – Gráfico de validação (PLS) com 100 permutações de 2 componentes das amostras urinárias de 12h dos grupos sob Salina ou Cocaína.

Figura 11D – Gráfico-S (OPLS-DA) de variância contra correlação das amostras urinárias de 12h dos grupos sob Salina ou Cocaína.

Figura 11E – Gráfico de variáveis importantes na projeção (OPLS-DA) das amostras urinárias de 12h dos grupos sob Salina ou Cocaína.

Tabela 4 – Tabela de massas-carga de alta correlação e variância ($\rho > 0,7$) no modelo de amostras urinárias de 12h dos grupos sob Salina ou Cocaína.

Variável	Massa-carga mediana	Correlação	ρ
M137T579	137.0692	-	>0,8
M168T377	168.1015	+	>0,8
M526T60	526.1920	+	>0,8
M556T62	556.2020	+	>0,8
M248T61	248.0208	-	>0,7

O sinal da correlação representa se o composto em questão aumenta (+) ou diminui (-) no grupo teste em comparação ao controle.

5.4.3 Resultados do experimento Salina x Privação total de sono (PTS).

Este experimento exhibe o efeito da privação total de sono sobre perfil metabólico dos animais. A exploração não supervisionada por PCA inicial mostra uma grande dispersão dos dados, mas mantendo alguma tendência (Figura 12A), gerando um modelo com $R^2=0,46$ e $Q^2=0,24$ com duas componentes. Quando utilizamos o OPLS com análise discriminante, obtivemos uma separação ideal (Figura 12B) com valores de $R^2=0,99$ e $Q^2=0,84$.

O modelo foi validado pelo SIMCA através do gráfico de validação (Figura 12C) e obtivemos um CV-ANOVA significativo ($F_{(1,9)}= 5,1498$; $p= 0,01136$).

Através do Gráfico-S (OPLS-DA) pudemos selecionar 5 variáveis (Figura 12D) com alta correlação cujas validades como candidatos foram atestados pelo gráfico da importância da variável na projeção (OPLS-DA) por seus intervalos de confiança (Figura 12E). Por fim estas massas-carga foram separadas em uma tabela para correlacionar-se com os outros modelos à procura de um padrão (Tabela 5).

Figura 12A – Gráfico de dispersão (PCA) das amostras urinárias de 12h dos grupos Controle e sob Privação de sono.

Figura 12B – Gráfico de dispersão (OPLS-DA) das amostras urinárias de 12h dos grupos Controle e sob Privação de sono.

Figura 12C – Gráfico de validação (PLS) com 100 permutações de 2 componentes das amostras urinárias de 12h dos grupos Controle e sob Privação de sono.

Figura 12D – Gráfico-S (OPLS-DA) de variância contra correlação das amostras urinárias de 12h dos grupos Controle e sob Privação total de sono.

Figura 12E – Gráfico de variáveis importantes na projeção (OPLS-DA) das amostras urinárias de 12h dos grupos Controle e sob Privação total de sono.

Tabela 5 – Tabela de massas-carga de alta correlação ($\rho > 0,7$) com o modelo de amostras urinárias de 12h dos grupos Controle e sob Privação total de sono.

Variável	Massa-carga média	Correlação	ρ
M137T579	137.0692	-	>0,8
M138T66	138.0540	-	>0,8
M159T34	159.0062	+	>0,8
M166T56	166.0907	-	>0,7
M186T59	186.0782	-	>0,7

O sinal da correlação representa se o composto em questão aumenta (+) ou diminui (-) no grupo teste em comparação ao controle.

5.4.4 Resultados do experimento Salina x Cocaína + Privação total de sono (PTS).

Este experimento exibe a influência da interação do efeito da cocaína junto com a privação de sono sobre o perfil metabólico dos animais. A exploração não supervisionada por PCA inicial mostra uma dispersão dos dados, mantendo a tendência de separação com apenas um ponto mais discrepante (Figura 13A), gerando um modelo com $R^2=0,4$ e $Q^2=0,12$ com duas componentes. Quando utilizamos o OPLS com análise discriminante, obtivemos uma separação ideal (Figura 13B) com valores de $R^2=0,99$ e $Q^2=0,9$.

O modelo foi validado pelo SIMCA através do gráfico de validação (Figura 13C) e obtivemos um CV-ANOVA significativa ($F_{(1,8)} = 9,7511$; $p = 0,001263$).

Através do Gráfico-S (OPLS-DA) pudemos selecionar 4 variáveis (Figura 13D) com alta correlação cujas validades como candidatos foram atestados pelo gráfico da importância da variável na projeção (OPLS-DA) por seus intervalos de confiança (Figura 13E). Por fim estas massas-carga foram separadas em uma tabela para correlacionar-se com os outros modelos à procura de um padrão (Tabela 6).

Figura 13A – Gráfico de dispersão (PCA) das amostras urinárias de 12h dos grupos Salina contra o de iteração Cocaína + PTS.

Figura 13B – Gráfico de dispersão (OPLS-DA) das amostras urinárias de 12h dos grupos Salina contra o de interação Cocaína + PTS.

Figura 13C – Gráfico de validação (PLS) com 100 permutações de 2 componentes das amostras urinárias de 12h dos grupos Salina contra o de interação Cocaína + PTS.

##2013.IMPERIAL.Centwave.bw20.XCMS.NORMALIZED.LOG10.ok.M14.(OPLS/O2PLS-DA)
VIP[Last comp.]

Figura 13E – Gráfico de variáveis importantes na projeção (OPLS-DA) das amostras urinárias de 12h dos grupos Salina contra o de iteração Cocaína + PTS.

Tabela 6 – Tabela de massas-carga de alta correlação ($\rho > 0,7$) com o modelo de amostras urinárias de 12h dos grupos Salina contra o de iteração Cocaína + PTS.

Variável	Massa-carga média	Correlação	ρ
M168T377	168.1015	+	>0,9
M138T66	138.0540	-	>0,8
M137T579	137.0692	-	>0,7
M210T68	210.0601	+	>0,7

O sinal da correlação representa se o composto em questão aumenta (+) ou diminui (-) no grupo teste em comparação ao controle.

5.4.5 Resultados do experimento Salina + PTS x Cocaína + PTS.

Este estudo tenta evidenciar as diferenças metabólicas inerentes ao efeito da cocaína estando ambos os grupos em situação de privação de sono total. Esta análise poderá reforçar ou refutar algumas situações dos outros experimentos. A exploração não supervisionada por PCA inicial mostra uma dispersão dos dados na segunda componente, mantendo ainda a tendência de separação (Figura 14A), gerando um modelo com $R^2=0,38$ e $Q^2=0,07$ em duas componentes. Quando utilizamos o OPLS com análise discriminante, obtivemos uma separação ideal (Figura 14B) com valores de $R^2=0,99$ e $Q^2=0,86$.

O modelo foi validado pelo SIMCA através do gráfico de validação (Figura 14C) e obtivemos um CV-ANOVA significativo ($F_{(1,8)} = 7,9498$; $p = 0,001810$).

Através do Gráfico-S (OPLS-DA) pudemos selecionar 4 variáveis (Figura 14D) com alta correlação cujas validades como candidatos foram atestados pelo gráfico da importância da variável na projeção (OPLS-DA) por seus intervalos de confiança (Figura 14E). Por fim estas massas-carga foram separadas em uma tabela para correlacionar-se com os outros modelos à procura de um padrão (Tabela 7).

Figura 14A – Gráfico de dispersão (PCA) das amostras urinárias de 12h do grupo Salina + PTS contra o de Cocaína + PTS.

Figura 14B – Gráfico de dispersão (OPLS-DA) das amostras urinárias de 12h do grupo Salina + PTS contra o de Cocaína + PTS.

Figura 14C – Gráfico de validação (PLS) com 100 permutações de 2 componentes das amostras urinárias de 12h do grupo Salina + PTS contra o de Cocaína + PTS.

Figura 14D – Gráfico-S (OPLS-DA) de variância contra correlação das amostras urinárias de 12h do grupo Salina + PTS contra o de Cocaína + PTS.

Figura 14E – Gráfico de variáveis importantes na projeção (OPLS-DA) das amostras urinárias de 12h do grupo Salina + PTS contra o de Cocaína + PTS.

Tabela 7 – Tabela de massas-carga de alta correlação ($\rho > 0,7$) com o modelo de amostras urinárias de 12h do grupo Salina + PTS contra o de Cocaína + PTS.

Variável	Massa-carga média	Correlação	ρ
M168T377	168.1015	+	>0,9
M249T48	248.9981	-	>0,8
M139T49	139.0038	-	>0,7
M159T34	159.0062	-	>0,7

O sinal da correlação representa se o composto em questão aumenta (+) ou diminui (-) no grupo teste em comparação ao controle.

5.4.6 Resultados do experimento Cocaína x Cocaína + PTS.

Este estudo tenta evidenciar as diferenças metabolômicas inerentes ao efeito da privação de sono total, estando ambos os grupos sob os efeitos da cocaína. Esta análise poderá reforçar ou refutar algumas situações dos outros experimentos. A exploração não supervisionada por PCA inicial mostra uma dispersão dos dados na primeira componente, mantendo ainda a tendência de separação (Figura 15A), gerando um modelo com $R^2=0,25$ e $Q^2=0,13$ em uma componente. Quando utilizamos o OPLS com análise discriminante, obtivemos uma separação ideal (Figura 15B) com valores de $R^2=0,99$ e $Q^2=0,84$.

O modelo foi validado pelo SIMCA através do gráfico de validação (Figura 15C) e obtivemos um CV-ANOVA significativa ($F_{(1,4)} = 6,0318$; $p = 0,004886$).

Através do Gráfico-S (OPLS-DA) pudemos selecionar 7 variáveis (Figura 15D) com alta correlação cujas validades como candidatos foram atestados pelo gráfico da importância da variável na projeção (OPLS-DA) por seus intervalos de confiança (Figura 15E). Por fim estas massas-carga foram separadas em uma tabela para correlacionar-se com os outros modelos à procura de um padrão (Tabela 8).

Figura 15A – Gráfico de dispersão (PCA) das amostras urinárias de 12h do grupo Cocaína contra o de Cocaína + PTS.

Figura 15B – Gráfico de dispersão (OPLS-DA) das amostras urinárias de 12h do grupo Cocaína contra o de Cocaína + PTS.

Figura 15C – Gráfico de validação (PLS) com 100 permutações de 2 componentes das amostras urinárias de 12h do grupo Cocaína contra o de Cocaína + PTS.

##2013.IMPERIAL.Centwave.bw20.XCMS.NORMALIZED.LOG10.ok.M31 (OPLS/O2PLS-DA)

VIP[Last comp.]

4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
-0.5
-1.0

M177281
M168756
M168751
M559782
M229167
M5295160
M210168
M186759
M137157
M121252
M181311
M215138
M215157
M143160
M230158
M175144
M1487355
M159734
M3271371
M3281364
M3501379
M177192
M1527164
M109767
M185157
M2351580
M139749
M126769
M1497372
M249748
M248761
M190751
M1377732
M177739
M302758
M1377529
M1307160
M217760
M161720
M112766
M167761
M146756
M14157
M145726
M24157
M24160
M13777
M195767
M105772
M197748
M143733
M226758
M14779
M138761
M195764
M169769
M194769
M307112
M196773
M25768
M220758
M212790
M275165
M14176
M227169
M137768
M132766
M127756
M168795
M1377907
M130759
M130773
M306768
M124723
M137726
M189778
M142744
M138766
M239759
M181748
M227127

Figura 15E – Gráfico de variáveis importantes na projeção (OPLS-DA) das amostras urinárias de 12h do grupo Cocaína contra o de Cocaína + PTS.

Tabela 8 – Tabela de massas-carga de alta correlação ($\rho > 0,7$) com o modelo de amostras urinárias de 12h do grupo Cocaína contra o de Cocaína + PTS.

Variável	Massa-carga média	Correlação	ρ
M166T56	166.0907	-	>0,8
M210T68	210.0601	+	>0,8
M556T62	556.2020	-	>0,8
M149T355	149.0201	+	>0,7
M177T281	176.8743	-	>0,7
M186T59	186.0782	-	>0,7
M526T60	526.1920	-	>0,7

O sinal da correlação representa se o composto em questão aumenta (+) ou diminui (-) no grupo teste em comparação ao controle.

5.4.7 Resultados do experimento pós-agudo do grupo Salina x Cocaína.

Este estudo tenta evidenciar as diferenças duradouras no metaboloma, remanescentes da exposição à salina ou à cocaína, 1 mês depois do experimento de dosagem aguda. Esta análise poderá mostrar quais metabólitos não voltam ao seu estado normal após apenas um único contato com a droga. A exploração não supervisionada por PCA inicial mostra uma grande dispersão dos dados sem uma aparente tendência de separação (Figura 16A), gerando um modelo com $R^2=0,23$ e um $Q^2= -0,11$, devido à readequação natural dos animais. Quando utilizamos o OPLS com análise discriminante, obtivemos uma separação aceitável (Figura 16B), apesar do fato levantado anteriormente, com valores de $R^2=0,94$ e $Q^2=0,40$.

O modelo foi validado pelo SIMCA através do gráfico de validação (Figura 16C) e obtivemos um CV-ANOVA significativo ($F_{(1,2)}= 6,82868$; $p= 0,007999$).

Através do Gráfico-S (OPLS-DA) pudemos selecionar 4 variáveis (Figura 16D) com alta correlação cujas validades como candidatos foram atestados pelo gráfico da importância da variável na projeção (OPLS-DA) por seus intervalos de confiança (Figura 16E). Por fim estas massas-carga foram separadas em uma tabela para correlacionar-se com os outros modelos à procura de um padrão (Tabela 9).

Figura 16A – Gráfico de dispersão (PCA) das amostras urinárias de 12h após 1 mês da exposição do grupo Salina x Cocaína .

Figura 16B – Gráfico de dispersão (OPLS-DA) das amostras urinárias de 12h após 1 mês da exposição do grupo Salina x Cocaína .

Figura 16C – Gráfico de validação (PLS) com 100 permutações de 2 componentes das amostras urinárias de 12h após 1 mês da exposição do grupo Salina x Cocaína .

Figura 16D – Gráfico-S (OPLS-DA) de variância contra correlação das amostras urinárias de 12h após 1 mês da exposição do grupo Cocaína contra o Controle.

Figura 16E – Gráfico de variáveis importantes na projeção (OPLS-DA) das amostras urinárias de 12h após 1 mês da exposição do grupo Salina x Cocaína .

Tabela 9 – Tabela de massas-carga de alta correlação ($\rho > 0,7$) com o modelo de amostras urinárias de 12h após 1 mês da exposição do grupo Salina x Cocaína.

Variável	Massa-carga média	Correlação	ρ
M168T377	168.101551	+	>0,8
M186T73	186.1090281	+	>0,7
M149T355	149.0201205	-	>0,7
M441T365	441.2943573	-	>0,7

O sinal da correlação representa se o composto em questão aumenta (+) ou diminui (-) no grupo teste em comparação ao controle.

5.4.8 Resultados do experimento pós-agudo do grupo Salina x PTS.

Este estudo tenta evidenciar as diferenças duradouras no metaboloma, remanescentes da exposição ao protocolo de privação de sono total, um mês depois do experimento agudo. Esta análise poderá mostrar quais metabólitos não voltam ao seu estado normal após apenas uma única exposição ao protocolo. A exploração não supervisionada por PCA inicial mostra uma dispersão dos dados na primeira componente, mantendo ainda a tendência de separação (Figura 17A), gerando um modelo com $R^2=0,46$ e $Q^2=0,02$ em três componentes. Quando

utilizamos o OPLS com análise discriminante, obtivemos uma boa separação (Figura 17B) com valores de $R^2=0,99$ e $Q^2=0,86$.

O modelo foi validado pelo SIMCA através do gráfico de validação (Figura 17C) e obtivemos um CV-ANOVA significativo ($F_{(1,7)}= 10,7763$; $p= 0,000243$).

Através do Gráfico-S (OPLS-DA) pudemos selecionar 5 variáveis (Figura 17D) com alta correlação cujas validades como candidatos foram atestados pelo gráfico da importância da variável na projeção (OPLS-DA) por seus intervalos de confiança (Figura 17E). Por fim estas massas-carga foram separadas em uma tabela para correlacionar-se com os outros modelos à procura de um padrão (Tabela 10).

Figura 17A – Gráfico de dispersão (PCA) das amostras urinárias de 12h após 1 mês da exposição do grupo PTS contra o Controle.

Figura 17B – Gráfico de dispersão (OPLS-DA) das amostras urinárias de 12h após 1 mês da exposição do grupo PTS contra o Controle.

Figura 17C – Gráfico de validação (PLS) com 100 permutações de 2 componentes das amostras urinárias de 12h após 1 mês da exposição do grupo PTS contra o Controle.

Tabela 10 – Tabela de massas-carga de alta correlação ($\rho > 0,7$) com o modelo de amostras urinárias de 12h após 1 mês da exposição do grupo PTS contra o Controle.

Variável	Massa-carga média	Correlação	ρ
M137T579	137.0692	-	>0,8
M186T73	186.1090	+	>0,7
M181T48	180.8943	-	>0,7
M229T67	229.1265	-	>0,7
M290T112	290.1363	-	>0,7

O sinal da correlação representa se o composto em questão aumenta (+) ou diminui (-) no grupo teste em comparação ao controle.

5.4.9 Conjunção dos dados interestudo.

Ao tabelar todas as variáveis importantes, podemos evidenciar e transladar as relações de cada massa-carga com cada objeto de estudo. É com essas variáveis selecionadas e tabeladas (Tabela 11) que vamos analisar estatisticamente por MANOVA acerca de suas variâncias e particularidades.

Tabela 11 – Tabela de massas-carga de alta correlação ($\rho > 0,7$) derivados de todos os protocolos.

Variável	Massa-carga mediana	Correlação Cocaína	Correlação Pós-agudo Cocaína	Correlação Privação	Correlação Pós-agudo Privação	Correlação Cocaína+Privação
M137T579	137.0692	(-)	N	(-)	(-)	(-)
M138T66	138.0540	N	N	(-)	N	(-)
M139T49	139.0038	(-)	N	N	N	N
M149T355	149.0201	N	(-)	N	N	(+)
M159T34	159.0062	(-)	N	(+)	N	N
M166T56	166.0907	N	N	(-)	N	(-)
M168T377	168.1015	(+)	(+)	N	N	(+)
M177T281	176.8743	N	N	N	N	(-)
M181T48	180.8943	N	N	N	(-)	N
M186T59	186.0782	N	N	(-)	N	(-)
M186T73	186.1090	N	(+)	N	(+)	N
M210T68	210.0601	N	N	N	N	(+)
M229T67	229.1265	N	N	N	(-)	N
M248T61	248.0208	(-)	N	N	N	N
M249T48	248.9981	(-)	N	N	N	N
M290T112	290.1363	N	N	N	(-)	N
M441T365	441.2943	N	(-)	N	N	N
M526T60	526.1920	(+)	N	N	N	(-)
M556T62	556.2020	(+)	N	N	N	(-)

No caso de haver correlação o sinal representa se o composto aumenta (+) ou diminui (-) no grupo teste em relação ao controle. “N” representa a inexistência de correlação.

Através do programa *IBM SPSS*, obtivemos os resultados para os testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk (testes de normalidade) além do Levene (teste de homogeneidade), que corroboram o uso da padronização por logaritmo, pois há variáveis não normais e algumas não homogêneas (ANEXO 4). Os resultados da MANOVA (ANEXO 5) das variáveis mais importantes derivadas de todos os protocolos de estudo evidenciam a diferença significativa de algumas variáveis dentre os grupos. Uma análise *post-hoc* de *Bonferroni* foi então realizada para se evidenciar em quais grupos realmente se diferenciavam aquelas variáveis (ANEXO 10). Gráficos de barra referentes ao intervalo de confiança foram gerados de cada variável significativa, para uma representação visual comparativa de sua importância por entre os protocolos (ANEXOS 6 a 9).

A partir dos resultados estatísticos, foram selecionados as massas-carga (Tabela 12) com significância direta com as condições de estudo e tabelados para se fazer a busca nos bancos de dados de metabólitos (Metlin, MassTrix, HMDB, Lipidmaps) e após identificação, sua procura no banco de dados de rotas metabólicas (KEGG).

Tabela 12 – Tabela de massas-carga de alta correlação ($P > 0,7$) e com significância direta com as condições de estudo após tratamento estatístico MANOVA e *post-hoc* Bonferroni.

Variável	Massa-carga mediana	Significante para Cocaína (Correlação)	Significante para Pós-agudo Cocaína (Correlação)	Significante para Privação (Correlação)	Significante para Pós-agudo Privação (Correlação)	Significante para Cocaína + Privação (Correlação)
M159T34	159.0062	S (-)	N	N	N	N
M168T377	168.1015	S (+)	S (+)	N	N	N
M248T61	248.0208	S (-)	N	N	N	N
M526T60	526.1920	S (+)	N	N	N	N
M556T62	556.2020	S (+)	N	N	N	N
M137T579	137.0692	N	N	S (-)	N	N
M149T355	149.0201	N	N	S (+)	N	N
M166T56	166.0907	N	N	S (-)	N	N
M177T281	176.8743	N	N	S (-)	N	N
M186T59	186.0782	N	N	S (-)	N	N
M186T73	186.1090	N	N	N	S (-)	N
M210T68	210.0601	N	N	N	N	S (+)
M290T112	290.1363	N	N	N	N	S (+)

O “S” representa a existência de significância estatística e “N” a sua inexistência. No caso de haver correlação o sinal representa se esta é positiva (+) ou negativa (-).

Os resultados das identificações putativas por buscas em bancos de dados que fornecem sugestões de compostos. Estas foram tabeladas (Tabela 13) para

melhor observação. Após esta fase, os compostos foram associados às rotas metabólicas e sua explicação foi corroborada pela literatura no tema.

Tabela 13 – Identificações putativas das massas estudadas por cálculo teórico e por pesquisa em banco de dados.

Feature	Massa-carga mediana (XCMS)	Possível fórmula molecular	Aduto	Massa corrigida (monoisotópica)	Bruker Compass Data Analysis		Identificação putativa pelo HMDB [erro ppm]		Identificação putativa pelo METLIN [erro ppm]		Código de Identificação putativa pelo KEGG
					Score de acerto	Erro (ppm)	Identificação	Erro (ppm)	Identificação	Erro (ppm)	
M159T34	159.0062	C9H3O3	[M+H] ⁺	158.0045	100%	6.1	X	X	X	X	X
		C5H4N4	[M+K] ⁺	120.0436	X	X	X	X	Purine	3.0	KEGG route: map00230 Purine metabolism
		C4H8O4	[M+K] ⁺	120.0423	X	X	X	X	Erythrose; Dihydroxy-isobutyric acid (5 isomers)	4.0	KEGG route: br08001 Metabolite; Compounds with biological roles
M168T377	168.1015	C9H13NO2	[M+H] ⁺	167.0946	100%	2.1	3-Methoxytyramine ; 4-(2-aminoethyl)-2-methoxy- phenol [phenol or hydroxyhetarene]	2.0	3-Methoxytyramine Methyldopamine	2.0	HMDB00022 KEGGC05587 KEGG route: rno04728 Dopaminergic synapse
							4-Methoxytyramine;		4-Methoxytyramine		
							5-(2-aminoethyl)-2- methoxyphenol [phenol or hydroxyhetarene]		o-Methyldopamine (3-methoxytyramine)		KEGG route: rno00350 Tyrosine metabolism
M248T61	248.0208	C4H10NO11	[M+H] ⁺	247.0131	94.6%	6.7	X	X	X	X	X
		C5H12OS3	[M+ACN+Na] ⁺	184.0050	X	X	X	X	Methyl 1- (methylsulfinyl)propyl disulfide	0	X
		C5H4N4O2S	[M+ACN+Na] ⁺	184.0055	X	X	X	X	6-Thiouric acid	1.0	X

Feature	Massa-carga mediana (XCMS)	Possível fórmula molecular	Aduto	Massa corrigida (monoisotópica)	Bruker Compass Data Analysis		Identificação putativa pelo HMDB [erro ppm]		Identificação putativa pelo METLIN [erro ppm]		Código de Identificação putativa pelo KEGG
					Score de acerto	Erro (ppm)	Identificação	Erro (ppm)	Identificação	Erro (ppm)	
M210T68	210.0601	C6H12NO7	[M+H] ⁺	209.0524	100%	0.4	X	X	X	X	X
		C7H8N5O3	[M+H] ⁺	209.0524	75.6%	6.0	X	X	X	X	X
		C6H8O7	[M+NH4] ⁺	192.0270	X	X	X	X	Citric acid; threo-Isocitric acid; Isocitric acid; 2,5-Didehydro-D- gluconate	3.0	C00158
M290T112	290.1363	C7H16N9O4	[M+H] ⁺	289.1286	80.2%	3.8	X	X	X	X	X
		C11H21N3O7	[M+H-H2O] ⁺	307.1380	X	X	X	X	Thr Thr Ser; Thr Ser Thr; Ser Thr Thr	3.0	KEGG route: rno01230 Biosynthesis of amino acids

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

---

6. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Com os resultados vemos que a variável M168T377, identificada como metoxitiramina (também chamada de metil-dopamina) é um metabólito direto da dopamina, associado às rotas metabólicas de sinapse dopaminérgica (rota do *KEGG*: rno04728 e rno00350). Seu aumento significativo é bem conhecido na literatura (DI GIULIO *et al.*, 1978; PONZIO *et al.*, 1981; STERANKA, 1982; MCQUADE *et al.*, 1985) inclusive em experimentos de sensibilização à droga (ver Figuras 18A e 18B). Mas a observação desses efeitos após 12 horas mostram o poder de influência dessa droga no sistema dopaminérgico. As variáveis M556T62 e o M526T60, cuja identificação não foi possível pelos bancos, mostraram-se candidatos relevantes neste modelo. Além de serem significativamente diferentes dentro do modelo de exposição à cocaína, o M526T60 particularmente se manteve significativo mesmo após um mês da realização do experimento. Um melhor estudo destes compostos deve ser promovido em outro projeto mais específico.

Para o modelo de privação de sono a variável M137T579, identificada como 3-amino-2-piperidona em dois bancos, é associada a uma desordem metabólica envolvendo o acúmulo do aminoácido ornitina no sangue, que pode causar convulsões e retardo (VALLE *et al.*, 2001). Normalmente é derivada de um problema na atividade da enzima ornitina-amino-transferase, e sua possível associação com a privação de sono é desconhecida. O composto M186T59, em particular também necessita de maior estudo quanto a sua importância, visto que este também se manteve alterado mesmo após um mês de estudo.

Já a variável M149T355, foi identificada como um possível contaminante derivado de materiais plásticos, ftalato. A possível explicação para este composto dar significativo é que as seringas que foram usadas para administrar as substâncias aos animais eram separadas por grupo e provavelmente provinham de marcas diferentes.

Ao olharmos especificamente para a interação entre cocaína e privação de sono, as variáveis M210T68 e M290T112 se sobressaíram por provável soma de efeitos denotados por estas massas. O M210T68, identificado possivelmente como um isômero do ácido cítrico tem relação com as rotas do ciclo do citrato (Figura 19), relativo ao metabolismo e biossíntese de aminoácidos (*KEGG*, 2012). Outros *features* como o M290T112 e o M560T60 também estão relacionados com a biossíntese de aminoácidos e peptídeos, mas sua caracterização é incerta.

Com essas informações finais podemos ver que a avaliação exploratória de modelos pode fazer emergir novos compostos antes não percebidos que fariam influência ao sistema biológico. Pudemos comprovar alterações metabólicas importantes e até potenciais marcadores (M186T59 para a privação de sono e M526T60 para a exposição à cocaína) que poderiam mostrar

resquícios de dano ou uma adaptação permanente do sistema biológico (alostasia) ao efeito de um único evento de exposição à cocaína ou à privação de sono.

O acompanhamento de um estudo com tempo, possível pelo estudo da urina que é um excelente biofluido para este fim, é de importância ímpar para o entendimento do comportamento do sistema biológico após suas próprias respostas e adaptações à condição de estudo. Este tipo de estudo fornece dados importantes não só para promover novos alvos de diagnóstico ou alvos terapêuticos, mas para evidenciar também as respostas geradas pelo próprio corpo, que passou anos se aprimorando e que hoje o suplementamos sem considerar suas próprias respostas.

Figura 18A – Desenho de rota metabólica derivada do banco de dados *KEGG* evidenciando a metoxitiramina no ciclo da Tirosina.

Figura 18B – Desenho de rota metabólica derivada do banco de dados *KEGG* evidenciando a metoxitiramina nos processos sinápticos.

Figura 19 – Desenho de rota metabólica derivada do banco de dados *KEGG* evidenciando o ácido cítrico no ciclo do citrato.

COLABORAÇÕES

---

7. COLABORAÇÕES

Foram firmadas colaborações para a elaboração deste trabalho com:

A profa. Dra. Mônica Levy Andersen, do Departamento da Psicobiologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) para supervisionar e orientar no modelo experimental animal do projeto.

O prof. Dr. Massuo Jorge Kato do Laboratório de Química de Produtos Naturais (USP) para utilização do CLAE-TOF-EM.

*REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS*

---

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALISDAIR R., FERNIE K., RICHARD N., TRETHEWEY, A.J. **Metabolite profiling: from diagnostics to systems biology.** *Nature Reviews, Mol. Cell Biol.* 2004. Nature, V.5, pg 31-35.
- ANDERSEN, M.L ., PALMA, B.D., RUEDA, A.D., TUFIK, S. **The effects of acute cocaine administration in paradoxical sleep-deprived rats.** *Addict. Biol.* 2000; 5: 417-20.
- ANDERSEN, M.L. TUFIK, S. **Distinct effects of paradoxical sleep Use of drugs among street children in Brazil.** *Addict. Biol.* 7 . 2002. 251–253.
- ANDERSEN, M.L., MARTINS, P.J., D'ALMEIDA, V., SANTOS, R.F., BIGNOTTO, M. and TUFIK, S. **Effects of paradoxical sleep deprivation on blood parameters associated with cardiovascular risk in aged rats.** *Exp. Gerontol.*, 2004., 39: 817–824.
- ANDERSEN, M.L ., MARTINS, VA., TUFIK S. **The effects of Endocrinological and catecholaminergic alterations in sleep-deprivation and recovery in male rats.** *J. Sleep Res.* 2005. 14, 83–90
- ANDERSEN, M.L.; MARTINS, P.J.F.; D'ALMEIDA, V.; BIGNOTTO, M.; TUFIK, S.; **Endocrinological and catecholaminergic alterations during sleep deprivation and recovery in male rats.** *Journal of Sleep Research*, v. 14, p. 83-90, 2005.
- AZEVEDO, R. C. S. **Usuários de cocaína e AIDS: um estudo sobre comportamentos de risco.** Campinas: UNICAMP, 2000. 220p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica.
- BAHLS, F.C.; BAHLS, S-C. **Cocaína: origem, passado e presente.** *Interação em Psicologia*, 6(2), 177-181, 2002.
- BJORNESS, TE., DALE, N., GREENE,R. **Sleep Deprivation Increases Conditioned Place Preference To Cocaine.** *Sleep*, vol 35, 2012.
- BAKER, M. **Metabolomics: from small molecules to big ideas.** *Nat. Meth.* 8, 117–121 (2011).
- BALL SA, CARROLL KM, BABOR TF, ROUNSAVILLE BJ. **Subtypes of cocaine abusers: support for a type A-type B distinction.** *J Consult Clin Psychol.* Feb 1995;63(1):115-24.
- BARBAS, C. **Metabolic fingerprinting with capillary electrophoresis.** *J. Chromatogr. A* 2008, 1204, 130-139.
- BARBAS, C. ; MORAES, E. P. ; VILLASEÑOR, A. **Capillary electrophoresis as a metabolomics tool for non-targetted fingerprinting of biological samples.** *Journal of pharm. And biom. Analysis* 55, p823-831, 2011a.
- BARBAS, C.; MORAES, E. P.; VILLASEÑOR, A.; **Capillary electrophoresis as a metabolomics tool for non-targetted fingerprinting of biological samples.** *Journal pharm. And biom. Analysis* 55, p823-831, 2011b.
- BASF SE. **Experimental Toxicology and Ecology**, Z 470, D-67056 Ludwigshafen, Germany.
- BENAVENTE, F.; VAN DER HEIJDEN, R.; TJADEN, U.R.; VAN DER GREEF, J.; HANKEMEIER, T. ; **Metabolite profiling of human urine by CE-ESI-MS using separation electrolytes at low pH.** *Electrophoresis*, 27, 4570–4584. 2006.

BRADBERRY, C.W. **Book Review: Dynamics of Extracellular Dopamine in the Acute and Chronic.** *Neuroscientist*, 2002 8: 315

BRAUN BL, MURRAY DM, SIDNEY S. **Lifetime cocaine use and cardiovascular characteristics among young adults: the CARDIA study.** *Am J Public Health*. 1997 Apr; vol. 87(4) pp. 629-34.

BRAZ, L.G.; *et al.* **Clonidina como Droga Adjuvante no Tratamento da Síndrome de Abstinência Alcoólica em Unidade de Terapia Intensiva.** Relato de Caso. *Rev Bras. Anesthesiol*. 2003; 53: 6: 802-807.

BRINDLE JT, ANTTI H, HOLMES E, TRANTER G, NICHOLSON JK, BETHELL HW, *et al.* **Rapid and noninvasive diagnosis of the presence and severity of coronary heart disease using ¹H-NMR-based metabolomics.** *Nat Med*. 2002; 8(12):1439-44.

BRINDLE JT, NICHOLSON JK, SCHOFIELD PM, GRAINGER DJ, HOLMES E. **Application of chemometrics to ¹H NMR spectroscopic data to investigate a relationship between human serum metabolic profiles and hypertension.** *Analyst*. 2003; 128(1):32-6

BRITZ-McKIBBIN P. **New advances in amino acid profiling by capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry.** *Methods Mol Biol*. 2012 ; 828 : 83-99.

CARLINI, E. A. [*et al.*], **II Levantamento domiciliar sobre o uso de drogas psicotrópicas no Brasil : estudo envolvendo as 108 maiores cidades do país : 2005 - São Paulo.** CEBRID - Centro Brasileiro de Informação sobre Drogas Psicotrópicas: UNIFESP - Universidade Federal de São Paulo, 2006.

CARRERA, M.R.C; MEIJLER, M.M; JANDA, K.D.. **Cocaine pharmacology and current pharmacotherapies for its abuse.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2004;12:5019-5030.

CARVALHO, V.M.; CHASIN, A.A. da M.; CARVALHO, D.G.; Artigo eletrônico Scielo. **Estudo da estabilidade do éster metilandroecgonina, marcador de uso do crack, benzoilecgonina e cocaína em urina humana.** *Rev. psiquiatr. clín.* vol.35, suppl.1. São Paulo, 2008.

CIBOROWSKI M, TEUL J, MARTIN-VENTURA JL, EGIDO J, BARBAS C. **Metabolomics with LC-QTOF-MS Permits the Prediction of Disease Stage in Aortic Abdominal Aneurysm Based on Plasma Metabolic Fingerprint.** (2012) PLoS ONE 7(2): e31982. doi:10.1371/journal.pone.0031982

COCA-COLA COMPANY. **"The chronicle of Coca-Cola "**. In: <<http://www.coca-cola.co.uk/about-us/history-of-coca-cola-1886-1892.html>>. 2010. Acesso em: Janeiro de 2012.

COHEN, J. **Statistical Power Analysis for the Behavioural Sciences.** 2nd Ed. Hillsdale, NJ: Erlbaum, 1989.

COSTA, J. L. *Et al.* **Simple method for determination of cocaine and main metabolites in urine by CE coupled to MS.** *Electrophoresis* 2009, 30, 2238–2244

CUBBON, S.; BRADBURY, T.; THOMAS-OATES, J. **Hidrofílica interação cromatografia for mass spectrometry metabolomics studies of urine.** *Anal. Chem.*, 2007, 79, 8911-8918.

DACKIS, C.A; O'BRIEN, C. **Cocaine dependence: a disease of brain's reward centers.** *Journal of Substance Abuse Treatment*. 2001;21:111-117.

DATTILO PB, HAILPERN SM, FEARON K, SOHAL D, NORDIN C. **Beta-blockers are associated with reduced risk of myocardial infarction after cocaine use.** *Ann Emerg Med*. Feb 2008;51(2):117-25.

DI CHIARA G, BASSAREO V, FENU S, DE LUCA M, SPINA L, CADONI C, ACQUAS E, (2004). **Dopamine and drug addiction: the nucleus accumbens shell connection.** *Neuropharmacology* **47 Suppl 1**: 227–41.

DI CHIARA, G. IMPERATO A., **Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentration in the mesolimbic system of free moving rats.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85** (1988) 5274–5278.

DI GIULIO AM, GROPPETTI A, CATTABENI F, GALLI CL, MAGGI A, ALGERI S, PONZIO F. **Significance of dopamine metabolites in the evaluation of drugs acting on dopaminergic neurons.** *Eur J Pharmacol.* 1978 Nov 15;52(2):201-7.

DIAMOND R; BARTH JT; STOUT CE; KOZIOL L. **Neuropsychological aspects of substance abuse and addictive disorders.** In: *The Neuropsychology of mental disorders - A practical guide.* Springfield-Illinois: Ed. Publishey; 1994. p. 147-69.

DIETERLE,F., ROSS, A., SCHLOTTERBECK,G., SENN, H. **Probabilistic Quotient Normalization as Robust Method to Account for Dilution of Complex Biological Mixtures. Application in 1H NMR Metabonomics.** *Anal. Chem.* 2006, 78, 4281-4290

DOMIC, Z., **L'Etat Cocaïne.** Paris: PUF; 1992.

EBBELS TM, KEUN HC, BECKONERT OP, BOLLARD ME, LINDON JC, HOLMES E, NICHOLSON JK. **Prediction and classification of drug toxicity using probabilistic modeling of temporal metabolic data: the consortium on metabonomic toxicology screening approach.** *J Proteome Res.* 2007 Nov;6(11):4407-22. Epub 2007 Oct 4.

EDWARDS, J. S., IBARRA, R. U., PALSSON, B. O. **In silico predictions of *Escherichia coli* metabolic capabilities are consistent with experimental data.** *Nature Biotech.* **19**, 125–130 (1999)

EGRED, M. **Cocaine and the heart.** *Postgrad Med J*, 2005; 81:568–571.

EMCDDA. "EMCDDA Retail Cocaine Purity Study". In: <<http://www.emcdda.europa.eu/stats09/ppptab7a>>. 2007. Acesso em: Janeiro de 2011.

EMCDDA. EMCDDA Retail Cocaine Purity Study. In: <<http://www.emcdda.europa.eu/stats09/ppptab7a>>. 2007. Acesso em: Outubro de 2010.

ERIKSSON L, TRYGG J, WOLD S. **CV-ANOVA for significance testing of PLS and OPLS models.** *J. Chemometrics*, 2008; 22: 594-600.

EVANS, J. **Metabolomics for all: A new web-based platform for analysing LC-MS data.** *Ezine-separationsNOW.com.* 2013. Disponível em: <<http://www.separationsnow.com/details/ezone/137a716497f/Metabolomics-for-all-A-new-web-based-platform-for-analysing-LC-MS-data.html?tzcheck=1&tzcheck=1>>.

FERREIRA, P.E.M.; MARTINI, R.K. **Cocaína: lendas, história e abuso.** *Rev Brás Psiquiatr*, 23(2), 96-99, 2001.

FIEHN O. **Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks.** *Comp. Funct. Genomics* 2001;2:155-168.

FIEHN O, KLOSKA S, ALTMANN T. **Integrated studies on plant biology using multiparallel techniques.** *Curr. Opin. Biotechnol.* 2001;12:82-86.

FIEHN O. **Metabolomics—the link between genotypes and phenotypes.** *Plant Mol. Biol.* 2002;48:155-171.

FIEHN O. **Extending the breadth of metabolite profiling by gas chromatography coupled to mass spectrometry.** *Trends Analyt. Chem.* 2008;27:261-269.

FLISER, D., WITTKE, S., MISCHAK, H., **Capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry for clinical diagnostic purposes.** *Electrophoresis*, 26, 2708–2716. 2005.

FRANÇA, G.V. de; **Medicina legal.** *Guanabara Koogan 7ª Edição*, Rio de Janeiro, 2004.

GARCÍA-PÉREZ, I., VALLEJO, M., GARCÍA, A., LEGIDO-QUIGLEY, C., LINDON, J. C. **Handbook of metabonomics and metabolomics.** *Imperial College London*, United Kingdom, 2008.

GAWIN, FH; KHALSA, ME; ELLINWOOD, E. **Stimulants.** In: Textbook of substance abuse treatment. *Ed. American Psychiatric Press Inc.* 1994. p. 111-39.

GIKA HG., THEODORIDIS GA., WILSON ID. **Liquid chromatography and ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry fingerprinting of human urine: sample stability under different handling and storage conditions for metabonomics studies.** *Journal of Chromatography A*, 1189 (2008) 314–322.

GIKA HG., THEODORIDIS GA., WILSON ID. **Within-day reproducibility of an HPLC-MS-Based method for metabonomic analysis: Application to human urine.** *Journal of Proteome Research* 2007, 6, 3291-3303 3291.

GOLD MS. **Cocaine (and crack): clinical aspects.** In: Lowinson JH, et al, eds. *Substance Abuse: A Comprehensive Text.* 2nd ed. Lippincott Williams & Wilkins: Baltimore, Md; 1992.

GOLD, M. **Drugs of Abuse: A Comprehensive Series for Clinicians.** *Plenum Medical Books*, vol. 3. New York, NY, 1993.

GOODMAN, L.; GILMAN, A. **The pharmacological basis of therapeutics,** *Artemed*, 11^a ed, Porto Alegre. 2005.

GOOREMBERG, P. **“Cocaine in chains: The rise and demise of global commodity, 1860-1950”.** In: TOPIK, S.; FRANK, Z. **From Silver to Cocaine.**

HARDMAN, J.G., LIMBRID, L.E. (editores), **Goodman & Gilman – As bases farmacológicas da terapêutica**, 10^a Edição, Rio de Janeiro – RJ, McGraw, 2003.

HARPER, Douglas. **"Cocaine".** *Online Etymology Dictionary.* In: <<http://www.etymonline.com/index.php?term=Cocaine>>. 2008. Acesso em: Outubro de 2010.

HART BA, VOGELS JT, SPIJKSMA G, BROK HP, POLMAN C, VAN DER GREEF J. **¹HNMR spectroscopy combined with pattern recognition analysis reveals characteristic chemical patterns in urines of MS patients and non-human primates with MS-like disease.** *J Neurol Sci.* 2003; 212(1-2):21-30

HATSUKAMI, D. K. **The effect of individual cocaine withdrawal symptoms on outcomes in cocaine users.** *Addictive Behaviors*, 30, 1125-1134, 2005.

- HAVOCScope.COM. **The Cocaine Market**. In: <<http://www.havocscope.com/Drugs/cocaine.htm>>. 2010. Acesso em: Outubro de 2010.
- HERBERT, CG; JOHNSTONE, AW. **Mass spectrometry basics**. 2002, USA.
- HUCK, C.W.; BAKRY, R.; BONN, G.K.; **Progress in capillary electrophoresis of biomarkers and metabolites between 2002 and 2005**. *Electrophoresis*, 27, 111–125. 2006.
- HURLEY MJ, JENNER P (2006). "What has been learnt from study of dopamine receptors in Parkinson's disease?". *Pharmacol Ther*. **111** (3): 715–28.
- HUXLEY, A. **Brave New World**. HarperCollins Publishers. New York, 1998.
- IDEKER, T., GALITSKI, T., HOOD, L. **A new approach to decoding life: systems biology**. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **2**, 343–372 (2001).
- ISSAQ, H.J., BLONDER, J. "Electrophoresis and liquid chromatography/tandem mass spectrometry in disease biomarker discovery", *J. Chromatogr. B* 2009, 877, 1222–1228.
- JAVOID, JI. **Cocaine plasma concentration: relation to physiological and subjective effects in humans**. *Science* 13 (October 1978): Vol. 202 no. 4364 pp. 227-228.
- KIND T, WOHLGEMUTH G, LEE DY, LU Y, PALAZOGLU M, SHAHBAZ S, FIEHN O. **FiehnLib: mass spectral and retention index libraries for metabolomics based on quadrupole and time-of-flight gas chromatography/mass spectrometry**. *Anal. Chem.* 2009;81:10038-10048.
- KITANO, H. **Perspectives on Systems Biology**. *New Generation Comput.* **18**, 199–216 (2000).
- KOPP P. **A economia da droga**. São Paulo: EDUSC; 1998. p. 274.
- KWONG, T.C. **Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Methylecgonidine, a Crack Cocaine Pyrolyzate**. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 307(3), 1179-1187, 2003.
- LARANJEIRA R; NICASTRI S. **Abuso e dependência de álcool e outras drogas**. In: Almeida OP, Dratcu L, Laranjeira R. *Manual de Psiquiatria*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1996. p. 97-102.
- LEITE, M.C.; ANDRADE, A.C.; ET AL. **Cocaína e crack: dos fundamentos ao tratamento**. Editora Artes Médicas Sul. Porto Alegre, 1999.
- LENZ EM, BRIGHT J, WILSON ID, HUGHES A, MORRISSON J, LINDBERG H, et al. **Metabonomics, dietary influences and cultural differences: a ¹H NMR-based study of urine samples obtained from healthy British and Swedish subjects**. *J Pharm Biomed Anal.* 2004; 36(4):841-9
- LINDON JC, HOLMES E, NICHOLSON JK. **Pattern recognition methods and applications in biomedical magnetic resonance**. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*. 2001; 39(1):1-40
- LINDON JC, NICHOLSON JK, HOLMES E, ANTTI H, BOLLARD ME, KEUN H, et al. **Contemporary issues in toxicology the role of metabonomics in toxicology and its evaluation by the COMET project**. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2003; 187(3):137-46
- LINDON, J. C.; ROBERTSON, D. G. **Metabonomics in toxicity assessment**. Imperial College London, United Kingdom, 2005.
- LINDON, J.C. **Handbook of metabonomics and metabolomics**. Imperial College London, United Kingdom, 2008.

LU, L.; GRIMM, J.W.; HOPE, B.T.; SHAHAM, Y. **Incubation of cocaine craving after withdrawal: a review of preclinical data.** *Neuropharmacology*, 47, 214-226, 2004.

MA, Y., LIU, G., DU, M., SATYTON, I., **Recent Developments in the Determination of Urinary Cancer Biomarkers By Capillary Electrophoresis.** *Electrophoresis* 2004, 25, 1473–1484.

MARQUES, F. **Uso de cocaína e crack no Brasil.** In: <<http://ambienteacreato.blogspot.com/2008/09/uso-de-cocaina-e-crack-no-brasil.html>>. Acesso em: 26 de dezembro de 2008.

MCGRATH J, DRUMMOND G, MCLACHLAN E, KILKENNY C, WAINWRIGHT C. **BRITISH. Guidelines for reporting experiments involving animals: the ARRIVE guidelines.** *Journal of Pharmacology*. 2010 Aug; 160(7):1573-1576

MCQUADE PS, RICHARD JW, THAKUR M. **Some factors affecting striatal 3-methoxytyramine concentrations in the mouse and rat.** *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 1985;9(5-6):725-9.

MONTON, M.R.N., SOGA, T. **“Metabolome analysis by capillary electrophoresis-mass spectrometry”**, *J. Chromatogr. A* 2007, 1168, 237-246.

MORAES, E.P. **Avaliação quimiométrica de mapas peptídicos urinários obtidos por CE-MS visado o diagnóstico clínico.** *Tese de Doutorado*. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

MURPHY, K.R. AND MYORS, B. **Statistical Power Analysis: A Simple and General Model for Traditional and Modern Hypothesis Tests.** 2nd Edition. Lawrence Erlbaum Associates, Inc, 2003..

NETO, A.G.C.; **Avaliação das apreensões de Crack no estado de Pernambuco no período de 2002 a 2007.** Monografia da UFPE. Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, 2009.

NICHOLSON JK, CONNELLY J, LINDON JC, HOLMES E. **Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function.** *Nat Rev Drug Discov*. 2002; 1(2):153-61.

NICHOLSON JK, LINDON JC, HOLMES E. **'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data.** *Xenobiotica* 1999;29:1181-1189.

NIDA – National Institute on Drug Abuse. **Cocaine: Abuse and Addiction.** *Research Report*. Number 99-4342, 2004.

NORA, C.; HAWKS, R.L.; **Research Findings on Smoking of Abused Substances.** *NIDA Research Monograph*, p. 30-41, US, 1990.

NORDSTROM, A.; LEWENSOHN, R. **Metabolomics: Moving to the Clinic.** *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, v. 5, n. 1, p. 4-17, Mar 2010. ISSN 1557-1890.

ODUNSI K, WOLLMAN RM, AMBROSONE CB, HUTSON A, MCCANN SE, TAMMELA J, *et al.* **Detection of epithelial ovarian cancer using 1H-NMR-based metabonomics.** *Int J Cancer*. 2005; 113(5):782-8

OGA, S., **Fundamentos de toxicologia**, São Paulo – SP, Atheneu Editora, 2010.

OLIVEIRA, M.F. de; ALVES, J.Q.; ANDRADE, J.F. de; SACZK, A.A.; OKUMURA, L.L.; **Análise do teor de cocaína em amostras apreendidas pela polícia utilizando-se a técnica de cromatografia líquida**

de alta eficiência com detector UV-Vis. *Artigo Eletrônico Scielo. Eclet. Quím.* vol.34, no.3. São Paulo, 2009.

PATTI, G.J., TAUTENHAHN, R., SIUZDAK, G. **Meta-analysis of untargeted metabolomic data from multiple profiling experiments.** *Nature Protocols* 7, (2012) 508–516

PASIKANTI KK, HO PC, CHAN ECY. **Development and validation of a gas chromatography/mass spectrometry metabonomic platform for the global profiling of urinary metabolites.** *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2008a;22:2984-2992.

PASIKANTI KK, HO PC, CHAN ECY. **Gas chromatography/mass spectrometry in metabolic profiling of biological fluids.** *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2008b;871:202-211.

PAULING L, ROBINSON AB, TERANISHI R, CARY P. **Quantitative analysis of urine vapor and breath by gas-liquid partition chromatography.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1971;68:2374-2376.

PONZIO F, ACHILLI G, PEREGO C, ALGERI S. **Differential effects of certain dopaminergic drugs on the striatal concentration of dopamine metabolites, with special reference to 3-methoxyamphetamine.** *Neurosci Lett.* 1981 Nov 18;27(1):61-7.

POTTS BC, DEESE AJ, STEVENS GJ, REILY MD, ROBERTSON DG, THEISS J. **NMR of biofluids and pattern recognition: assessing the impact of NMR parameters on the principal component analysis of urine from rat and mouse.** *J Pharm Biomed Anal.* 2001; 26(3):463-76

PRINCE, J.T., EDWARD, M. **Chromatographic Alignment of ESI-LC-MS Proteomics Data Sets by Ordered Bijective Interpolated Warping.** *Anal. Chem.*, 2006, 78 (17), pp 6140–6152

RAMAUTAR, R.; MAYBORODA, O.A.; DERKS, R.J.E.; NIEUWKOOP, C.V.; DISSEL, J.T.V.; JONG, G.J. de; **Capillary electrophoresis-time of flight mass spectrometry using noncovalently bilayer-coated capillaries for the analysis of amino acids in human urine.** *Electrophoresis*, 29, 2714–2722. 2008.

RAMAUTAR, R., SOMSEN, G.W., de JONG, G.J. **"CE-MS in metabolomics"**, *Electrophoresis* 2009, 30, 276-291.

RAMAUTAR, R.; TORAN, J.S.; SOMSEN, G.W.; JONG, G.J.; **Evaluation of CE methods for global metabolic profiling of urine.** *Electrophoresis*, 31, 2319–2327. 2010.

REINARMAN, C.; LEVINE, H.G.; **"Crack in Context: America's Latest Demon Drug"**. In: *Crack in America: Demon Drugs and Social Justice*. Berkeley, CA.: University of California Press, 1997.

ROBERTSON, D. G., REILY, M. D., AND BAKER, J. D. (2005). **Metabonomics in preclinical drug development.** *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 1, 363–376.

ROBERTSON, D. G., REILY, M. D., AND BAKER, J. D. (2007). **Metabonomics in pharmaceutical discovery and development.** *J. Proteome Res.* 6, 526–539.

ROBERTSON, D. G., REILY, M. D., AND WATKINS, B. P. (2011). **Metabonomics in Toxicology: preclinical and clinical applications.** *Toxicological Sciences* 120(S1), S146–S170.

ROMANO, M.; RIBEIRO, M.; MARQUES, A.C.P.R. **Abuso e Dependência da Cocaína (Projeto Diretrizes).** *Associação Brasileira de Psiquiatria*, 2002.

SAMHSA. **2006 National Survey on Drug Abuse and Health: National Results.** SAMHSA; 2007.

SAMHSA. **Drug Abuse Warning Network, 2005: National Estimates of Drug-Related. Emergency Department Visits.** SAMHSA; 2006. 23.

SANTIAGO, A. ; BARBAS, C. **The autocorrelation matrix probing biochemical relationships after metabolic fingerprinting with CE.** *Electrophoresis* 2009, 30, 1221–1227

SCHEIDWEILER, K.B.; PLESSINGER, M.A.; SHOJAINE, J.; WOOD, R.W.; NEVES SR, RAM PT, IYENGAR R (May 2002). **G protein Pathways.** *Science* 296 (5573):1636–9.

SECRETARIA DA SEGURANÇA PÚBLICA-SP. **Estudos Criminológicos.** *Coordenadoria de Análise e Planejamento. Secretaria da Segurança Pública/SP.* In: <<http://www.ssp.sp.gov.br/>>. 2009. Acesso em: Janeiro de 2011.

SENAD - Secretaria Nacional Antidrogas. **Conversando sobre cocaína e crack - Formas de uso da cocaína.** In: <<http://www.senad.gov.br/publicações/coca/coca>>. Acesso em: 15 de outubro de 2010.

SMART KF, AGGIO RBM, HOUTTE JRV, VILLAS-BÔAS SG. **Analytical platform for metabolome analysis of microbial cells using methyl chloroformate derivatization followed by gas chromatography–mass spectrometry.** *Nature Protocols.* 2010. 5, 1709–1729

SMITH, C.A.; WANT, E.J.; O'MAILLE, G.; ABAGYAN, R.; SIUZDAK, G. **XCMS: Processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification.** *Anal. Chem.* 2006, 78, 779–787.

SOFT/AAFS. **Forensic toxicology laboratory guidelines.** 2003.

STERANKA LR. **Long-term decreases in striatal dopamine, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, and homovanillic acid after a single injection of amphetamine in iprindole-treated rats: time course and time-dependent interactions with amfonelic acid.** *Brain Res.* 1982 Feb 18;234(1):123-36.

SUMNER, L.W., MENDES, P., DIXONA, RA. **Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era.** *Phytochemistry,* 62 (2003) 817–836

SYDNEY MORNING HEARLD. **"Cocaine use doubles in a decade".** In: <<http://www.smh.com.au/lifestyle/wellbeing/cocaine-use-doubles-in-a-decade-20101015-16mli.html>>. 2010. Acesso em: Outubro de 2010.

TECNIPLAST. In: <<http://www.tecniplast.it>>. 2010. Acesso em: Novembro de 2011.

TIMISCHL, B., KATJA D., HANNELORE K., MARIAN T. **Development of a quantitative, validated capillary electrophoresis-time of flight-mass spectrometry method with integrated high-confidence analyte identification for metabolomics.** *Electrophoresis,* 2008. 29, 2203–2214..

TAUTENHAHN, R., BÖTTCHER, C., NEUMANN, S. **Highly sensitive feature detection for high resolution LC/MS.** *BMC Bioinformatics* 2008, 9:504

TOCHETTO, D. *et al.* **Tratado de Perícias Criminalísticas.** ed. Sagra-DC Luzzatto, Porto Alegre, 1995, cap. 8, p. 164-169.

TOPIK, S.; FRANK, Z. **From Silver to Cocaine.** In: Durhan and London, 2007, pp. 321-325, *UNODC and DELTA: World Drug Report*, 2008. Viena, 2008. ,

TRYGG J, HOLMES E, LUNDSTEDT T. **Chemometrics in metabonomics.** *J Proteome Res.* 2007; 6(2):469-79.

TUFIK, S. **Changes of responses to dopaminergic drugs in the rats submitted to REM sleep deprivation.** *Psychopharmacology*, 1981;72:257-60.

TUFIK, S., LINDSEY, C.J., CARLINI, EA. **Does REM sleep-deprivation induce a supersensitivity of dopaminergic receptors in the rat brain?** *Pharmacology* 1978; 16 : 95-108.

TUFIK, S., TRONCONE, LRP., BRAZ, S., SILVA-FILHO, AR., NEUMANN, BG. **Does REM sleep deprivation induce supersensitivity of presynaptic dopamine or postsynaptic acetylcholine receptors in the rat brain?** *Eur J Pharmacol.* 1987; 140:215–9.

TUFIK, S.; ANDERSEN, M.L.; BITTENCOURT, L.R.A.; MELLO, M.T. de.; **Paradoxical sleep deprivation: neurochemical, hormonal and behavioral alterations. Evidence from 30 years of research.** *An. Acad. Bras. Ciênc.* [online]. 2009, vol.81, n.3, pp. 521-538.

UNITED KINGDOM HOME AFFAIRS COMMITTEE; **HOME OFFICE, DRUGS: Protecting families and communities.** The 2008 drug strategy. United Kingdon, p. 50, 2008.

UNODC and DELTA. **World Drug Report.** Vienna, 2008.

UNODC. **RELATÓRIO MUNDIAL SOBRE DROGAS WDR 2010 - Referências ao Brasil e ao Cone Sul.** *Escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crime (UNODC).* Brasil, 2010.

VALLE, D. and SIMELL, O. **The hyperornithinemias.** In: **The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease.** 8th Edition, 2001. *Scriver, Beaudet, et al., eds. McGraw-Hill.* Chapter 83:1857-1895.

VESELKOV, K.A., VINGARA, L.K., MASSON, P., ROBINETTE, S.L., PELCZER, I., LINDON, J.C., NICHOLSON, J.K. **Optimized Preprocessing of Ultra-Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Urinary Metabolic Profiles for Improved Information Recovery.** *Anal. Chem.* 2011, 83, 5864–5872

VERPOORTE R, CHOI Y, MUSTAFA N, KIM H. **Metabolomics: back to basics.** *Phytochemistry Reviews* 2008, 7(3):525-537.

VILLAS-BÔAS, S. G., MAS, S., ÅKESSON, M., SMEDSGAARD, J. AND NIELSEN, J. **Mass spectrometry in metabolome analysis.** *Mass Spectrom.* 2005. Rev., 24: 613–646.

VILLAS-BÔAS SG, NOEL S, LANE GA, ATTWOOD G, COOKSON A. **Extracellular metabolomics: A metabolic footprinting approach to assess fiber degradation in complex media.** *Analytical Biochemistry.* 2006. Volume 349, Issue 2, 15, Pages 297-305.

VOLLHARDT, K.P.C.; SCHORE, N.E.; **Química orgânica: Estrutura e função**, 4ª Edição, Porto Alegre – RS, Bookman, 2004.

WEISS, RD. MIRIM, SM. **Psychopathology in chronic cocaine abusers.** *American Psiq. Ass.* 1998, New York.

WHO/UNICRI (1995). **"WHO Cocaine Project"**. In: <http://www.tni.org/archives/drugscocadocs_sixhorsemen>. 1996. Acesso em: Janeiro de 2011.

WHO/UNICRI (1995); **"WHO Cocaine Project"**. In: <<http://www.tni.org/article/who-cocaine-project>>. 2003. Acesso em: Outubro de 2010.

XIAYAN, L., LEGIDO-QUIGLEY, C. **"Advances in separation science applied to metabonomics"** *Electrophoresis* 2008, 29, 3724-3736.

ZUPPI C, MESSANA I, FORNI F, FERRARI F, ROSSI C, GIARDINA B. **Influence of feeding on metabolite excretion evidenced by urine ^1H NMR spectral profiles: a comparison between subjects living in Rome and subjects living at arctic latitudes.** *Clín. Chim. Acta.* 1998; 278(1):75-9

ANEXOS

---

9. ANEXOS

9.1 Aprovação do Comitê de Ética da UNIFESP

Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

São Paulo, 2 de março de 2012
CEP Nº: 0012/12

Ilmo(a) Sr(a)

Pesquisador(a): LUCAS ANDRE LOBO GOMES

Disciplina/Departamento: Psicobiologia

Pesquisadores associados: Monica Levy Andersen (orientadora); Marina Franco Maggi Tavares;

**Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo**

TÍTULO DO ESTUDO: Investigação metabólica da toxicidade da cocaína em ratos submetidos a privação de sono, utilizando eletroforese capilar acoplada a espectrometria de massas :

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: Estudo experimental, cat B, em ratos Wistar (n=80)

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: Não se aplica

OBJETIVO DO ESTUDO: • Desenvolver o método analítico metabólico para ser aplicado na pesquisa global de metabólitos em ratos associados ao consumo de cocaína e expostos a privação de sono. • Analisar em função do tempo a excreção dos metabólitos específicos da cocaína dentre os grupos. • Classificar os metabólitos encontrados por meio de técnicas quimiométricas de reconhecimento de padrão. • Identificar os metabólitos encontrados por MS/MS, por adição de padrão e por comparação com bibliotecas espectrais. • Fazer a interpretação bioquímica destes dados encontrados.

RESUMO: Neste projeto, as alterações metabólicas causadas pela cocaína e pela privação de sono em diversos ensaios biológicos, serão avaliadas em amostras de urina de ratos privados de sono, utilizando CE-MS como ferramenta analítica. Serão utilizados 80 ratos Wistar machos de 90 dias de idade provenientes do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para a Medicina e Biologia (CEDEME) e do Departamento de Psicobiologia da Universidade Federal de São Paulo designados em 8 grupos experimentais de 10 animais cada para este projeto. Os animais serão submetidos a privação de sono aguda e administrados com 3 doses diferentes de cocaína, havendo coletas de urina durante 24 horas. Grupos experimentais: Para o experimento agudo (em administração única), o grupo 1 receberá a salina (controle branco) e os grupos 2, 3 e 4, receberão uma dose de 0,5 mg/kg de cocaína (dose baixa), 5 mg/kg (dose média) e 10 mg/kg (dose alta), respectivamente. Os outros 4 grupos restantes são referentes ao estudo de PST. A injeção de cocaína ou salina se dará em ratos privados de sono total, cujo grupo 5 receberá a salina (controle negativo) e os grupos 6, 7 e 8 receberão uma dose de 0,5 mg/kg (dose baixa), 5 mg/kg (dose média) e 10 mg/kg (dose alta) de cocaína, respectivamente. Esta dose de cocaína ou salina será dada pela manhã (às 7 horas), através de uma injeção intravenosa de cocaína a 1% m/v em solução salina estéril. Em seguida os ratos serão alocados dentro das gaiolas metabólicas, tendo sua urina coletada nas primeiras 6 horas, ao fim de 12 horas e depois ao fim de 24 horas. Os animais serão eutanasiados ao final dos experimentos pelo método da decapitação. Haverá a coleta do sangue, cérebro e fígado para análise posterior. As amostras recolhidas serão divididas em 2 alíquotas e mantidas sob refrigeração -80°C até a análise instrumental. Espera-se evidenciar a repercussão desta associação de forma holística, alterações tóxicas na homeostase metabólica através da caracterização de biomarcadores. Os resultados analíticos serão analisados por métodos estatísticos apropriados e análise metabólica global será avaliada por métodos quimiométricos de classificação, como PCA e PLS-DA, entre outros. O método de análise da cocaína e seus metabólitos será avaliado pelas suas características de desempenho analítico (linearidade, LOD, LOQ, precisão, exatidão (teste de recuperação), e seletividade). Após caracterização dos grupos e identificação destes dados, será feita um estudo para avaliar a significância das alterações bioquímicas através de softwares que detenham capacidade de discriminação e elucidação desta questão como o KEGG ou o CYTOSCAPE.

FUNDAMENTOS E RACIONAL: O consumo de cocaína vem sendo estudado há décadas devido aos danos que ela causa tanto ao indivíduo quanto à sociedade. Em uma sociedade que lida com pressão diariamente, requerendo cada vez mais tempo para completar suas tarefas, a privação de sono é uma consequência comum. Como um artifício para manter-se apto a trabalhar ou se divertir à noite, algumas pessoas utilizam a cocaína. Esta associação com a privação de sono pode levar a graves repercussões na saúde e bem-estar. A fim de gerar um amplo método de avaliação, a metabólica auxilia a área toxicológica com uma análise global dos metabólitos em biofluidos, a fim de gerar um mapa abrangente de alterações causadas por alguma condição. A literatura recomenda muitos métodos sensíveis de análise, mas nenhum deles contempla uma análise global de metabólitos endógenos, fazendo-se necessário uma integração de plataformas. Devido ao alto poder de resolução e à melhor capacidade de separação, a Eletroforese Capilar (CE) ganhou popularidade dentro do cenário forense. Em particular, seu acoplamento com a espectrometria de massas (MS) permite a análise de praticamente todas as classes de compostos, como recomendado em estudos envolvendo amostras biológicas complexas.

MATERIAL E MÉTODO: Descritos os procedimentos experimentais (com técnicas já padronizadas), que serão realizados em local e equipe especializada

TCLE: Não se aplica

Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

DETALHAMENTO FINANCEIRO: A apresentação do orçamento detalhado permitiu a análise econômica viabilizando assim, a realização do projeto.

CRONOGRAMA DO ESTUDO: 12 MESES

PRIMEIROS RELATÓRIOS PARCIAIS PREVISTOS PARA : 25/2/2013 e 20/2/2014

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo ANALISOU e APROVOU o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

9.2 Recebimento e aprovação do Comitê de Ética da USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Ofício CEUA/FCF/27/2010

Recebemos o certificado de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, referente ao projeto “Investigação metabólica da toxicidade da cocaína em ratos submetidos a privação de sono, utilizando eletroforese capilar acoplada a espectrometria de massas”, de responsabilidade do pesquisador Lucas André Lobo Gomes, sob a orientação da Monica Levy Andersen, e se encontra arquivado nesta secretaria.

São Paulo, 24 de maio de 2012.

Prof. Dr. Marco Antonio Stephano
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/FCF/USP

9.3 Requerimento de requisição de entorpecentes

AQUISIÇÃO DE ENTORPECENTES

SOLICITANTE: LUCAS ANDRÉ LOBO GOMES

FINALIDADE

EXPERIMENTAL: ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA RESTRIÇÃO DE SONO

E DO USO DE COCAÍNA NO METABOLISMO URINÁRIO DE RATOS

Wistar

SUBSTANCIA: COCAÍNA

QUANTIDADE: 672 mg (4 frascos - total: 672 mg)

DATA: 11 de Setembro de 2012

Assinatura do solicitante (aluno/a)

Assinatura do Prof. Orientador/a

9.4 Tabelas de análise de normalidade e homogeneidade das variáveis

Tests of Normality						Test of Homogeneity of Variances				
Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk			Levene Statistic				
Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.	df1	df2	Sig.		
M137T579	.177	176	.000	.740	176	.000	4.444	5	52	.002
M138T66	.234	176	.000	.687	176	.000	2.169	5	52	.072
M139T49	.092	176	.001	.976	176	.004	1.504	5	52	.205
M149T355	.083	176	.005	.953	176	.000	.575	5	52	.719
M159T34	.143	176	.000	.945	176	.000	7.723	5	52	.000
M166T56	.137	176	.000	.928	176	.000	1.265	5	52	.293
M168T377	.271	176	.000	.769	176	.000	1.414	5	52	.235
M168T95	.281	176	.000	.780	176	.000	8.140	5	52	.000
M175T44	.105	176	.000	.950	176	.000	1.077	5	52	.384
M177T281	.170	176	.000	.878	176	.000	2.332	5	52	.055
M181T48	.066	176	.059	.985	176	.056	.825	5	52	.538
M186T59	.127	176	.000	.956	176	.000	1.664	5	52	.160
M186T73	.286	176	.000	.765	176	.000	.262	5	52	.932
M202T336	.117	176	.000	.881	176	.000	1.053	5	52	.397
M210T68	.079	176	.010	.982	176	.023	8.905	5	52	.000
M227T69	.157	176	.000	.860	176	.000	1.637	5	52	.167
M229T67	.179	176	.000	.794	176	.000	1.512	5	52	.202
M229T69	.136	176	.000	.895	176	.000	1.962	5	52	.100
M248T61	.069	176	.042	.985	176	.048	2.188	5	52	.070
M249T48	.074	176	.020	.969	176	.001	2.460	5	52	.045
M290T112	.104	176	.000	.937	176	.000	2.633	5	52	.034
M441T365	.153	176	.000	.727	176	.000	.740	5	52	.597
M526T60	.251	176	.000	.826	176	.000	3.639	5	52	.007
M556T62	.295	176	.000	.752	176	.000	5.477	5	52	.000

a. Lilliefors Significance Correction

9.5 Tabela da ANOVA das variáveis

ANOVA						
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
M137T579	Between Groups	1.779	5	.356	9.478	.000
	Within Groups	1.952	52	.038		
	Total	3.732	57			
M138T66	Between Groups	.413	5	.083	.949	.457
	Within Groups	4.523	52	.087		
	Total	4.936	57			
M139T49	Between Groups	.943	5	.189	4.254	.003
	Within Groups	2.305	52	.044		
	Total	3.247	57			
M149T355	Between Groups	1.721	5	.344	8.273	.000
	Within Groups	2.163	52	.042		
	Total	3.884	57			
M159T34	Between Groups	5.323	5	1.065	8.589	.000
	Within Groups	6.446	52	.124		
	Total	11.769	57			
M166T56	Between Groups	4.284	5	.857	9.588	.000
	Within Groups	4.647	52	.089		
	Total	8.930	57			
M168T377	Between Groups	23.901	5	4.780	210.512	.000
	Within Groups	1.181	52	.023		
	Total	25.082	57			
M168T95	Between Groups	11.643	5	2.329	32.353	.000
	Within Groups	3.743	52	.072		
	Total	15.386	57			
M175T44	Between Groups	.977	5	.195	4.703	.001
	Within Groups	2.161	52	.042		
	Total	3.139	57			
M177T281	Between Groups	12.321	5	2.464	9.547	.000
	Within Groups	13.421	52	.258		
	Total	25.743	57			
M181T48	Between Groups	.611	5	.122	2.245	.063
	Within Groups	2.828	52	.054		
	Total	3.438	57			
M186T59	Between Groups	1.575	5	.315	6.767	.000
	Within Groups	2.421	52	.047		
	Total	3.996	57			

M186T73	Between Groups	.130	5	.026	2.191	.069
	Within Groups	.616	52	.012		
	Total	.746	57			
M202T336	Between Groups	.616	5	.123	2.758	.028
	Within Groups	2.323	52	.045		
	Total	2.939	57			
M210T68	Between Groups	1.730	5	.346	3.882	.005
	Within Groups	4.637	52	.089		
	Total	6.367	57			
M227T69	Between Groups	.253	5	.051	1.080	.382
	Within Groups	2.437	52	.047		
	Total	2.690	57			
M229T67	Between Groups	3.126	5	.625	5.402	.000
	Within Groups	6.017	52	.116		
	Total	9.143	57			
M229T69	Between Groups	2.783	5	.557	1.489	.210
	Within Groups	19.442	52	.374		
	Total	22.225	57			
M248T61	Between Groups	1.171	5	.234	10.812	.000
	Within Groups	1.126	52	.022		
	Total	2.297	57			
M249T48	Between Groups	1.064	5	.213	5.120	.001
	Within Groups	2.162	52	.042		
	Total	3.226	57			
M290T112	Between Groups	.982	5	.196	4.771	.001
	Within Groups	2.141	52	.041		
	Total	3.123	57			
M441T365	Between Groups	1.948	5	.390	8.261	.000
	Within Groups	2.452	52	.047		
	Total	4.400	57			
M526T60	Between Groups	8.824	5	1.765	40.278	.000
	Within Groups	2.278	52	.044		
	Total	11.103	57			
M556T62	Between Groups	16.271	5	3.254	39.782	.000
	Within Groups	4.254	52	.082		
	Total	20.524	57			

9.6 Tabelas de intervalos de confiança em gráfico de barras das variáveis

significativas e correlacionadas com a exposição à cocaína.

9.7 Tabelas de intervalos de confiança em gráfico de barras das variáveis significativas e correlacionadas com a exposição à privação de sono.

9.8 Tabelas de intervalos de confiança em gráfico de barras apenas das variáveis significativas e correlacionadas com a iteração da cocaína e a privação de sono.

9.9 Tabelas de intervalos de confiança em gráfico de barras apenas das variáveis significativas e correlacionadas com a privação de sono após 1 mês.

9.10 Tabela do teste *post-hoc* de Bonferroni da ANOVA das variáveis

Multiple Comparisons

Bonferroni

Dependent Variable	(I) Groups	(J) Groups	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
M137T579	SN	SP	.501992431700 [*]	.086657091580	.000	.23535990085	.76862496255
		SR	.067010579456	.089031698132	1.000	-.20692830502	.34094946393
		CN	.175474385200	.086657091580	.720	-.09115814565	.44210691605
		CP	.323100341344 [*]	.089031698132	.010	.04916145687	.59703922582
		CR	.068611904800	.086657091580	1.000	-.19802062605	.33524443565
	SP	SN	-.501992431700 [*]	.086657091580	.000	-.76862496255	-.23535990085
		SR	-.434981852244 [*]	.089031698132	.000	-.70892073672	-.16104296777
		CN	-.326518046500 [*]	.086657091580	.006	-.59315057735	-.05988551565
		CP	-.178892090356	.089031698132	.746	-.45283097483	.09504679412
		CR	-.433380526900 [*]	.086657091580	.000	-.70001305775	-.16674799605
	SR	SN	-.067010579456	.089031698132	1.000	-.34094946393	.20692830502
		SP	.434981852244 [*]	.089031698132	.000	.16104296777	.70892073672
		CN	.108463805744	.089031698132	1.000	-.16547507873	.38240269022
		CP	.256089761889	.091344594933	.106	-.02496560337	.53714512715
		CR	.001601325344	.089031698132	1.000	-.27233755913	.27554020982
	CN	SN	-.175474385200	.086657091580	.720	-.44210691605	.09115814565
		SP	.326518046500 [*]	.086657091580	.006	.05988551565	.59315057735
		SR	-.108463805744	.089031698132	1.000	-.38240269022	.16547507873
		CP	.147625956144	.089031698132	1.000	-.12631292833	.42156484062
		CR	-.106862480400	.086657091580	1.000	-.37349501125	.15977005045
	CP	SN	-.323100341344 [*]	.089031698132	.010	-.59703922582	-.04916145687
		SP	.178892090356	.089031698132	.746	-.09504679412	.45283097483
		SR	-.256089761889	.091344594933	.106	-.53714512715	.02496560337
		CN	-.147625956144	.089031698132	1.000	-.42156484062	.12631292833
		CR	-.254488436544	.089031698132	.092	-.52842732102	.01945044793
	CR	SN	-.068611904800	.086657091580	1.000	-.33524443565	.19802062605
		SP	.433380526900 [*]	.086657091580	.000	.16674799605	.70001305775
		SR	-.001601325344	.089031698132	1.000	-.27554020982	.27233755913
		CN	.106862480400	.086657091580	1.000	-.15977005045	.37349501125
		CP	.254488436544	.089031698132	.092	-.01945044793	.52842732102
M138T66	SN	SP	.148177732800	.131892174091	1.000	-.25763722748	.55399269308
		SR	.048853308378	.135506327474	1.000	-.36808192891	.46578854567
		CN	.233122658700	.131892174091	1.000	-.17269230158	.63893761898
		CP	.221185329267	.135506327474	1.000	-.19574990803	.63812056656

	SP	CR	.129607151200	.131892174091	1.000	-.27620780908	.53542211148
		SN	-.148177732800	.131892174091	1.000	-.55399269308	.25763722748
		SR	-.099324424422	.135506327474	1.000	-.51625966171	.31761081287
		CN	.084944925900	.131892174091	1.000	-.32087003438	.49075988618
		CP	.073007596467	.135506327474	1.000	-.34392764083	.48994283376
	SR	CR	-.018570581600	.131892174091	1.000	-.42438554188	.38724437868
		SN	-.048853308378	.135506327474	1.000	-.46578854567	.36808192891
		SP	.099324424422	.135506327474	1.000	-.31761081287	.51625966171
		CN	.184269350322	.135506327474	1.000	-.23266588697	.60120458761
		CP	.172332020889	.139026558559	1.000	-.25543450679	.60009854857
	CN	CR	.080753842822	.135506327474	1.000	-.33618139447	.49768908011
		SN	-.233122658700	.131892174091	1.000	-.63893761898	.17269230158
		SP	-.084944925900	.131892174091	1.000	-.49075988618	.32087003438
		SR	-.184269350322	.135506327474	1.000	-.60120458761	.23266588697
		CP	-.011937329433	.135506327474	1.000	-.42887256673	.40499790786
	CP	CR	-.103515507500	.131892174091	1.000	-.50933046778	.30229945278
		SN	-.221185329267	.135506327474	1.000	-.63812056656	.19574990803
		SP	-.073007596467	.135506327474	1.000	-.48994283376	.34392764083
		SR	-.172332020889	.139026558559	1.000	-.60009854857	.25543450679
		CN	.011937329433	.135506327474	1.000	-.40499790786	.42887256673
	CR	CR	-.091578178067	.135506327474	1.000	-.50851341536	.32535705923
		SN	-.129607151200	.131892174091	1.000	-.53542211148	.27620780908
		SP	.018570581600	.131892174091	1.000	-.38724437868	.42438554188
		SR	-.080753842822	.135506327474	1.000	-.49768908011	.33618139447
		CN	.103515507500	.131892174091	1.000	-.30229945278	.50933046778
M139T49	SN	CP	.091578178067	.135506327474	1.000	-.32535705923	.50851341536
		SP	-.288305644100	.094151047230	.052	-.57799609583	.00138480763
		SR	-.169343863822	.096731005657	1.000	-.46697251002	.12828478237
		CN	-.058833246400	.094151047230	1.000	-.34852369813	.23085720533
		CP	.101390742067	.096731005657	1.000	-.19623790413	.39901938826
	SP	CR	-.179303596000	.094151047230	.936	-.46899404773	.11038685573
		SN	.288305644100	.094151047230	.052	-.00138480763	.57799609583
		SR	.118961780278	.096731005657	1.000	-.17866686592	.41659042647
		CN	.229472397700	.094151047230	.274	-.06021805403	.51916284943
		CP	.389696386167	.096731005657	.003	.09206773997	.68732503236
	SR	CR	.109002048100	.094151047230	1.000	-.18068840363	.39869249983
		SN	.169343863822	.096731005657	1.000	-.12828478237	.46697251002
		SP	-.118961780278	.096731005657	1.000	-.41659042647	.17866686592
		CN	.110510617422	.096731005657	1.000	-.18711802877	.40813926362

		CP	.270734605889	.099243917779	.130	-.03462594207	.57609515385
		CR	-.009959732178	.096731005657	1.000	-.30758837837	.28766891402
CN		SN	.058833246400	.094151047230	1.000	-.23085720533	.34852369813
		SP	-.229472397700	.094151047230	.274	-.51916284943	.06021805403
		SR	-.110510617422	.096731005657	1.000	-.40813926362	.18711802877
		CP	.160223988467	.096731005657	1.000	-.13740465773	.45785263466
		CR	-.120470349600	.094151047230	1.000	-.41016080133	.16922010213
CP		SN	-.101390742067	.096731005657	1.000	-.39901938826	.19623790413
		SP	-.389696386167 ⁺	.096731005657	.003	-.68732503236	-.09206773997
		SR	-.270734605889	.099243917779	.130	-.57609515385	.03462594207
		CN	-.160223988467	.096731005657	1.000	-.45785263466	.13740465773
		CR	-.280694338067	.096731005657	.081	-.57832298426	.01693430813
CR		SN	.179303596000	.094151047230	.936	-.11038685573	.46899404773
		SP	-.109002048100	.094151047230	1.000	-.39869249983	.18068840363
		SR	.009959732178	.096731005657	1.000	-.28766891402	.30758837837
		CN	.120470349600	.094151047230	1.000	-.16922010213	.41016080133
		CP	.280694338067	.096731005657	.081	-.01693430813	.57832298426
M149T355	SN	SP	-.334154346200 ⁺	.091214348470	.009	-.61480896014	-.05349973226
		SR	-.132225088156	.093713834497	1.000	-.42057029352	.15612011721
		CN	.162159030900	.091214348470	1.000	-.11849558304	.44281364484
		CP	-.092206750044	.093713834497	1.000	-.38055195541	.19613845532
		CR	.141604795100	.091214348470	1.000	-.13904981884	.42225940904
	SP	SN	.334154346200 ⁺	.091214348470	.009	.05349973226	.61480896014
		SR	.201929258044	.093713834497	.538	-.08641594732	.49027446341
		CN	.496313377100 ⁺	.091214348470	.000	.21565876316	.77696799104
		CP	.241947596156	.093713834497	.190	-.04639760921	.53029280152
		CR	.475759141300 ⁺	.091214348470	.000	.19510452736	.75641375524
	SR	SN	.132225088156	.093713834497	1.000	-.15612011721	.42057029352
		SP	-.201929258044	.093713834497	.538	-.49027446341	.08641594732
		CN	.294384119056 ⁺	.093713834497	.042	.00603891369	.58272932442
		CP	.040018338111	.096148365485	1.000	-.25581760052	.33585427674
		CR	.273829883256	.093713834497	.077	-.01451532211	.56217508862
	CN	SN	-.162159030900	.091214348470	1.000	-.44281364484	.11849558304
		SP	-.496313377100 ⁺	.091214348470	.000	-.77696799104	-.21565876316
		SR	-.294384119056 ⁺	.093713834497	.042	-.58272932442	-.00603891369
		CP	-.254365780944	.093713834497	.135	-.54271098631	.03397942442
		CR	-.020554235800	.091214348470	1.000	-.30120884974	.26010037814
	CP	SN	.092206750044	.093713834497	1.000	-.19613845532	.38055195541
		SP	-.241947596156	.093713834497	.190	-.53029280152	.04639760921

M159T34	CR	SR	-.040018338111	.096148365485	1.000	-.33585427674	.25581760052
		CN	.254365780944	.093713834497	.135	-.03397942442	.54271098631
		CR	.233811545144	.093713834497	.237	-.05453366022	.52215675051
		SN	-.141604795100	.091214348470	1.000	-.42225940904	.13904981884
		SP	-.475759141300	.091214348470	.000	-.75641375524	-.19510452736
		SR	-.273829883256	.093713834497	.077	-.56217508862	.01451532211
	SN	CN	.020554235800	.091214348470	1.000	-.26010037814	.30120884974
		CP	-.233811545144	.093713834497	.237	-.52215675051	.05453366022
		SP	-.442412739000	.157450821153	.105	-.92686831169	.04204283369
		SR	.221044589867	.161765341116	1.000	-.27668619615	.71877537588
		CN	.548833313200	.157450821153	.015	.06437774051	1.03328888589
		CP	.163599577422	.161765341116	1.000	-.33413120859	.66133036344
	SP	CR	.204027624600	.157450821153	1.000	-.28042794809	.68848319729
		SN	.442412739000	.157450821153	.105	-.04204283369	.92686831169
		SR	.663457328867	.161765341116	.002	.16572654285	1.16118811488
		CN	.991246052200	.157450821153	.000	.50679047951	1.47570162489
		CP	.606012316422	.161765341116	.007	.10828153041	1.10374310244
		CR	.646440363600	.157450821153	.002	.16198479091	1.13089593629
	SR	SN	-.221044589867	.161765341116	1.000	-.71877537588	.27668619615
		SP	-.663457328867	.161765341116	.002	-1.16118811488	-.16572654285
		CN	.327788723333	.161765341116	.718	-.16994206268	.82551950935
		CP	-.057445012444	.165967738103	1.000	-.56810602406	.45321599917
		CR	-.017016965267	.161765341116	1.000	-.51474775128	.48071382075
	CN	SN	-.548833313200	.157450821153	.015	-1.03328888589	-.06437774051
		SP	-.991246052200	.157450821153	.000	-1.47570162489	-.50679047951
		SR	-.327788723333	.161765341116	.718	-.82551950935	.16994206268
		CP	-.385233735778	.161765341116	.314	-.88296452179	.11249705024
		CR	-.344805688600	.157450821153	.496	-.82926126129	.13964988409
	CP	SN	-.163599577422	.161765341116	1.000	-.66133036344	.33413120859
		SP	-.606012316422	.161765341116	.007	-1.10374310244	-.10828153041
		SR	.057445012444	.165967738103	1.000	-.45321599917	.56810602406
		CN	.385233735778	.161765341116	.314	-.11249705024	.88296452179
		CR	.040428047178	.161765341116	1.000	-.45730273884	.53815883319
	CR	SN	-.204027624600	.157450821153	1.000	-.68848319729	.28042794809
		SP	-.646440363600	.157450821153	.002	-1.13089593629	-.16198479091
		SR	.017016965267	.161765341116	1.000	-.48071382075	.51474775128
		CN	.344805688600	.157450821153	.496	-.13964988409	.82926126129
		CP	-.040428047178	.161765341116	1.000	-.53815883319	.45730273884
		SN	.486683453300	.133683811997	.009	.07535585764	.89801104896

		SR	.209292458689	.137347060441	1.000	-.21330647306	.63189139044
		CN	-.045464550300	.133683811997	1.000	-.45679214596	.36586304536
		CP	.664399337244	.137347060441	.000	.24180040549	1.08699826900
		CR	-.028081865500	.133683811997	1.000	-.43940946116	.38324573016
	SP	SN	-.486683453300	.133683811997	.009	-.89801104896	-.07535585764
		SR	-.277390994611	.137347060441	.729	-.69998992636	.14520793714
		CN	-.532148003600	.133683811997	.003	-.94347559926	-.12082040794
		CP	.177715883944	.137347060441	1.000	-.24488304781	.60031481570
		CR	-.514765318800	.133683811997	.005	-.92609291446	-.10343772314
	SR	SN	-.209292458689	.137347060441	1.000	-.63189139044	.21330647306
		SP	.277390994611	.137347060441	.729	-.14520793714	.69998992636
		CN	-.254757008989	.137347060441	1.000	-.67735594074	.16784192276
		CP	.455106878556	.140915110735	.032	.02152952296	.88868423415
		CR	-.237374324189	.137347060441	1.000	-.65997325594	.18522460756
	CN	SN	.045464550300	.133683811997	1.000	-.36586304536	.45679214596
		SP	.532148003600	.133683811997	.003	.12082040794	.94347559926
		SR	.254757008989	.137347060441	1.000	-.16784192276	.67735594074
		CP	.709863887544	.137347060441	.000	.28726495579	1.13246281930
		CR	.017382684800	.133683811997	1.000	-.39394491086	.42871028046
	CP	SN	-.664399337244	.137347060441	.000	-1.08699826900	-.24180040549
		SP	-.177715883944	.137347060441	1.000	-.60031481570	.24488304781
		SR	-.455106878556	.140915110735	.032	-.88868423415	-.02152952296
		CN	-.709863887544	.137347060441	.000	-1.13246281930	-.28726495579
		CR	-.692481202744	.137347060441	.000	-1.11508013450	-.26988227099
	CR	SN	.028081865500	.133683811997	1.000	-.38324573016	.43940946116
		SP	.514765318800	.133683811997	.005	.10343772314	.92609291446
		SR	.237374324189	.137347060441	1.000	-.18522460756	.65997325594
		CN	-.017382684800	.133683811997	1.000	-.42871028046	.39394491086
		CP	.692481202744	.137347060441	.000	.26988227099	1.11508013450
M168T377	SN	SP	-.126069169400	.067391310229	1.000	-.33342341215	.08128507335
		SR	-.075897583478	.069237989409	1.000	-.28893381641	.13713864946
		CN	-	.067391310229	.000	-1.60859198455	-1.19388349905
		CP	1.401237741800	.069237989409	.000	-1.55576752830	-1.12969506243
		CR	1.342731295367	.067391310229	.000	-1.50482337175	-1.09011488625
	SP	SN	.126069169400	.067391310229	1.000	-.08128507335	.33342341215
		SR	.050171585922	.069237989409	1.000	-.16286464701	.26320781886
		CN	-	.067391310229	.000	-1.60859198455	-1.19388349905
		CP	1.401237741800	.069237989409	.000	-1.55576752830	-1.12969506243
		CR	1.342731295367	.067391310229	.000	-1.50482337175	-1.09011488625

		CN	- 1.275168572400 ⁺	.067391310229	.000	-1.48252281515	-1.06781432965	
		CP	- 1.216662125967 ⁺	.069237989409	.000	-1.42969835890	-1.00362589303	
		CR	- 1.171399959600 ⁺	.067391310229	.000	-1.37875420235	-.96404571685	
SR	SN		.075897583478	.069237989409	1.000	-.13713864946	.28893381641	
	SP		-.050171585922	.069237989409	1.000	-.26320781886	.16286464701	
	CN		- 1.325340158322 ⁺	.069237989409	.000	-1.53837639126	-1.11230392539	
	CP		- 1.266833711889 ⁺	.071036678275	.000	-1.48540427509	-1.04826314869	
	CR		- 1.221571545522 ⁺	.069237989409	.000	-1.43460777846	-1.00853531259	
CN	SN		1.401237741800 ⁺	.067391310229	.000	1.19388349905	1.60859198455	
	SP		1.275168572400 ⁺	.067391310229	.000	1.06781432965	1.48252281515	
	SR		1.325340158322 ⁺	.069237989409	.000	1.11230392539	1.53837639126	
	CP		.058506446433	.069237989409	1.000	-.15452978650	.27154267937	
	CR		.103768612800	.067391310229	1.000	-.10358562995	.31112285555	
CP	SN		1.342731295367 ⁺	.069237989409	.000	1.12969506243	1.55576752830	
	SP		1.216662125967 ⁺	.069237989409	.000	1.00362589303	1.42969835890	
	SR		1.266833711889 ⁺	.071036678275	.000	1.04826314869	1.48540427509	
	CN		-.058506446433	.069237989409	1.000	-.27154267937	.15452978650	
	CR		.045262166367	.069237989409	1.000	-.16777406657	.25829839930	
CR	SN		1.297469129000 ⁺	.067391310229	.000	1.09011488625	1.50482337175	
	SP		1.171399959600 ⁺	.067391310229	.000	.96404571685	1.37875420235	
	SR		1.221571545522 ⁺	.069237989409	.000	1.00853531259	1.43460777846	
	CN		-.103768612800	.067391310229	1.000	-.31112285555	.10358562995	
	CP		-.045262166367	.069237989409	1.000	-.25829839930	.16777406657	
M168T95	SN	SP		-.076160994000	.119979287583	1.000	-.44532156141	.29299957341
		SR		-.000093419367	.123267000074	1.000	-.37936984789	.37918300915
		CN		-.963998762000 ⁺	.119979287583	.000	-1.33315932941	-.59483819459
		CP		-.926950092589 ⁺	.123267000074	.000	-1.30622652111	-.54767366407
		CR		-.867044323600 ⁺	.119979287583	.000	-1.23620489101	-.49788375619
	SP	SN		.076160994000	.119979287583	1.000	-.29299957341	.44532156141
		SR		.076067574633	.123267000074	1.000	-.30320885389	.45534400315
		CN		-.887837768000 ⁺	.119979287583	.000	-1.25699833541	-.51867720059
		CP		-.850789098589 ⁺	.123267000074	.000	-1.23006552711	-.47151267007
		CR		-.790883329600 ⁺	.119979287583	.000	-1.16004389701	-.42172276219
	SR	SN		.000093419367	.123267000074	1.000	-.37918300915	.37936984789

		SP	-.076067574633	.123267000074	1.000	-.45534400315	.30320885389
		CN	-.963905342633	.123267000074	.000	-1.34318177115	-.58462891411
		CP	-.926856673222	.126469273602	.000	-1.31598607834	-.53772726811
		CR	-.866950904233	.123267000074	.000	-1.24622733275	-.48767447571
	CN	SN	.963998762000	.119979287583	.000	.59483819459	1.33315932941
		SP	.887837768000	.119979287583	.000	.51867720059	1.25699833541
		SR	.963905342633	.123267000074	.000	.58462891411	1.34318177115
		CP	.037048669411	.123267000074	1.000	-.34222775911	.41632509793
		CR	.096954438400	.119979287583	1.000	-.27220612901	.46611500581
	CP	SN	.926950092589	.123267000074	.000	.54767366407	1.30622652111
		SP	.850789098589	.123267000074	.000	.47151267007	1.23006552711
		SR	.926856673222	.126469273602	.000	.53772726811	1.31598607834
		CN	-.037048669411	.123267000074	1.000	-.41632509793	.34222775911
		CR	.059905768989	.123267000074	1.000	-.31937065953	.43918219751
	CR	SN	.867044323600	.119979287583	.000	.49788375619	1.23620489101
		SP	.790883329600	.119979287583	.000	.42172276219	1.16004389701
		SR	.866950904233	.123267000074	.000	.48767447571	1.24622733275
		CN	-.096954438400	.119979287583	1.000	-.46611500581	.27220612901
		CP	-.059905768989	.123267000074	1.000	-.43918219751	.31937065953
M175T44	SN	SP	-.044998093900	.091172430993	1.000	-.32552373325	.23552754545
		SR	.097560864156	.093670768383	1.000	-.19065183241	.38577356072
		CN	-.299154279600	.091172430993	.028	-.57967991895	-.01862864025
		CP	.059407058378	.093670768383	1.000	-.22880563819	.34761975494
		CR	-.103006982100	.091172430993	1.000	-.38353262145	.17751865725
	SP	SN	.044998093900	.091172430993	1.000	-.23552754545	.32552373325
		SR	.142558958056	.093670768383	1.000	-.14565373851	.43077165462
		CN	-.254156185700	.091172430993	.111	-.53468182505	.02636945365
		CP	.104405152278	.093670768383	1.000	-.18380754429	.39261784884
		CR	-.058008888200	.091172430993	1.000	-.33853452755	.22251675115
	SR	SN	-.097560864156	.093670768383	1.000	-.38577356072	.19065183241
		SP	-.142558958056	.093670768383	1.000	-.43077165462	.14565373851
		CN	-.396715143756	.093670768383	.001	-.68492784032	-.10850244719
		CP	-.038153805778	.096104180584	1.000	-.33385379325	.25754618169
		CR	-.200567846256	.093670768383	.554	-.48878054282	.08764485031
	CN	SN	.299154279600	.091172430993	.028	.01862864025	.57967991895
		SP	.254156185700	.091172430993	.111	-.02636945365	.53468182505
		SR	.396715143756	.093670768383	.001	.10850244719	.68492784032
		CP	.358561337978	.093670768383	.005	.07034864141	.64677403454
		CR	.196147297500	.091172430993	.542	-.08437834185	.47667293685

M177T281	CP	SN	-.059407058378	.093670768383	1.000	-.34761975494	.22880563819
		SP	-.104405152278	.093670768383	1.000	-.39261784884	.18380754429
		SR	.038153805778	.096104180584	1.000	-.25754618169	.33385379325
		CN	-.358561337978	.093670768383	.005	-.64677403454	-.07034864141
		CR	-.162414040478	.093670768383	1.000	-.45062673704	.12579865609
	CR	SN	.103006982100	.091172430993	1.000	-.17751865725	.38353262145
		SP	.058008888200	.091172430993	1.000	-.22251675115	.33853452755
		SR	.200567846256	.093670768383	.554	-.08764485031	.48878054282
		CN	-.196147297500	.091172430993	.542	-.47667293685	.08437834185
		CP	.162414040478	.093670768383	1.000	-.12579865609	.45062673704
	SN	SP	.921028601500	.227202375047	.003	.22195662516	1.62010057784
		SR	.387541919589	.233428250374	1.000	-.33068626041	1.10577009959
		CN	-.067216942700	.227202375047	1.000	-.76628891904	.63185503364
		CP	.902582327144	.233428250374	.005	.18435414714	1.62081050715
		CR	-.236802335600	.227202375047	1.000	-.93587431194	.46226964074
	SP	SN	-.921028601500	.227202375047	.003	-1.62010057784	-.22195662516
		SR	-.533486681911	.233428250374	.396	-1.25171486191	.18474149809
		CN	-.988245544200	.227202375047	.001	-1.68731752054	-.28917356786
		CP	-.018446274356	.233428250374	1.000	-.73667445436	.69978190565
		CR	- 1.157830937100	.227202375047	.000	-1.85690291344	-.45875896076
	SR	SN	-.387541919589	.233428250374	1.000	-1.10577009959	.33068626041
		SP	.533486681911	.233428250374	.396	-.18474149809	1.25171486191
		CN	-.454758862289	.233428250374	.852	-1.17298704229	.26346931771
		CP	.515040407556	.239492331649	.543	-.22184615698	1.25192697209
		CR	-.624344255189	.233428250374	.150	-1.34257243519	.09388392481
	CN	SN	.067216942700	.227202375047	1.000	-.63185503364	.76628891904
		SP	.988245544200	.227202375047	.001	.28917356786	1.68731752054
		SR	.454758862289	.233428250374	.852	-.26346931771	1.17298704229
		CP	.969799269844	.233428250374	.002	.25157108984	1.68802744985
		CR	-.169585392900	.227202375047	1.000	-.86865736924	.52948658344
	CP	SN	-.902582327144	.233428250374	.005	-1.62081050715	-.18435414714
		SP	.018446274356	.233428250374	1.000	-.69978190565	.73667445436
		SR	-.515040407556	.239492331649	.543	-1.25192697209	.22184615698
		CN	-.969799269844	.233428250374	.002	-1.68802744985	-.25157108984
		CR	- 1.139384662744	.233428250374	.000	-1.85761284275	-.42115648274
	CR	SN	.236802335600	.227202375047	1.000	-.46226964074	.93587431194
		SP	1.157830937100	.227202375047	.000	.45875896076	1.85690291344
		SR	.624344255189	.233428250374	.150	-.09388392481	1.34257243519

		CN	.169585392900	.227202375047	1.000	-.52948658344	.86865736924
		CP	1.139384662744	.233428250374	.000	.42115648274	1.85761284275
M181T48	SN	SP	.133669635800	.104288786642	1.000	-.18721331348	.45455258508
		SR	.039480915100	.107146542788	1.000	-.29019497587	.36915680607
		CN	.239529332000	.104288786642	.385	-.08135361728	.56041228128
		CP	.253388078322	.107146542788	.327	-.07628781265	.58306396929
		CR	.248480549500	.104288786642	.313	-.07240239978	.56936349878
	SP	SN	-.133669635800	.104288786642	1.000	-.45455258508	.18721331348
		SR	-.094188720700	.107146542788	1.000	-.42386461167	.23548717027
		CN	.105859696200	.104288786642	1.000	-.21502325308	.42674264548
		CP	.119718442522	.107146542788	1.000	-.20995744845	.44939433349
		CR	.114810913700	.104288786642	1.000	-.20607203558	.43569386298
	SR	SN	-.039480915100	.107146542788	1.000	-.36915680607	.29019497587
		SP	.094188720700	.107146542788	1.000	-.23548717027	.42386461167
		CN	.200048416900	.107146542788	1.000	-.12962747407	.52972430787
		CP	.213907163222	.109930033401	.856	-.12433316412	.55214749056
		CR	.208999634400	.107146542788	.848	-.12067625657	.53867552537
	CN	SN	-.239529332000	.104288786642	.385	-.56041228128	.08135361728
		SP	-.105859696200	.104288786642	1.000	-.42674264548	.21502325308
		SR	-.200048416900	.107146542788	1.000	-.52972430787	.12962747407
		CP	.013858746322	.107146542788	1.000	-.31581714465	.34353463729
		CR	.008951217500	.104288786642	1.000	-.31193173178	.32983416678
	CP	SN	-.253388078322	.107146542788	.327	-.58306396929	.07628781265
		SP	-.119718442522	.107146542788	1.000	-.44939433349	.20995744845
		SR	-.213907163222	.109930033401	.856	-.55214749056	.12433316412
		CN	-.013858746322	.107146542788	1.000	-.34353463729	.31581714465
		CR	-.004907528822	.107146542788	1.000	-.33458341979	.32476836215
	CR	SN	-.248480549500	.104288786642	.313	-.56936349878	.07240239978
		SP	-.114810913700	.104288786642	1.000	-.43569386298	.20607203558
		SR	-.208999634400	.107146542788	.848	-.53867552537	.12067625657
		CN	-.008951217500	.104288786642	1.000	-.32983416678	.31193173178
		CP	.004907528822	.107146542788	1.000	-.32476836215	.33458341979
M186T59	SN	SP	.316334957000	.096489774611	.028	.01944854716	.61322136684
		SR	.104545915533	.099133819626	1.000	-.20047587481	.40956770588
		CN	.051654431300	.096489774611	1.000	-.24523197854	.34854084114
		CP	.450235540200	.099133819626	.001	.14521374985	.75525733055
		CR	.028376495900	.096489774611	1.000	-.26850991394	.32526290574
	SP	SN	-.316334957000	.096489774611	.028	-.61322136684	-.01944854716
		SR	-.211789041467	.099133819626	.561	-.51681083181	.09323274888

		CN	-.264680525700	.096489774611	.125	-.56156693554	.03220588414
		CP	.133900583200	.099133819626	1.000	-.17112120715	.43892237355
		CR	-.287958461100	.096489774611	.065	-.58484487094	.00892794874
	SR	SN	-.104545915533	.099133819626	1.000	-.40956770588	.20047587481
		SP	.211789041467	.099133819626	.561	-.09323274888	.51681083181
		CN	-.052891484233	.099133819626	1.000	-.35791327458	.25213030611
		CP	.345689624667*	.101709152896	.020	.03274387086	.65863537848
		CR	-.076169419633	.099133819626	1.000	-.38119120998	.22885237071
	CN	SN	-.051654431300	.096489774611	1.000	-.34854084114	.24523197854
		SP	.264680525700	.096489774611	.125	-.03220588414	.56156693554
		SR	.052891484233	.099133819626	1.000	-.25213030611	.35791327458
		CP	.398581108900*	.099133819626	.003	.09355931855	.70360289925
		CR	-.023277935400	.096489774611	1.000	-.32016434524	.27360847444
	CP	SN	-.450235540200*	.099133819626	.001	-.75525733055	-.14521374985
		SP	-.133900583200	.099133819626	1.000	-.43892237355	.17112120715
		SR	-.345689624667*	.101709152896	.020	-.65863537848	-.03274387086
		CN	-.398581108900*	.099133819626	.003	-.70360289925	-.09355931855
		CR	-.421859044300*	.099133819626	.001	-.72688083465	-.11683725395
	CR	SN	-.028376495900	.096489774611	1.000	-.32526290574	.26850991394
		SP	.287958461100	.096489774611	.065	-.00892794874	.58484487094
		SR	.076169419633	.099133819626	1.000	-.22885237071	.38119120998
		CN	.023277935400	.096489774611	1.000	-.27360847444	.32016434524
		CP	.421859044300*	.099133819626	.001	.11683725395	.72688083465
M186T73	SN	SP	.136550459300	.048684225351	.106	-.01324453129	.28634544989
		SR	.044415968022	.050018286746	1.000	-.10948375491	.19831569095
		CN	-.004934937700	.048684225351	1.000	-.15472992829	.14486005289
		CP	.042368694911	.050018286746	1.000	-.11153102802	.19626841784
		CR	.033564767800	.048684225351	1.000	-.11623022279	.18335975839
	SP	SN	-.136550459300	.048684225351	.106	-.28634544989	.01324453129
		SR	-.092134491278	.050018286746	1.000	-.24603421421	.06176523165
		CN	-.141485397000	.048684225351	.080	-.29128038759	.00830959359
		CP	-.094181764389	.050018286746	.980	-.24808148732	.05971795854
		CR	-.102985691500	.048684225351	.588	-.25278068209	.04680929909
	SR	SN	-.044415968022	.050018286746	1.000	-.19831569095	.10948375491
		SP	.092134491278	.050018286746	1.000	-.06176523165	.24603421421
		CN	-.049350905722	.050018286746	1.000	-.20325062865	.10454881721
		CP	-.002047273111	.051317679410	1.000	-.15994505723	.15585051101
		CR	-.010851200222	.050018286746	1.000	-.16475092315	.14304852271
	CN	SN	.004934937700	.048684225351	1.000	-.14486005289	.15472992829

M202T336		SP	.141485397000	.048684225351	.080	-.00830959359	.29128038759
		SR	.049350905722	.050018286746	1.000	-.10454881721	.20325062865
		CP	.047303632611	.050018286746	1.000	-.10659609032	.20120335554
		CR	.038499705500	.048684225351	1.000	-.11129528509	.18829469609
	CP	SN	-.042368694911	.050018286746	1.000	-.19626841784	.11153102802
		SP	.094181764389	.050018286746	.980	-.05971795854	.24808148732
		SR	.002047273111	.051317679410	1.000	-.15585051101	.15994505723
		CN	-.047303632611	.050018286746	1.000	-.20120335554	.10659609032
		CR	-.008803927111	.050018286746	1.000	-.16270365004	.14509579582
	CR	SN	-.033564767800	.048684225351	1.000	-.18335975839	.11623022279
		SP	.102985691500	.048684225351	.588	-.04680929909	.25278068209
		SR	.010851200222	.050018286746	1.000	-.14304852271	.16475092315
		CN	-.038499705500	.048684225351	1.000	-.18829469609	.11129528509
		CP	.008803927111	.050018286746	1.000	-.14509579582	.16270365004
	SN	SP	.094376963500	.094527507311	1.000	-.19647180663	.38522573363
		SR	.113460857244	.097117781622	1.000	-.18535784798	.41227956247
		CN	-.149077581200	.094527507311	1.000	-.43992635133	.14177118893
		CP	.038537199022	.097117781622	1.000	-.26028150620	.33735590425
		CR	-.134287724800	.094527507311	1.000	-.42513649493	.15656104533
	SP	SN	-.094376963500	.094527507311	1.000	-.38522573363	.19647180663
		SR	.019083893744	.097117781622	1.000	-.27973481148	.31790259897
		CN	-.243454544700	.094527507311	.193	-.53430331483	.04739422543
		CP	-.055839764478	.097117781622	1.000	-.35465846970	.24297894075
		CR	-.228664688300	.094527507311	.286	-.51951345843	.06218408183
	SR	SN	-.113460857244	.097117781622	1.000	-.41227956247	.18535784798
		SP	-.019083893744	.097117781622	1.000	-.31790259897	.27973481148
		CN	-.262538438444	.097117781622	.139	-.56135714367	.03628026678
		CP	-.074923658222	.099640741547	1.000	-.38150518098	.23165786454
		CR	-.247748582044	.097117781622	.206	-.54656728727	.05107012318
	CN	SN	.149077581200	.094527507311	1.000	-.14177118893	.43992635133
		SP	.243454544700	.094527507311	.193	-.04739422543	.53430331483
		SR	.262538438444	.097117781622	.139	-.03628026678	.56135714367
		CP	.187614780222	.097117781622	.883	-.11120392500	.48643348545
		CR	.014789856400	.094527507311	1.000	-.27605891373	.30563862653
	CP	SN	-.038537199022	.097117781622	1.000	-.33735590425	.26028150620
		SP	.055839764478	.097117781622	1.000	-.24297894075	.35465846970
		SR	.074923658222	.099640741547	1.000	-.23165786454	.38150518098
		CN	-.187614780222	.097117781622	.883	-.48643348545	.11120392500
		CR	-.172824923822	.097117781622	1.000	-.47164362905	.12599378140

	CR	SN	.134287724800	.094527507311	1.000	-.15656104533	.42513649493
		SP	.228664688300	.094527507311	.286	-.06218408183	.51951345843
		SR	.247748582044	.097117781622	.206	-.05107012318	.54656728727
		CN	-.014789856400	.094527507311	1.000	-.30563862653	.27605891373
		CP	.172824923822	.097117781622	1.000	-.12599378140	.47164362905
M210T68	SN	SP	-.261694368000	.133539361790	.831	-.67257750928	.14918877328
		SR	-.337314105900	.137198651961	.260	-.75945640418	.08482819238
		CN	-.069340129600	.133539361790	1.000	-.48022327088	.34154301168
		CP	-.531606916789	.137198651961	.005	-.95374921507	-.10946461851
		CR	-.195164926700	.133539361790	1.000	-.60604806798	.21571821458
	SP	SN	.261694368000	.133539361790	.831	-.14918877328	.67257750928
		SR	-.075619737900	.137198651961	1.000	-.49776203618	.34652256038
		CN	.192354238400	.133539361790	1.000	-.21852890288	.60323737968
		CP	-.269912548789	.137198651961	.817	-.69205484707	.15222974949
		CR	.066529441300	.133539361790	1.000	-.34435369998	.47741258258
	SR	SN	.337314105900	.137198651961	.260	-.08482819238	.75945640418
		SP	.075619737900	.137198651961	1.000	-.34652256038	.49776203618
		CN	.267973976300	.137198651961	.843	-.15416832198	.69011627458
		CP	-.194292810889	.140762846847	1.000	-.62740167042	.23881604865
		CR	.142149179200	.137198651961	1.000	-.27999311908	.56429147748
	CN	SN	.069340129600	.133539361790	1.000	-.34154301168	.48022327088
		SP	-.192354238400	.133539361790	1.000	-.60323737968	.21852890288
		SR	-.267973976300	.137198651961	.843	-.69011627458	.15416832198
		CP	-.462266787189	.137198651961	.021	-.88440908547	-.04012448891
		CR	-.125824797100	.133539361790	1.000	-.53670793838	.28505834418
	CP	SN	.531606916789	.137198651961	.005	.10946461851	.95374921507
		SP	.269912548789	.137198651961	.817	-.15222974949	.69205484707
		SR	.194292810889	.140762846847	1.000	-.23881604865	.62740167042
		CN	.462266787189	.137198651961	.021	.04012448891	.88440908547
		CR	.336441990089	.137198651961	.264	-.08570030819	.75858428837
	CR	SN	.195164926700	.133539361790	1.000	-.21571821458	.60604806798
		SP	-.066529441300	.133539361790	1.000	-.47741258258	.34435369998
		SR	-.142149179200	.137198651961	1.000	-.56429147748	.27999311908
		CN	.125824797100	.133539361790	1.000	-.28505834418	.53670793838
		CP	-.336441990089	.137198651961	.264	-.75858428837	.08570030819
M227T69	SN	SP	-.066313960600	.096810830390	1.000	-.36418821705	.23156029585
		SR	-.120537377422	.099463673082	1.000	-.42657408369	.18549932885
		CN	.040640153500	.096810830390	1.000	-.25723410295	.33851440995
		CP	-.040405695978	.099463673082	1.000	-.34644240225	.26563101029

	SP	CR	-.149595769800	.096810830390	1.000	-.44747002625	.14827848665
		SN	.066313960600	.096810830390	1.000	-.23156029585	.36418821705
		SR	-.054223416822	.099463673082	1.000	-.36026012309	.25181328945
		CN	.106954114100	.096810830390	1.000	-.19092014235	.40482837055
		CP	.025908264622	.099463673082	1.000	-.28012844165	.33194497089
	SR	CR	-.083281809200	.096810830390	1.000	-.38115606565	.21459244725
		SN	.120537377422	.099463673082	1.000	-.18549932885	.42657408369
		SP	.054223416822	.099463673082	1.000	-.25181328945	.36026012309
		CN	.161177530922	.099463673082	1.000	-.14485917535	.46721423719
		CP	.080131681444	.102047575401	1.000	-.23385535413	.39411871702
	CN	CR	-.029058392378	.099463673082	1.000	-.33509509865	.27697831389
		SN	-.040640153500	.096810830390	1.000	-.33851440995	.25723410295
		SP	-.106954114100	.096810830390	1.000	-.40482837055	.19092014235
		SR	-.161177530922	.099463673082	1.000	-.46721423719	.14485917535
		CP	-.081045849478	.099463673082	1.000	-.38708255575	.22499085679
	CP	CR	-.190235923300	.096810830390	.821	-.48811017975	.10763833315
		SN	.040405695978	.099463673082	1.000	-.26563101029	.34644240225
		SP	-.025908264622	.099463673082	1.000	-.33194497089	.28012844165
		SR	-.080131681444	.102047575401	1.000	-.39411871702	.23385535413
		CN	.081045849478	.099463673082	1.000	-.22499085679	.38708255575
	CR	CR	-.109190073822	.099463673082	1.000	-.41522678009	.19684663245
		SN	.149595769800	.096810830390	1.000	-.14827848665	.44747002625
		SP	.083281809200	.096810830390	1.000	-.21459244725	.38115606565
		SR	.029058392378	.099463673082	1.000	-.27697831389	.33509509865
		CN	.190235923300	.096810830390	.821	-.10763833315	.48811017975
M229T67		CP	.109190073822	.099463673082	1.000	-.19684663245	.41522678009
		SN	.409461886000	.152131731919	.143	-.05862754517	.87755131717
		SR	.240448770611	.156300496422	1.000	-.24046740341	.72136494463
		CN	-.161507307400	.152131731919	1.000	-.62959673857	.30658212377
		CP	.447510087056	.156300496422	.091	-.03340608697	.92842626108
	SP	CR	-.047808941500	.152131731919	1.000	-.51589837267	.42028048967
		SN	-.409461886000	.152131731919	.143	-.87755131717	.05862754517
		SR	-.169013115389	.156300496422	1.000	-.64992928941	.31190305863
		CN	-.570969193400	.152131731919	.007	-1.03905862457	-.10287976223
		CP	.038048201056	.156300496422	1.000	-.44286797297	.51896437508
	SR	CR	-.457270827500	.152131731919	.061	-.92536025867	.01081860367
		SN	-.240448770611	.156300496422	1.000	-.72136494463	.24046740341
		SP	.169013115389	.156300496422	1.000	-.31190305863	.64992928941
		CN	-.401956078011	.156300496422	.195	-.88287225203	.07896009601

		CP	.207061316444	.160360925750	1.000	-.28634826727	.70047090016
		CR	-.288257712111	.156300496422	1.000	-.76917388613	.19265846191
CN		SN	.161507307400	.152131731919	1.000	-.30658212377	.62959673857
		SP	.570969193400	.152131731919	.007	.10287976223	1.03905862457
		SR	.401956078011	.156300496422	.195	-.07896009601	.88287225203
		CP	.609017394456	.156300496422	.004	.12810122043	1.08993356848
		CR	.113698365900	.152131731919	1.000	-.35439106527	.58178779707
CP		SN	-.447510087056	.156300496422	.091	-.92842626108	.03340608697
		SP	-.038048201056	.156300496422	1.000	-.51896437508	.44286797297
		SR	-.207061316444	.160360925750	1.000	-.70047090016	.28634826727
		CN	-.609017394456	.156300496422	.004	-1.08993356848	-.12810122043
		CR	-.495319028556	.156300496422	.038	-.97623520258	-.01440285453
CR		SN	.047808941500	.152131731919	1.000	-.42028048967	.51589837267
		SP	.457270827500	.152131731919	.061	-.01081860367	.92536025867
		SR	.288257712111	.156300496422	1.000	-.19265846191	.76917388613
		CN	-.113698365900	.152131731919	1.000	-.58178779707	.35439106527
		CP	.495319028556	.156300496422	.038	.01440285453	.97623520258
M229T69	SN	SP	.406062495500	.273451582870	1.000	-.43531224114	1.24743723214
		SR	.430176166767	.280944794429	1.000	-.43425420128	1.29460653482
		CN	-.155116203700	.273451582870	1.000	-.99649094034	.68625853294
		CP	.266793422100	.280944794429	1.000	-.59763694595	1.13122379015
		CR	.029762091100	.273451582870	1.000	-.81161264554	.87113682774
	SP	SN	-.406062495500	.273451582870	1.000	-1.24743723214	.43531224114
		SR	.024113671267	.280944794429	1.000	-.84031669678	.88854403932
		CN	-.561178699200	.273451582870	.678	-1.40255343584	.28019603744
		CP	-.139269073400	.280944794429	1.000	-1.00369944145	.72516129465
		CR	-.376300404400	.273451582870	1.000	-1.21767514104	.46507433224
	SR	SN	-.430176166767	.280944794429	1.000	-1.29460653482	.43425420128
		SP	-.024113671267	.280944794429	1.000	-.88854403932	.84031669678
		CN	-.585292370467	.280944794429	.632	-1.44972273852	.27913799758
		CP	-.163382744667	.288243277216	1.000	-1.05026958917	.72350409984
		CR	-.400414075667	.280944794429	1.000	-1.26484444372	.46401629238
	CN	SN	.155116203700	.273451582870	1.000	-.68625853294	.99649094034
		SP	.561178699200	.273451582870	.678	-.28019603744	1.40255343584
		SR	.585292370467	.280944794429	.632	-.27913799758	1.44972273852
		CP	.421909625800	.280944794429	1.000	-.44252074225	1.28633999385
		CR	.184878294800	.273451582870	1.000	-.65649644184	1.02625303144
	CP	SN	-.266793422100	.280944794429	1.000	-1.13122379015	.59763694595
		SP	.139269073400	.280944794429	1.000	-.72516129465	1.00369944145

M248T61	CR	SR	.163382744667	.288243277216	1.000	-.72350409984	1.05026958917
		CN	-.421909625800	.280944794429	1.000	-1.28633999385	.44252074225
		CR	-.237031331000	.280944794429	1.000	-1.10146169905	.62739903705
		SN	-.029762091100	.273451582870	1.000	-.87113682774	.81161264554
		SP	.376300404400	.273451582870	1.000	-.46507433224	1.21767514104
		SR	.400414075667	.280944794429	1.000	-.46401629238	1.26484444372
		CN	-.184878294800	.273451582870	1.000	-1.02625303144	.65649644184
	SN	CP	.237031331000	.280944794429	1.000	-.62739903705	1.10146169905
		SP	-.183564794500	.065815157775	.111	-.38606942241	.01893983341
		SR	-.094175522278	.067618646700	1.000	-.30222924960	.11387820505
		CN	.218119192900	.065815157775	.025	.01561456499	.42062382081
		CP	.030099655278	.067618646700	1.000	-.17795407205	.23815338260
		CR	.176238133900	.065815157775	.148	-.02626649401	.37874276181
		SP	.183564794500	.065815157775	.111	-.01893983341	.38606942241
	SP	SR	.089389272222	.067618646700	1.000	-.11866445510	.29744299955
		CN	.401683987400	.065815157775	.000	.19917935949	.60418861531
		CP	.213664449778	.067618646700	.039	.00561072245	.42171817710
		CR	.359802928400	.065815157775	.000	.15729830049	.56230755631
		SN	.094175522278	.067618646700	1.000	-.11387820505	.30222924960
	SR	SP	-.089389272222	.067618646700	1.000	-.29744299955	.11866445510
		CN	.312294715178	.067618646700	.000	.10424098785	.52034844250
		CP	.124275177556	.069375267711	1.000	-.08918344275	.33773379786
		CR	.270413656178	.067618646700	.003	.06235992885	.47846738350
		SN	-.218119192900	.065815157775	.025	-.42062382081	-.01561456499
	CN	SP	-.401683987400	.065815157775	.000	-.60418861531	-.19917935949
		SR	-.312294715178	.067618646700	.000	-.52034844250	-.10424098785
		CP	-.188019537622	.067618646700	.113	-.39607326495	.02003418970
		CR	-.041881059000	.065815157775	1.000	-.24438568691	.16062356891
		SN	-.030099655278	.067618646700	1.000	-.23815338260	.17795407205
	CP	SP	-.213664449778	.067618646700	.039	-.42171817710	-.00561072245
		SR	-.124275177556	.069375267711	1.000	-.33773379786	.08918344275
		CN	.188019537622	.067618646700	.113	-.02003418970	.39607326495
		CR	.146138478622	.067618646700	.530	-.06191524870	.35419220595
		SN	-.176238133900	.065815157775	.148	-.37874276181	.02626649401
	CR	SP	-.359802928400	.065815157775	.000	-.56230755631	-.15729830049
		SR	-.270413656178	.067618646700	.003	-.47846738350	-.06235992885
		CN	.041881059000	.065815157775	1.000	-.16062356891	.24438568691
		CP	-.146138478622	.067618646700	.530	-.35419220595	.06191524870
		SN	-.269119648200	.091183526860	.071	-.54967942808	.01144013168

		SR	-.178690202900	.093682168303	.930	-.46693797553	.10955756973
		CN	-.045937973400	.091183526860	1.000	-.32649775328	.23462180648
		CP	.148750098544	.093682168303	1.000	-.13949767408	.43699787117
		CR	-.167055017300	.091183526860	1.000	-.44761479718	.11350476258
	SP	SN	.269119648200	.091183526860	.071	-.01144013168	.54967942808
		SR	.090429445300	.093682168303	1.000	-.19781832733	.37867721793
		CN	.223181674800	.091183526860	.267	-.05737810508	.50374145468
		CP	.417869746744 ⁺	.093682168303	.001	.12962197412	.70611751937
		CR	.102064630900	.091183526860	1.000	-.17849514898	.38262441078
	SR	SN	.178690202900	.093682168303	.930	-.10955756973	.46693797553
		SP	-.090429445300	.093682168303	1.000	-.37867721793	.19781832733
		CN	.132752229500	.093682168303	1.000	-.15549554313	.42100000213
		CP	.327440301444 ⁺	.096115876655	.019	.03170432669	.62317627620
		CR	.011635185600	.093682168303	1.000	-.27661258703	.29988295823
	CN	SN	.045937973400	.091183526860	1.000	-.23462180648	.32649775328
		SP	-.223181674800	.091183526860	.267	-.50374145468	.05737810508
		SR	-.132752229500	.093682168303	1.000	-.42100000213	.15549554313
		CP	.194688071944	.093682168303	.640	-.09355970068	.48293584457
		CR	-.121117043900	.091183526860	1.000	-.40167682378	.15944273598
	CP	SN	-.148750098544	.093682168303	1.000	-.43699787117	.13949767408
		SP	-.417869746744 ⁺	.093682168303	.001	-.70611751937	-.12962197412
		SR	-.327440301444 ⁺	.096115876655	.019	-.62317627620	-.03170432669
		CN	-.194688071944	.093682168303	.640	-.48293584457	.09355970068
		CR	-.315805115844 ⁺	.093682168303	.021	-.60405288847	-.02755734322
	CR	SN	.167055017300	.091183526860	1.000	-.11350476258	.44761479718
		SP	-.102064630900	.091183526860	1.000	-.38262441078	.17849514898
		SR	-.011635185600	.093682168303	1.000	-.29988295823	.27661258703
		CN	.121117043900	.091183526860	1.000	-.15944273598	.40167682378
		CP	.315805115844 ⁺	.093682168303	.021	.02755734322	.60405288847
M290T112	SN	SP	-.032992273000	.090743468263	1.000	-.31219805016	.24621350416
		SR	.052834532067	.093230051073	1.000	-.23402213501	.33969119914
		CN	-.215746731500	.090743468263	.317	-.49495250866	.06345904566
		CP	-.334297568156 ⁺	.093230051073	.011	-.62115423523	-.04744090108
		CR	-.103955044600	.090743468263	1.000	-.38316082176	.17525073256
	SP	SN	.032992273000	.090743468263	1.000	-.24621350416	.31219805016
		SR	.085826805067	.093230051073	1.000	-.20102986201	.37268347214
		CN	-.182754458500	.090743468263	.738	-.46196023566	.09645131866
		CP	-.301305295156 ⁺	.093230051073	.032	-.58816196223	-.01444862808
		CR	-.070962771600	.090743468263	1.000	-.35016854876	.20824300556

	SR	SN	-.052834532067	.093230051073	1.000	-.33969119914	.23402213501
		SP	-.085826805067	.093230051073	1.000	-.37268347214	.20102986201
		CN	-.268581263567	.093230051073	.086	-.55543793064	.01827540351
		CP	-.387132100222	.095652014165	.003	-.68144083079	-.09282336965
		CR	-.156789576667	.093230051073	1.000	-.44364624374	.13006709041
	CN	SN	.215746731500	.090743468263	.317	-.06345904566	.49495250866
		SP	.182754458500	.090743468263	.738	-.09645131866	.46196023566
		SR	.268581263567	.093230051073	.086	-.01827540351	.55543793064
		CP	-.118550836656	.093230051073	1.000	-.40540750373	.16830583042
		CR	.111791686900	.090743468263	1.000	-.16741409026	.39099746406
	CP	SN	.334297568156	.093230051073	.011	.04744090108	.62115423523
		SP	.301305295156	.093230051073	.032	.01444862808	.58816196223
		SR	.387132100222	.095652014165	.003	.09282336965	.68144083079
		CN	.118550836656	.093230051073	1.000	-.16830583042	.40540750373
		CR	.230342523556	.093230051073	.252	-.05651414352	.51719919063
	CR	SN	.103955044600	.090743468263	1.000	-.17525073256	.38316082176
		SP	.070962771600	.090743468263	1.000	-.20824300556	.35016854876
		SR	.156789576667	.093230051073	1.000	-.13006709041	.44364624374
		CN	-.111791686900	.090743468263	1.000	-.39099746406	.16741409026
		CP	-.230342523556	.093230051073	.252	-.51719919063	.05651414352
M441T365	SN	SP	-.163711547800	.097112568284	1.000	-.46251421227	.13509111667
		SR	-.181919505467	.099773679299	1.000	-.48891006030	.12507104936
		CN	.273302148300	.097112568284	.103	-.02550051617	.57210481277
		CP	.014857589978	.099773679299	1.000	-.29213296485	.32184814481
		CR	.268802581600	.097112568284	.117	-.03000008287	.56760524607
	SP	SN	.163711547800	.097112568284	1.000	-.13509111667	.46251421227
		SR	-.018207957667	.099773679299	1.000	-.32519851250	.28878259716
		CN	.437013696100	.097112568284	.001	.13821103163	.73581636057
		CP	.178569137778	.099773679299	1.000	-.12842141705	.48555969261
		CR	.432514129400	.097112568284	.001	.13371146493	.73131679387
	SR	SN	.181919505467	.099773679299	1.000	-.12507104936	.48891006030
		SP	.018207957667	.099773679299	1.000	-.28878259716	.32519851250
		CN	.455221653767	.099773679299	.000	.14823109894	.76221220860
		CP	.196777095444	.102365635069	.901	-.11818856811	.51174275899
		CR	.450722087067	.099773679299	.001	.14373153224	.75771264190
	CN	SN	-.273302148300	.097112568284	.103	-.57210481277	.02550051617
		SP	-.437013696100	.097112568284	.001	-.73581636057	-.13821103163
		SR	-.455221653767	.099773679299	.000	-.76221220860	-.14823109894
		CP	-.258444558322	.099773679299	.186	-.56543511315	.04854599651

M526T60	CP	CR	-.004499566700	.097112568284	1.000	-.30330223117	.29430309777
		SN	-.014857589978	.099773679299	1.000	-.32184814481	.29213296485
		SP	-.178569137778	.099773679299	1.000	-.48555969261	.12842141705
		SR	-.196777095444	.102365635069	.901	-.51174275899	.11818856811
		CN	.258444558322	.099773679299	.186	-.04854599651	.56543511315
	CR	CR	.253944991622	.099773679299	.209	-.05304556321	.56093554645
		SN	-.268802581600	.097112568284	.117	-.56760524607	.03000008287
		SP	-.432514129400 [*]	.097112568284	.001	-.73131679387	-.13371146493
		SR	-.450722087067 [*]	.099773679299	.001	-.75771264190	-.14373153224
		CN	.004499566700	.097112568284	1.000	-.29430309777	.30330223117
	SN	CP	-.253944991622	.099773679299	.209	-.56093554645	.05304556321
		SP	-.091761061600	.093612198752	1.000	-.37979354708	.19627142388
		SR	-.060054720222	.096177391473	1.000	-.35597996802	.23587052757
		CN	-.947744437900 [*]	.093612198752	.000	-1.23577692338	-.65971195242
		CP	-.451981884889 [*]	.096177391473	.000	-.74790713269	-.15605663709
	SP	CR	-.870518248900 [*]	.093612198752	.000	-1.15855073438	-.58248576342
		SN	.091761061600	.093612198752	1.000	-.19627142388	.37979354708
		SR	.031706341378	.096177391473	1.000	-.26421890642	.32763158917
		CN	-.855983376300 [*]	.093612198752	.000	-1.14401586178	-.56795089082
		CP	-.360220823289 [*]	.096177391473	.007	-.65614607109	-.06429557549
	SR	CR	-.778757187300 [*]	.093612198752	.000	-1.06678967278	-.49072470182
		SN	.060054720222	.096177391473	1.000	-.23587052757	.35597996802
		SP	-.031706341378	.096177391473	1.000	-.32763158917	.26421890642
		CN	-.887689717678 [*]	.096177391473	.000	-1.18361496547	-.59176446988
		CP	-.391927164667 [*]	.098675921611	.003	-.69554006274	-.08831426659
	CN	CR	-.810463528678 [*]	.096177391473	.000	-1.10638877647	-.51453828088
		SN	.947744437900 [*]	.093612198752	.000	.65971195242	1.23577692338
		SP	.855983376300 [*]	.093612198752	.000	.56795089082	1.14401586178
		SR	.887689717678 [*]	.096177391473	.000	.59176446988	1.18361496547
		CP	.495762553011 [*]	.096177391473	.000	.19983730521	.79168780081
	CP	CR	.077226189000	.093612198752	1.000	-.21080629648	.36525867448
		SN	.451981884889 [*]	.096177391473	.000	.15605663709	.74790713269
		SP	.360220823289 [*]	.096177391473	.007	.06429557549	.65614607109
		SR	.391927164667 [*]	.098675921611	.003	.08831426659	.69554006274
		CN	-.495762553011 [*]	.096177391473	.000	-.79168780081	-.19983730521
	CR	CR	-.418536364011 [*]	.096177391473	.001	-.71446161181	-.12261111621
		SN	.870518248900 [*]	.093612198752	.000	.58248576342	1.15855073438
		SP	.778757187300 [*]	.093612198752	.000	.49072470182	1.06678967278
		SR	.810463528678 [*]	.096177391473	.000	.51453828088	1.10638877647

		CN	-.077226189000	.093612198752	1.000	-.36525867448	.21080629648
		CP	.418536364011*	.096177391473	.001	.12261111621	.71446161181
M556T62	SN	SP	-.068888486900	.127905635107	1.000	-.46243738841	.32466041461
		SR	-.022243512967	.131410548019	1.000	-.42657657285	.38208954692
		CN	-	.127905635107	.000	-1.62921755741	-.84211975439
			1.235668655900*				
		CP	-.642684593633*	.131410548019	.000	-1.04701765352	-.23835153375
		CR	-	.127905635107	.000	-1.54977965791	-.76268185489
			1.156230756400*				
		SP					
		SN	.068888486900	.127905635107	1.000	-.32466041461	.46243738841
		SR	.046644973933	.131410548019	1.000	-.35768808595	.45097803382
	SR	CN	-	.127905635107	.000	-1.56032907051	-.77323126749
			1.166780169000*				
		CP	-.573796106733*	.131410548019	.001	-.97812916662	-.16946304685
		CR	-	.127905635107	.000	-1.48089117101	-.69379336799
			1.087342269500*				
		SN	.022243512967	.131410548019	1.000	-.38208954692	.42657657285
		SP	-.046644973933	.131410548019	1.000	-.45097803382	.35768808595
		CN	-	.131410548019	.000	-1.61775820282	-.80909208305
			1.213425142933*				
		CP	-.620441080667*	.134824377503	.000	-1.03527804714	-.20560411420
	CN	CR	-	.131410548019	.000	-1.53832030332	-.72965418355
			1.133987243433*				
		SN	1.235668655900*	.127905635107	.000	.84211975439	1.62921755741
		SP	1.166780169000*	.127905635107	.000	.77323126749	1.56032907051
		SR	1.213425142933*	.131410548019	.000	.80909208305	1.61775820282
		CP	.592984062267*	.131410548019	.001	.18865100238	.99731712215
		CR	.079437899500	.127905635107	1.000	-.31411100201	.47298680101
		CP					
		SN	.642684593633*	.131410548019	.000	.23835153375	1.04701765352
		SP	.573796106733*	.131410548019	.001	.16946304685	.97812916662
	CP	SR	.620441080667*	.134824377503	.000	.20560411420	1.03527804714
		CN	-.592984062267*	.131410548019	.001	-.99731712215	-.18865100238
		CR	-.513546162767*	.131410548019	.004	-.91787922265	-.10921310288
		SN	1.156230756400*	.127905635107	.000	.76268185489	1.54977965791
		SP	1.087342269500*	.127905635107	.000	.69379336799	1.48089117101
		SR	1.133987243433*	.131410548019	.000	.72965418355	1.53832030332
		CN	-.079437899500	.127905635107	1.000	-.47298680101	.31411100201
		CP	.513546162767*	.131410548019	.004	.10921310288	.91787922265

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

9.11 Atividades Curriculares do aluno, retirado do sistema JANUS da USP (05/04/2013)

9141 - 7493682/1 - Lucas André Lobo Gomes

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5802-2/5	Tópicos Avançados em Toxicologia I	15/03/2011	27/06/2011	30	2	95	A	N	Concluída
FBC5803-1/3	Sistemas da Garantia da Qualidade em Laboratórios Analíticos	11/04/2011	24/04/2011	30	0	0	R	N	Concluída
FBC5814-5/1	Toxicologia Aplicada aos Alimentos	25/04/2011	18/05/2011	75	0	0	-	N	Turma cancelada
FBC5746-2/3	Comprometimento do Sistema Imunológico nas Intoxicações	23/05/2011	03/07/2011	60	4	80	B	N	Concluída
FBC5752-2/3	Danos em Biomoléculas e o seu Papel no Monitoramento da Exposição a Agentes Tóxicos	27/05/2011	01/07/2011	45	3	100	A	N	Concluída
FBC5803-1/4	Sistemas da Garantia da Qualidade em Laboratórios Analíticos	09/08/2011	22/08/2011	30	0	0	-	N	Matrícula cancelada
QFL5707-6/1	Técnicas Analíticas de Separação. Parte II. Eletroforese Capilar (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	11/08/2011	21/09/2011	90	6	100	A	N	Concluída
EDM5791-5/7	Metodologia do Ensino Superior (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	23/08/2011	14/11/2011	120	8	83,3	A	N	Concluída
FBA5728-3/3	Aprimoramento Didático	12/09/2011	09/10/2011	60	4	75	A	N	Concluída
FBC5800-4/1	Temas Avançados em Ciências e Tecnologia Farmacêutica I	17/10/2011	23/10/2011	30	2	90	A	N	Concluída
FBC5803-2/1	Sistemas da Garantia da Qualidade em Laboratórios Analíticos	05/03/2012	18/03/2012	30	2	100	A	N	Concluída
QFL5949-1/1	Introdução a Metabolômica (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	30/03/2012	07/06/2012	120	8	100	B	N	Concluída
FBC5748-3/3	Trabalhos Científicos: da Elaboração à Publicação	24/04/2012	05/06/2012	60	0	0	-	N	Pré-matrícula indeferida

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	10	25	39
Estágios:			
Total:	10	25	39

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Lucas André Lobo Gomes