

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**ABORDAGEM METABOLÔMICA PARA A
CARACTERIZAÇÃO DE DIFERENTES TIPOS DE
DOENÇAS HEPÁTICAS COLESTÁTICAS**

Juliana Magalhães de Oliveira*

Tese apresentada como parte dos requisitos para
obtenção do título de DOUTOR EM
CIÊNCIAS, área de concentração: QUÍMICA.

Orientador: Prof. Dra. Regina Vincenzi Oliveira
Coorientadores: Prof. Dr. Eduardo Luiz Rachid Cançado
Prof. Dr. Antonio Gilberto Ferreira

*** bolsista FAPESP (2019/15040-4 e 2022/01102-0)**

São Carlos - SP
2024



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado da candidata Juliana Magalhães de Oliveira, realizada em 23/04/2024.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Antonio Gilberto Ferreira (UFSCar)

Profa. Dra. Marina Franco Maggi Tavares (USP)

Profa. Dra. Andreia de Melo Porcari (USF)

Prof. Dr. Guilherme Grossi Lopes Cançado (HPM)

Profa. Dra. Karin Argenti Simon (UNIFESP)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Química.

Dedico esta tese de doutorado a Deus,
à minha mãe, Zélia Magalhães e
às minhas irmãs Joice e Mariane

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter guiado e iluminado meu caminho, por eu ser uma pessoa tão feliz e abençoada, e por ter me dado a oportunidade de explorar e conhecer um pouco mais sobre o mundo.

Gostaria de expressar minha gratidão à minha família, especialmente a minha mãe, que sempre me ensinou que a maior riqueza da vida é o conhecimento. Agradeço também às minhas irmãs, Mariane e Joice, cujo constante estímulo e apoio têm sido fundamentais em minhas escolhas, e por serem minhas melhores amigas. Aos meus cunhados, William e Ney, que se tornaram verdadeiros irmãos para mim, pela amizade e pelas risadas compartilhadas. Gostaria de agradecer a toda a minha família, tios e primos tão queridos pelo imenso carinho.

Agradeço imensamente à Profa. Regina Vincenzi Oliveira pela orientação, pela amizade, e pela oportunidade de crescimento profissional que me proporcionou.

Agradeço ao Dr. Eduardo Luiz R. Cançado, da Faculdade de Medicina da USP de São Paulo, por ter confiado e aceitado participar desse projeto, além de ter cedido as amostras dos pacientes.

Agradeço aos integrantes do grupo *Separare* e a todos os colegas que contribuíram para o meu doutorado, especialmente, Hans Zamora (Unicamp), Étore de F. Signini e Alex Castro, muito obrigada pelas conversas e discussões sobre tudo que envolve a metabolômica.

Agradeço ao Dr. Stefan Kempa, da Max-Delbrück-Centrum für Molekulare (MDC), Berlim DE, por ter me acolhido em seu grupo de pesquisa e por proporcionar a oportunidade de ampliar meus conhecimentos na área da metabolômica.

Agradeço à Dra Sabrina Geisberger, ao Dr Guido Mastrobuoni e ao Dr Martin Forbes por me orientarem durante o período dispendido no MDC. Agradeço a paciência e por compartilharem seu vasto conhecimento comigo.

Agradeço ao grupo de laboratório mais animado de Berlim, composto por Sheila, Nicole, Sabrina, Jierong e Yiming. Meu sincero agradecimento pela amizade, pelas nossas conversas, confidências, pelos nossos passeios por Berlim e risadas compartilhadas.

Agradeço ao Diogo Borges pelo companheirismo, carinho, pelas viagens incríveis e por me apoiar em um dos momentos mais importantes da minha carreira.

Meus agradecimentos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de Doutorado (2019/15040-4), Bolsa de Estágio de Pesquisa no Exterior - BEPE (2022/01102-0) e pelos financiamentos em pesquisa: 2016/22215-7; 2020/05965-8 e 2014/50299-5.

Agradeço também ao apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior – Brasil (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

*“A Lei do Eterno é Perfeita e Reconforta a
Alma; Verdadeiro é o Testemunho do Eterno,
que torna Sábio o Mais Simples”.*
Salmo (19:8)

LISTA DE ABREVIATURAS

10-OH-DDC	10-hidroxi-dodecanoilcarnitina
1-mA	1-metiladenosine
13-HpODE	ácido 13-hidroperoxilinoico
2,3-DMHG	ácido 2,3-dimetil-3-hidroxi-glutarico
2-A3M1B	2-amino-3-metil-1-butanol
2-Oct-DA	ácido 2-octenodiolico
2-ODA	ácido 2-octenediolico
2-OMe-4-MTBA	ácido 2-oxo-4-metil-tiobutanico
3-HAL	ácido 3-hidroxiadipico 3,6-lactona
3-HHA	ácido 3-hidroxi-hexanoico
3-HIVA	ácido 3-hidroxi-isovalerico
3-HD-DCAR	3-hidroxi-deca-6,8-dienoilcarnitina
3-HMG	3-hidroxi-metilglutarato
3-HMGA	ácido 3-hidroxi-2-metilglutarico
3-HOHA	ácido 3-hidroxi-hipurico
3-MeH	3-metilhistamina
3-OHB	ácido 3-hidroxi-butirico
4-HOHA	ácido 4-hidroxi-hipurico
4-MeO-BzPro	propanoato de 4-metoxibenzila
4-Oct-CAR	4-octenoilcarnitina
4-HBGluc	4-hidroxi-benzoilglicose
4-HPPA	ácido 4-hidroxi-fenilpiruvico
4-Hyp	4-hidroxi-proline
4-MeO-BzPro	propanoato de 4-metoxibenzoila
5-AVA	5-aminovalerato
5-CAT	5 β -colano-3 α ,7 α ,12 α ,24-tetrol
5-HD3EC	5-hidroxi-dec-3-enoilcarnitina
5-HVA	5-hidroxi-valerato
6-HNAM	6-hidroxi-nicotinamida
AASLD	American Association for the Study of Liver Disease
APPA	ácido 2(-amino-3-1-pirazolil)propanico
Asp-Hyp	aspartil-hidroxi-proline
AcA	aconitato
ACN	acetoni-trila

ALT	alanina aminotransferase
Allyl-Cys	alilcisteína
Allys	alisina
AMA	anticorpo antimitocôndrial
ANA	anticorpo antinuclear
ANCOVA	análise de covariância
ANOVA	análise de variância
APPA	ácido 2-amino-3-(1-pirazolil)propanóico
AUC	area under the curve
ALP	fosfatase alcalina
BAs	ácidos biliares
BET	betaína
BIL	bilirrubina
Butyl-Cys-SO	sulfóxido de butilcisteína
CA	ácido cólico
Car	carnitina
CBP	Colangite Biliar Primária
CDCA	ácido quenodesoxicólico
CEP	Colangite Esclerosante Primária
C12:1-DCAR	dodecenoylcarnitina
C13:1-DC	tridec-6-enedioilcarnitina
C6-DCAR	o-Adipoylcarnitine
CHD	1,2-ciclohexanodiol
Chol	colina
Cys	cisteína
Cit	citraconato
CRE	creatinina
CS	controle saudável
CV	controle de variação
DAB	2,4-diaminobutirato
DCA	ácido desoxicólico
DDA	data-dependent acquisition
DHCA	ácido 3,7-di-hidroxicolan-24-oico
DHEA-S	sulfato de dehidroepiandrosterona
DH-CDCA	ácido desidroquenodeoxicólico
DII	Doença Inflamatória Intestinal
DMH-CAR	2,6-dimetilheptanoil carnitina

DMTPA	ácido 2,3-di-hidroxi-5-metiltio-4-pentenóico
DPPC	2,3-dipalmitoil-glicerilcisteína
E2	estradiol
EASL	European Association for the Study of the Liver
ESI	Ionização por Electrospray
Ery	eritrose
FC	fold-change
FXR	Receptor X farnesoide
Gal	galactose
GC	Cromatografia Gasosa
GCA	ácido glicocólico
GCA 3-glicuronídeo	ácido glicocólico 3-glicuronídeo
GCDCA 3-glucuronide	ácido glicoquenodesoxicólico 3-glicuronídeo
GCDCA 3-sulfato	ácido glicoquenodesoxicólico 3-sulfato
GDCA	ácido glicodesoxicólico
GGT	γ -glutamyltranspeptidase
GLCA	ácido glicolitocólico
GLCA 3-sulfato	Ácido glicolitocólico 3-sulfato
GlcA-S	Ácido glicurônico sulfatado
GlcGal-Hyl	glucosilgalactosil hidroxilisina
GlcNAc	N-acetilglicosamina
Glc	glicose
Gln	glutamina
Glu	ácido glutâmico
Glu-Gly	gamma-glutamylglicina
Glu-Phe	gamma-glutamylfenilalanina
GlyA	ácido glioxílico
Gly-Pro	glicilprolina
HAI	Hepatite Autoimune
HCA	ácido colênico
HCAR	hexanoilcarnitina
Hexa-2,4-DCAR	hexa-2,4-dienedioilcarnitina
Hepta-DCAR	hepta-2,4-dienoilcarnitina
HILIC	Cromatografia Líquida de Interação Hidrofílica
HIPA	hipurato
His	histidina
His-Gly	histidilglicina

HMDB	Human Metabolome Database
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IL-8	Interleucina-8
IL-13	Interleucina-13
Ita	itaconato
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome
Lac	ácido láctico
Leu	leucina
LCAR	linoleil carnitina
LC-HRMS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa de alta resolução
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa
LOESS	Locally Estimated Scatterplot Smoothing
LOOCV	leave one out cross-validation
LPA	ácido lisofosfatídico
LPAC	Colelitíase Associada a Baixos níveis de Fosfolipídios
LPC	lisofosfatidilcolina
LPE	lisofosfatidiletanolamina
m1G	1,7-dimetilguanosina
MDR3	Proteína de Resistência a Múltiplos Fármacos 3
MEOH	metanol
Met-SO	sulfóxido de metionina
MVA	ácido mevalônico
MS1	Espectrometria de Massas 1
MS2	Espectrometria de massas em tandem
<i>m/z</i>	razão entre a massa (<i>m</i>) e a carga (<i>z</i>) de um íon
NAC	N-acetilcarnitina
N-Ac-Glu	N-acetil-glutamato
NAClys	N-alfa-acetilisina
NACVal	N-acetilvalina
Neo-Glu	neomenthol-glucuronide
N-EPA-Asp	N-eicosapentaenoil aspartato
N-EPA-Leu	N-eicosapentaenoil leucine
N-Lin-Tau	N-linoleoil taurina
N-Me-β-Ala	N-metil-beta-alanina
Nona-2,4,6-DCAR	nona-2,4,6-trienoilcarnitina
OCA	ácido obeticólico

PC	fosfatidilcolina
PCA	Análise de Componentes Principais
PCAR	propionilcarnitina
p-CS	sulfato de p-cresol
PFIC	Colestase Intra-hepática Familiar Progressiva
Phe	fenilalanina
PheAcGln	fenilacetilglutamina
PI	fosfatidilinositol
PipA	ácido pipecólico
PLS-DA	Análise Discriminante de Mínimos Quadrados Parciais
POA	ácido palmitoléico
PPAR α	Peroxisome proliferator-activated receptor alpha
PQN	Normalização pelo Quociente Probabilístico
Pro	prolina
QB	Qualidade do Branco
QC	Controle de qualidade
QC-RLSC	<i>Quality Control–Based Robust LOESS signal correction</i>
QqTOF	Quadrupolo de Tempo de Voo
RPLC	Cromatografia Líquida de Fase Reversa
Rpm	Rotações por minuto
S1P	esfingosina 1-fosfato (d16:1-P)
SH7P	sedoheptulose 7-fosfato
SM	esfingomielinas
Ser	serina
SubA	suberato
SucAdo	succiniladenosina
TCA	ácido taurocólico
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TDCA	ácido taurodesoxicólico
THFDA	ácido tetrahydro-2,5-furano-diacético
THHA	ácido 9,10,16-triidroxihexadecanoico
TMA	2,2,6,6-tetrametil-4-piperidinol
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
tR	tempo de retenção
Trp	triptofano 2-C-manosídeo
Tyr	tirosina
Tyr-SO ₃ H	o-sulfotyrosine

UA	urocanato
UDCA	ácido ursodesoxicólico
Urd	uridina
Val	valina
VIP	Importância Variável na Projeção
β -Gal	β -galactosil

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Investigação Metabolômica Untargeted da Colangite Biliar Primária por LC-HRMS

TABELA 4.1 Modelos de previsão a partir da regressão logística e análise de curva ROC dos metabólitos individuais em amostras de plasma e urina (AUC) $\geq 0,907$.	68
TABELA 4.2 Resumo da regulação de fosfatidilcolina (PC), lisofosfatidilcolina (LPC) e lisofosfatidiletanolamina (LPE) em amostras de plasma de pacientes com CBP e grupo CS.	73
TABELA 4.3 Resumo da regulação de aminoácidos, ácidos biliares, carnitinas, ácidos graxos, esteróides e nucleotídeos em amostras de plasma de indivíduos com CBP.	77
TABELA 4.4 Resumo da regulação de aminoácidos, ácidos biliares, carnitinas, ácidos graxos, nucleotídeos e esteróides em amostras de urina de indivíduos com CBP.	83

CAPÍTULO II

Estratégias de Metabolômica Untargeted para a Classificação de Colestase Intra-hepática Familiar tipo 3 (PFIC3), Colangite Biliar Primária (CBP) e Colangite Esclerosante Primária (CEP)

TABELA 6.1 Tabela <i>heatmap</i> contendo os metabólitos significativos entre os tipos de colestase (CBP, CEP ou PFIC3) com amostras do grupo controle (CS) por ANOVA <i>post-hoc</i> de Tukey ($p \leq 0.05$).	96
TABELA 6.2 Tabela <i>heatmap</i> contendo os metabólitos significativos, entre os tipos de colestase (CBP, CEP ou PFIC3) por ANOVA <i>post-hoc</i> de Tukey ($p \leq 0.05$).	105
TABELA 6.3 Tabela <i>heatmap</i> contendo os metabólitos significativos, comparando-se a PFIC3 com CBP e CEP por ANOVA <i>post-hoc</i> de Tukey ($p \leq 0.05$).	109
TABELA 6.4 Tabela <i>heatmap</i> contendo os metabólitos significativos, comparando CEP com CBP e PFIC3 por ANOVA <i>post-hoc</i> de Tukey ($p \leq 0.05$).	113

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 Representação esquemática da eluição de analitos no modo reverso de eluição, ilustrando a interação seletiva de moléculas com diferentes polaridades com a fase estacionária hidrofóbica (adaptado de GENTILUOMO et al., 2019).
..... 35

FIGURA 1.2 Representação esquemática de um espectrômetro de massas de alta resolução híbrido com analisador *quadrupole time-of-flight* (QqTOF) (adaptado de STRASSER et al., 2023) 38

CAPÍTULO I

Investigação Metabolômica Untargeted da Colangite Biliar Primária por LC-HRMS

FIGURA 4.1 Cromatogramas de íons totais (TIC) das amostras de urina obtidos por LC-HRMS. **(A)** Amostras de voluntários dos grupos CS (■) e CBP (■) analisadas no modo RPLC ESI (+). **(B)** Amostras de urina dos grupos CS (■) e CBP (■) analisadas no modo HILIC ESI (+). 60

FIGURA 4.2 Espectros dos íons totais deconvoluídos das amostras de plasma obtidas pelas análises LC-HRMS. **(A)** RPLC (ESI +); **(B)** RPLC (ESI -); **(C)** HILIC (ESI +); **(D)** HILIC (ESI -). 61

FIGURA 4.3 Espectros dos íons totais deconvoluídos das amostras de urina obtidas pelas análises LC-HRMS. **(A)** RPLC (ESI +); **(B)** RPLC (ESI -); **(C)** HILIC (ESI +); **(D)** HILIC (ESI -). 62

FIGURA 4.4 Representação da identificação do ácido glicoquenodeoxicólico (GCDCA) em amostras de plasma, através da comparação entre o espectro experimental obtido nas análises LC-HRMS e o espectro de massas teórico disponível nas bibliotecas online. 63

FIGURA 4.5 Análise multivariada de metabolômica *untargeted* usando PLS-DA para amostras de plasma. **(A)** Histograma do resultado dos testes de permutação. **(B)** Gráficos de barras das medidas de desempenho (precisão, R² e Q²), com diferentes números de componentes. *Indica os melhores valores das medidas de desempenho que foram selecionadas (Q²). Parâmetros da modelagem para amostras de plasma, Q² = 0,887, R²_Y = 0,905, R²_X = 0,979 (cum) e $p \leq 0,001$.
..... 64

FIGURA 4.6 Análise multivariada de metabolômica *untargeted* usando PLS-DA para amostras de urina. **(A)** Histograma do resultado dos testes de permutação. **(B)** Gráficos de barras das medidas de desempenho (precisão, R² e Q²) usando diferentes números de componentes. *Indica os melhores valores das medidas de desempenho que foram selecionadas (Q²). Parâmetros de modelagem para

amostras de urina, $Q^2 = 0,709$, $R^2Y = 0,757$, $R^2(\text{cum}) = 0,943$ (cum), $Q^2(\text{cum}) = 0,693$ e $p \leq 0,001$ 64

FIGURA 4.7 Gráficos de dispersão de *scores* com base nos modelos PLS-DA da análise multivariada e nos modos de ionização ESI(+) e ESI(-) obtidas das análises LC-HRMS/MS. **(A)** Amostras de plasma (n=50) entre os grupos CBP e CS; **(B)** Amostras de urina (n=50) entre os grupos CBP e CS. Grupo CBP (■) e o grupo CS (■)..... 65

FIGURA 4.8 VIP *scores* obtidos a partir do modelo PLS-DA provenientes das análises das amostras de plasma. As caixas coloridas indicam se a concentração do metabólito está aumentada (■) ou diminuída (■) em comparação ao grupo CS. 66

FIGURA 4.9 VIP *scores* obtidos a partir do modelo PLS-DA provenientes das análises das amostras de urina. As caixas coloridas indicam se a concentração do metabólito presente no grupo CBP está aumentada (■) ou diminuída (■) em comparação ao grupo CS..... 66

FIGURA 4.10 Curvas ROC pelo método estatístico multivariado no ponto de corte ideal definido pela distância mínima para o canto superior esquerdo. **(A)** Modelo otimizado gerou AUC de 0,999 (IC 95%: 0,993–1) a partir de amostras de plasma. **(B)** Modelo otimizado gerou AUC de 0,979 (IC 95%: 0,952–1) a partir de amostras de urina. 68

FIGURA 4.11 Matrizes de correlação baseadas nos metabólitos $VIPs \geq 1$. Correlações negativas entre os metabólitos são exibidas em ■ e correlações positivas em ■. A intensidade da cor é proporcional ao coeficiente de correlação, sendo mais forte quanto mais próximo de -1 ou 1.

(A) Tabela de correlação referente aos metabólitos VIP *scores* do plasma LPC: lisofosfatidilcolina; PC: fosfatidilcolina; GCDCA: ácido glicoquenodeoxicólico; GDCA: ácido glicodeoxicólico; DHEA-S: sulfato de dehidroepiandrosterona; PsiU: pseudouridina; N-AC: N-acetilcarnitina; LaCA: ácido láctico; His: Histidina; Glu-Ser: Glutamilsarina; Asp-HyP: Aspartil-hidroxiprolina; Allyl-Cys: Allyl-cisteína.

(B) Tabela de correlação relacionados aos metabólitos VIP *scores* da urina: ácido glicolítico; GCDCA 3-sulfate: ácido glicoquenodesoxicólico 3-glicuronídeo; GDCA: ácido glicodeoxicólico; GCDCA: ácido glicoquenodesoxicólico; DCA: ácido desoxicólico; CAR: carnitina; C22:3: Docosatrienoato; 9-Dec-CAR: 9-decenoilcarnitina; 6-Keto-CAR: 6-ceto-decanoilcarnitina; 5beta-CS: 5beta-ciprinolsulfato; 3-CMPFP: ácido 3-carboxi-4-metil-5-pentil-2-furanpropanóico 69

FIGURA 4.12 Mapeamento das vias metabólicas impactadas entre os grupos CBP quando comparado a CS em amostras de plasma. O eixo x representa o impacto

da via metabólica, enquanto o eixo y representa o $-\log(p\text{-value})$. A cor varia de amarelo claro a vermelho escuro, indicando o nível de significância do enriquecimento, e o tamanho do círculo reflete o nível da taxa de enriquecimento.

..... 70

FIGURA 4.13 Boxplots (*box-and-whisker*) para fosfolipídios em amostras de plasma de pacientes com CBP vs. grupo CS. O eixo y representa as intensidades normalizadas dos metabólitos. (A) LPC(18:1); (B) LPC(20:1); (C) LPC(20:5); e (D) LPE(16:1). O boxplot representa a faixa interquartil (IQR), abrangendo a maioria dos dados, enquanto as extremidades (“*whiskers*”) se estendem aos valores extremos. A significância estatística foi avaliada usando o teste de *t*-Student, com um limiar de $p \leq 0,05$ 74

FIGURA 4.14 Boxplots (*box-and-whisker*) para os ácidos biliares glicoconjugados em amostras de plasma dos grupos CBP e CS. O eixo y representa as intensidades normalizadas dos metabólitos. (A) GCDCA; (B) GDCA; (C) GLCA. O boxplot representa a faixa interquartil (IQR), abrangendo a maioria dos dados, enquanto as extremidades (“*whiskers*”) se estendem aos valores extremos. A significância estatística foi avaliada usando o teste *t*-Student, com um limiar de $p \leq 0,05$ 78

FIGURA 4.15 Boxplots (*box-and-whisker*) para aminoácidos em amostras de urina de grupos CBP e CS. O eixo y representa as intensidades normalizadas dos metabólitos. (A) leucina; (B) isoleucina; (C) valina; (D) fenilalanina; (E) trans-aconitato; (F) sulfato de fenol. O boxplot representa a faixa interquartil (IQR), abrangendo a maioria dos dados, enquanto as extremidades (“*whiskers*”) se estendem aos valores extremos. A significância estatística foi avaliada usando o teste *t*-Student, com um limiar de $p \leq 0,05$ 84

CAPÍTULO II

Estratégias de Metabolômica Untargeted para a Classificação de Colestase Intra-hepática Familiar tipo 3 (PFIC3), Colangite Biliar Primária (CBP) e Colangite Esclerosante Primária (CEP)

FIGURA 6.1 Metabólitos putativamente identificados nas análises de plasma por LC-HRMS obtidos nos modos de eluição RPLC e HILIC, à partir de amostras de indivíduos diagnosticados com diferentes tipos de doenças colestáticas (CBP, CEP e PFIC3), bem como do grupo CS. As principais classes de metabólitos identificados são codificadas pelas seguintes cores: Aminoácidos (■); Lipídios (■), Peptídeos (■), Carboidratos (■) e Nucleotídeos (■). 89

FIGURA 6.2 Análise multivariada PLS-DA das amostras de plasma entre os grupos de CBP, CEP, PFIC e CS. (A) Gráfico de dispersão de *scores* PLS-DA de 132 amostras de plasma exibindo a separação entre os grupos CBP (■), CEP (■), PFIC3 (■) e o grupo CS (■); (B) Gráfico de dispersão de *scores* PLS-DA

para os três tipos de colestase: CBP (■), CEP (■) e PFIC3 (■). Análises LC-HRMS, nos modos de ionização ESI(+) e ESI(-). 90

FIGURA 6.3 VIP scores obtidos a partir do modelo PLS-DA provenientes das análises das amostras de plasma. As caixas coloridas indicam se a concentração do metabólito está aumentada (■) ou diminuída (■) em comparação ao grupo CS. 91

FIGURA 6.4 Matriz de correlação baseadas nos metabólitos VIPs ≥ 1 provenientes das amostras de plasma. Correlações negativas entre os metabólitos são exibidas em ■ e correlações positivas em ■. A intensidade da cor é proporcional ao coeficiente de correlação, sendo mais forte quanto mais próximo de -1 ou 1. 94

FIGURA 6.5 Metabólitos putativamente identificados nas análises de urina por LC-HRMS nos modos de eluição RPLC e HILIC, a partir das amostras de indivíduos diagnosticados com diferentes tipos de doenças colestáticas (CBP, CEP e PFIC3), bem como do grupo CS. As principais classes de metabólitos são codificadas pelas seguintes cores: Aminoácidos (■); Lipídios (■), Carboidratos (■), Ácidos orgânicos (■) e Xenobióticos (■). 98

FIGURA 6.6 Análise multivariada PLS-DA das amostras de urina entre os grupos de CBP, CEP, PFIC3 e CS. (A) Gráfico de dispersão de scores PLS-DA de 132 amostras de urina exibindo a separação entre o grupo CBP (■), CEP (■), PFIC3 (■) e o grupo CS (■); (B) Gráfico de dispersão de scores PLS-DA exibindo a separação entre os três tipos de colestase: CBP (■), CEP (■) e PFIC3 (■). Análises LC-HRMS, nos modos de ionização ESI(+) e ESI(-). 99

FIGURA 6.7 P VIP scores obtidos a partir do modelo PLS-DA das análises das amostras de urina. As caixas coloridas indicam se a concentração de metabólitos está aumentada (■) ou diminuída (■).. 100

FIGURA 6.8 Boxplots (*box-and-whisker*) dos potenciais metabólitos discriminantes para CBP (■), em comparação com os grupos CEP (■), PFIC3 (■) e CS (■) em amostras de plasma e urina. O eixo y mostra as intensidades normalizadas dos metabólitos. Em destaque nas amostras de plasma (A) acetilcarnitina; (B) propionilcarnitina; (C) DG(2:0/0:0/PGJ2) e (D) o-sulfotirosina e (E) citraconato nas amostras de urina.

O boxplot representa a faixa interquartil (IQR), abrangendo a maioria dos dados, enquanto as extremidades (“whiskers”) se estendem aos valores extremos. Todos os metabólitos exibidos foram significativamente elevados (como indicado por $p \leq 0,05$ e $q \leq 0,05$) para os grupos CS, PFIC3 e CEP quando comparados a CBP. 106

FIGURA 6.9 Boxplots (*box-and-whisker*) dos potenciais metabólitos discriminantes para PFIC3 (■), em comparação com os grupos CEP (■), CBP (■) e CS (■) em amostras de plasma e urina. O eixo y mostra as intensidades

normalizadas dos metabólitos. Destaque para as amostras de plasma **(A)** GCDCA 3-glicuronídeo; **(B)** GDCA; **(C)** GCA 3-glicuronídeo e para as amostras de urina **(D)** urocanato; **(E)** suberato e **(F)** SM(d16:1/17:0)..... 110

FIGURA 6.10 Boxplots (*box-and-whisker*) dos metabólitos discriminantes para CEP (representados em vermelho), em comparação com os grupos CBP (roxo), PFIC (em azul) e CS (em verde) em amostras de plasma e urina. Em destaque nas amostras de plasma (A) sulfato de p-cresol; (B) tridec-6-enodioilcarnitina; (C) bilirrubina. Em amostras de urina se destacaram os metabólitos (D) hipurato; (E) glucuronato sulfato; (F) 2,3-DMHG (2,3-Dimetil-3-hidroxioglutarato). O eixo y representa as intensidades normalizadas dos metabólitos. A caixa no gráfico representa a faixa interquartil (IQR), abrangendo a maioria dos dados, enquanto as extremidades (“*whiskers*”) se estendem aos valores extremos. A significância estatística foi avaliada utilizando o método ANOVA seguido de teste *post-hoc*, (como indicado por $p < 0,05$ e $q \leq 0,05$) para os grupos CS, PFIC e CBP quando comparados a CEP..... 114

FIGURA 6.11 Representação esquemática do transporte de carnitina no processo de β -oxidação (JONES; BENNETT, 2017). 118

RESUMO

ABORDAGEM METABOLÔMICA PARA A CARACTERIZAÇÃO DE DIFERENTES TIPOS DE DOENÇAS HEPÁTICAS COLESTÁTICAS

A colestase hepática é caracterizada pela redução e/ou obstrução do fluxo biliar para o duodeno, devido a uma disfunção dos hepatócitos durante a síntese ou secreção da bile, levando a um ciclo de consequências patológicas. Um tipo de doença hepática colestática é a Colestase Intra-hepática Familiar Progressiva tipo 3 (PFIC3), sendo essa uma doença hereditária autossômica recessiva que afeta a secreção, fluxo ou excreção de sais biliares no fígado, o que resulta em um aumento da hepatotoxicidade devido às altas concentrações de sais biliares, ocasionando danos hepáticos. O diagnóstico tardio da PFIC3 é comum, pois o diagnóstico ocorre por meio de biópsia hepática, mas só pode ser inequivocamente obtido através de testes genéticos. Portanto, métodos alternativos que permitam um diagnóstico rápido por meio de exames de sangue ou urina são atrativos e necessários. A Colangite Esclerosante Primária (CEP) e a Colangite Biliar Primária (CBP) são doenças hepáticas colestáticas autoimunes desencadeadas por uma predisposição genética. Na CBP, a inflamação ocorre nos ductos biliares intra-hepáticos, enquanto na CEP, ocorre a inflamação nos ductos biliares intra- e extra-hepáticos, o que pode danificar as células do fígado e causar deposição progressiva de fibrose. CEP e CBP senão tratadas podem evoluir para cirrose e insuficiência hepática. No Brasil cerca de 58,6% dos pacientes com CEP apresentam doença intestinal inflamatória e apresentam maior risco de desenvolver câncer colorretal. O Capítulo I teve como objetivo obter uma melhor compreensão dos mecanismos patológicos subjacentes à CBP por meio de análises metabolômicas *untargeted* em amostras de plasma e de urina de indivíduos diagnosticados com CBP (n=30) e de um grupo controle de indivíduos saudáveis (CS; n=20). Para isso, foi empregada a técnica de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas de alta resolução (LC-HRMS) e os dados foram processados usando métodos estatísticos multi- e univariados. Os resultados indicaram 47 metabólitos no plasma e 46 metabólitos na urina que apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre pacientes com CBP e o grupo controle (CS) ($p \leq 0,05$). As alterações mais significativas foram observadas em metabólitos relacionados ao metabolismo de lipídeos, como os ácidos biliares, fosfolipídios, ácidos graxos e aminoácidos de cadeia ramificada. Essas descobertas indicaram um perfil metabolômico que pode auxiliar na identificação de novos e potenciais biomarcadores para o monitoramento da CBP

em pacientes já em tratamento com o ácido ursodeoxicólico (UDCA). O Capítulo II teve como objetivo realizar a classificação entre os diferentes tipos de colestase (CBP, CEP e PFIC3) em amostras de plasma e urina de pacientes em tratamento com UDCA. Utilizando uma abordagem metabolômica *untargeted*, baseada em análises por LC-HRMS, foram identificados 134 metabólitos nas amostras de plasma, dos quais 92 foram considerados estatisticamente significativos ($p \leq 0,05$ e $q \leq 0,05$). Dentre esses, foram detectadas 43 espécies lipídicas (ácidos biliares, glicerofosfolipídios, ácidos graxos e carnitinas), além de 30 aminoácidos e 07 carboidratos. Para as amostras de urina, foram identificados um total de 76 metabólitos, dos quais 50 foram considerados estatisticamente significativos ($p \leq 0,05$ e $q \leq 0,05$). As principais classes de metabólitos discriminantes entre as diferentes colestases hepáticas incluíram lipídios, aminoácidos, carboidratos e ácidos orgânicos. Esses resultados podem auxiliar na distinção entre as diferentes doenças hepáticas colestáticas, contribuindo para a obtenção de diagnósticos mais precisos e promovendo uma medicina personalizada. Dessa forma, a identificação desses metabólitos não apenas aprimora a compreensão das alterações bioquímicas correlacionadas com as doenças hepáticas colestáticas, mas também promove novas oportunidades na busca por tratamentos mais eficazes e individualizados.

ABSTRACT

METABOLOMIC APPROACHES FOR THE CHARACTERIZATION OF DIFFERENT TYPES OF CHOLESTATIC LIVER DISEASES

Hepatic cholestasis is characterized by the reduction and/or obstruction of bile flow to the duodenum due to hepatocyte dysfunction during the synthesis or secretion of bile, leading to a cycle of pathological consequences. One type of cholestatic liver disease is Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis type 3 (PFIC3), a recessive autosomal hereditary disease that affects the liver's secretion, flow, or excretion of bile salts. This can lead to increased hepatotoxicity due to high concentrations of bile salts, causing liver damage. Late diagnosis of PFIC3 is common as it can only be unequivocally diagnosed through genetic tests. Therefore, alternative diagnostic methods that allow rapid diagnosis through blood or urine are attractive and necessary. Primary Sclerosing Cholangitis (PSC) and Primary Biliary Cholangitis (PBC) are autoimmune cholestatic liver diseases triggered by a genetic predisposition. In PBC, inflammation occurs in the intrahepatic bile ducts, while in PSC, inflammation occurs in the intra- and extrahepatic bile ducts, which can damage liver cells and cause progressive fibrosis deposition. PBC and PSC, if not treated, can lead to cirrhosis and liver failure. In Brazil, around 58.6% of patients with PSC have inflammatory bowel disease and are at risk of developing colorectal cancer. Chapter I aimed to understand better the pathological mechanisms underlying PBC through untargeted metabolomics analyses on plasma and urine samples from individuals diagnosed with PBC (n=30) and a control group of healthy individuals (HC; n=20). For this, liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry (LC-HRMS) was used, and the data were processed using multi- and univariate statistical methods. The results showed that 47 plasma metabolites and 46 urine metabolites showed statistically significant differences between PBC and the control group (HC) ($p \leq 0.05$). The most important changes were observed in metabolites related to lipid metabolism, such as bile acids, phospholipids, fatty acids, and branched-chain amino acids. These findings indicated a metabolic profile that may aid in identifying new and potential biomarkers and monitoring PBC already being treated with ursodeoxycholic acid (UDCA). Chapter II aimed to perform metabolic discrimination between the different types of cholestasis (PBC, PSC, and PFIC3) in plasma and urine samples from patients undergoing

treatment with UDCA. Using an untargeted metabolomics approach based on LC-HRMS analyses, 134 plasma metabolites, out of which 92 were statistically significant ($p \leq 0.05$ and $q \leq 0.05$). Among these, 43 lipid species (bile acids, glycerophospholipids, fatty acids, and carnitines) were detected, in addition to 30 amino acids, and 7 carbohydrates. Considering the urine samples, 76 metabolites were identified, of which 50 were considered statistically significant ($p \leq 0.05$ and $q \leq 0.05$). The main classes of metabolites discriminating between the different hepatic cholestasis included lipids, amino acids, carbohydrates, and organic acids. These results can help distinguish between cholestatic liver diseases, contributing to more accurate diagnoses and promoting personalized medicine. In this way, the identification of these metabolites not only improves the understanding of biochemical alterations correlated with cholestatic liver diseases but also promotes new opportunities in the search for more effective and individualized treatments.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	vii
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE FIGURAS	xiv
RESUMO	xix
ABSTRACT	xxi
1 Introdução	23
1.1 Doenças Hepáticas Colestáticas	23
1.1.1 Colestase Intra-Hepática Familiar Progressiva Tipo 3 (PFIC3)	26
1.1.2 Colangite Biliar Primária (CBP)	27
1.1.3 Colangite Esclerosante Primária (CEP)	29
1.2 Abordagens Metabolômicas	31
1.3 Metabolômica <i>Untargeted</i> Baseada em Análises por LC-MS	34
1.3.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)	34
1.3.2 Espectrometria de Massas	36
1.3.3 Considerações Adicionais em Análises Metabolômicas	39
2 Objetivos	42
2.1 Objetivos Específicos	42
3 Materiais e Métodos	43
3.1 Generalidades	43
3.2 Casuística e Coleta de Amostras	43
3.3 Critérios de Inclusão	44
3.3.1 Pacientes Diagnosticados com PFIC3	44
3.3.2 Pacientes Diagnosticados com CBP	44
3.3.3 Pacientes Diagnosticados com CEP	44
3.4 Critérios de Exclusão	45
3.5 Coleta das Amostras	45
3.6 Preparo de Amostras de Plasma e Urina	46
3.6.1 Plasma	46
3.6.2 Urina	46
3.7 Análise por Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrômetro de Massas de Alta Resolução (LC-HRMS)	47

3.7.1	Separação Cromatográfica no Modo Reverso de Eluição (RPLC).	47
3.7.2	Separação Cromatográfica no Modo HILIC de Eluição	48
3.8	Parâmetros para a Aquisição de Dados no sistema LC-HRMS	49
3.9	Processamento de Dados	50
3.9.1	Identificação Putativa dos Metabólitos	52
3.9.2	Normalização dos Dados	52
3.9.2.1	Método de Normalização dos Dados - Amostras de Plasma	52
3.9.2.2	Método de Normalização de Dados para as Amostras de Urina - Pacientes Grupo CBP	53
3.10	Análises Estatísticas	56

CAPÍTULO I

Investigação Metabolômica *Untargeted* da Colangite Biliar Primária por LC-HRMS

4	Resultados e Discussão	60
4.1	Níveis Alterados de Fosfolipídios em Amostras de Plasma de Pacientes com CBP	71
4.2	Níveis Alterados de Ácidos Biliares, Carnitina, Ácidos Graxos e Esteroides em Amostras de Plasma e Urina de Pacientes com CBP	75
5	Conclusões e Limitações do Capítulo I	85

CAPÍTULO II

Estratégias de Metabolômica *Untargeted* para a Classificação de Colestase Intra-hepática Familiar tipo 3 (PFIC3), Colangite Biliar Primária (CBP) e Colangite Esclerosante Primária (CEP)

6	Resultados e Discussão	88
6.1	Perfil Metabólico de Três Doenças Hepáticas Colestáticas (PFIC3, CBP e CEP) Comparadas ao Grupo Controle (CS) em amostras de plasma	88
6.2	Perfil Metabólico de Três Doenças Hepáticas Colestáticas (PFIC3, CBP e CEP) Comparadas ao Grupo Controle (CS) em amostras de urina	97
6.3	Classificação dos três diferentes tipos de Doenças Colestáticas (CBP, CEP e PFIC3)	102
6.3.1	Identificação Putativa de Metabólitos Discriminantes para a CBP em Amostras de Plasma	102
6.3.2	Identificação Putativa de Metabólitos Discriminatórios para a CBP em Amostras de Urina	103

6.4	Identificação Putativa de Metabólitos Discriminatórios para a PFIC3 em plasma.....	107
6.4.1	Identificação Putativa de Metabólitos Discriminatórios para PFIC3 em Amostras de Urina	108
6.4.2	Identificação Putativa de Metabólitos Discriminatórios para a CEP em plasma	111
6.4.3	Identificação de Metabólitos Discriminatórios para CEP em Amostras de Urina	112
6.5	Alterações de Ácidos Biliares em Amostras de Plasma e Urina	115
6.6	Alterações de Carnitinas e Ácidos Graxos nas Amostras de Plasma e Urina.	117
7	Conclusões e Limitações do Capítulo II.....	121
8	Referências Bibliográficas.....	123
APÊNDICE I.....		148
APÊNDICE II.....		157
APÊNDICE III		186

1 Introdução

1.1 Doenças Hepáticas Colestáticas

As doenças colestáticas hepáticas são caracterizadas pela redução e/ou obstrução do fluxo biliar, devido a uma disfunção dos hepatócitos na síntese ou secreção da bile, levando a consequências adversas para o funcionamento hepático (NGUYEN; SUNDARAM; AYOUB, 2014; SHAH; JOHN, 2023). A bile, composta principalmente por ácidos biliares, bilirrubina e fosfolipídios, é transportada pelos ductos biliares, estabelecendo conexões entre o fígado, duodeno, vesícula biliar, pâncreas e intestino delgado (HUNDT; BASIT; JOHN, 2024). Dentre as doenças hepáticas biliares destacam-se a Colestase Intra-Hepática Familiar Progressiva do tipo 3 (PFIC3), uma doença rara, genética e que acarreta uma disfunção na secreção da bile nos ductos biliares intra-hepáticos (SRIVASTAVA, 2014). No contexto das colestases autoimunes, a Colangite Biliar Primária (CBP) se caracteriza pela destruição progressiva dos ductos biliares intra-hepáticos, desde os ramos de menor calibre até o sistema biliar de pequenos ductos (PANDIT; SAMANT, 2023), enquanto que a Colangite Esclerosante Primária (CEP), promove o estreitamento dos ductos biliares intra- e extra-hepáticos, sendo os últimos, os ductos biliares principais, levando à obstrução completa do fluxo da bile (KRIGE; BORNMAN; TERBLANCHE, 2001) e aumentando a susceptibilidade ao hepatocarcinoma ou colangiocarcinoma (SALAS-SILVA et al., 2021). O transporte hepatobiliar é fundamental para manter a produção da bile e promover a excreção de substâncias endo- e exógenas. O comprometimento do fluxo biliar resulta no acúmulo de ácidos biliares hidrofóbicos no fígado, desencadeando danos hepatocelulares e biliares, juntamente com inflamação e lesões (LI; CAI; BOYER, 2017). O dano hepatocelular compromete a função da membrana hepatocitária, produção de citocinas que estimulam a ação de fibroblastos, a deposição de colágeno, desenvolvimento de fibrose progressiva, cirrose, e eventual insuficiência hepática (BEUERS; WOLTERS; OUDE ELFERINK, 2023; ZENG; FAN; ZHOU, 2023).

As manifestações clínicas observadas em indivíduos diagnosticados pela colestase crônica estão associadas principalmente à presença de prurido, que pode se manifestar como o sintoma mais debilitante, exercendo uma influência substancial na qualidade de vida do paciente. Em certas circunstâncias, o prurido excessivo pode até promover a intervenção através de transplante de fígado. É crucial destacar que o prurido decorrente de transtornos hepáticos pode ocasionar

a erros diagnósticos, sendo esse tratado como uma condição dermatológica, retardando o início do tratamento adequado (BEUERS; WOLTERS; OUDE ELFERINK, 2023; SHAH; JOHN, 2023; THOMPSON et al., 2022). Aproximadamente 70% a 85% dos pacientes apresentam fadiga (SIDDIQI; TADI, 2024; DYSON et al., 2018; KUMAR; TANDON, 2002; MILKIEWICZ; HEATHCOTE, 2004). Além disso, ocorre uma absorção insuficiente de vitaminas lipossolúveis pelo trato gastrointestinal, especialmente vitaminas A, D, E e K (DEGRASSI et al., 2023; SEND, 2020), proveniente da interrupção ou redução do fluxo da bile (SCHMIDT et al., 2010). À medida que a colestase progride, podem também surgir icterícia, caracterizada pelo amarelamento da pele e olhos, associada a níveis elevados de bilirrubina sérica (BERK; JAVITT, 1978; CONTRERAS-OMANA et al., 2022).

O ácido ursodesoxicólico (UDCA), comumente conhecido como Ursodiol, é utilizado no tratamento da colestase com o objetivo de facilitar o fluxo da bile nos ductos biliares e no fígado. Seu principal objetivo é reduzir os níveis elevados de enzimas hepáticas, aliviar a citotoxicidade resultante do acúmulo de ácidos biliares e mitigar a lesão de colangiócitos inibindo, por fim, a apoptose hepatocelular (ROMA et al., 2011; ZAPPATERRA et al., 2021). Além desses efeitos hepatoprotetores, o UDCA demonstrou eficácia na redução dos níveis séricos de colesterol e dissolução de cálculos biliares de colesterol (POUPON et al., 1993). Esses resultados são alcançados devido ao estímulo da secreção e eliminação da bile pelo fígado, conferindo benefícios significativos na melhoria do fluxo biliar e prevenindo o seu acúmulo nos ductos biliares (ACHUFUSI; SAFADI; MAHABADI, 2023; PAUMGARTNER; BEUERS, 2002).

Para indivíduos que apresentam uma resposta terapêutica insatisfatória ao UDCA, uma abordagem complementar envolve a administração simultânea de fibratos, como por exemplo o fenofibrato que é um agonista do receptor alfa ativado por proliferador de peroxissomos (PPAR α) (do inglês: *Peroxisome proliferator-activated receptor alpha*). PPAR α desempenha um papel crucial na homeostase do colesterol, lipídios e ácidos biliares, regulando os genes responsáveis pela síntese e transporte de ácidos biliares em humanos, como a proteína MDR3 - Proteína de Resistência a Múltiplos Fármacos 3 (GHONEM; ASSIS; BOYER, 2015). A terapia com fenofibrato também auxiliar na redução do prurido (SHEN et al., 2021). No entanto, o fenofibrato pode aumentar a litogenicidade da bile, potencialmente induzindo a formação de cálculos biliares (BLANE, 1987; GHONEM; ASSIS; BOYER, 2015). Rifampicina e sertralina também são utilizadas no tratamento do prurido (HEGADE; KENDRICK; JONES, 2015).

As Diretrizes de Prática Clínica da EASL (do inglês: *European association for the study of the liver*) delineiam de forma abrangente diversas estratégias de diagnóstico para doenças hepáticas colestáticas (EASL, 2009). O processo de diagnóstico da colestase hepática geralmente envolve uma avaliação dos níveis de fosfatase alcalina (ALP) e γ -glutamiltanspeptidase (GGT), onde ALP elevada ($>1,5$ vezes o limite superior normal) e GGT elevada (>3 vezes o limite superior normal) servem como marcadores indicativos, embora não sejam marcadores específicos para doenças colestáticas.

Níveis elevados de ALP podem indicar danos ao fígado, como: cirrose (JAISWAL et al., 2011), hepatite (HU et al., 2019) ou câncer metastático (SAIF; ALEXANDER; WICOX, 2005). De acordo com Lu (2022), a melhoria das técnicas de detecção para ácidos biliares auxiliariam no diagnóstico de distúrbios relacionados à colestase hepática, pois, alguns indivíduos podem manifestar aumento de bilirrubina conjugada ou ácidos biliares enquanto mantêm níveis normais de GGT. No entanto, o autor enfatiza que pacientes com doenças hepáticas, incluindo cirrose (não apenas relacionada à colestase) e hepatite crônica, podem também apresentar níveis elevados de ácido biliares séricos.

Consequentemente, a abordagem diagnóstica envolve várias etapas de anamnese, iniciando-se com exames bioquímicos e ultrassonografia abdominal e progredindo com colangiorrressonância por ressonância magnética (CRM), ecoendoscopia, colangiografia retrógrada endoscópica (CRE), análise de anticorpos antimitocôndria (AMA) e antinúcleo (ANA) e biópsia hepática e, quando essa é inconclusiva, a análise genética (BEUERS et al., 2014). O “Manual de Condutas em Doenças Colestáticas e Autoimunes do Fígado”, da Sociedade Brasileira de Hepatologia discute em detalhes a conduta no manejo e no tratamento das principais doenças colestáticas (BITTENCOURT; COUTO, 2019).

Outro desafio para o diagnóstico preciso de colestases hepáticas é a dificuldade em distinguir entre diferentes tipos de colestase, como a PFIC3, CBP e CEP, as quais apresentam várias características clínicas e bioquímicas similares. Neste trabalho, discutiremos os desafios diagnósticos e os perfis metabólicos inerentes à PFIC3, CBP e CEP.

1.1.1 Colestase Intra-Hepática Familiar Progressiva Tipo 3 (PFIC3)

A Colestase Intra-Hepática Familiar Progressiva Tipo 3 (PFIC3) é um distúrbio hepático raro caracterizado por uma mutação no gene ABCB4, localizado no cromossomo 7q21, responsável pela codificação da glicoproteína-P (P-gp), também conhecida como proteína de resistência a múltiplos medicamentos 3 (MDR3) (ALASMARI et al., 2023; WEI et al., 2021). Essa mutação também está associada a outras condições, como Colelitíase Associada a Baixos níveis de Fosfolipídios (LPAC), doença hepática associada à nutrição parenteral, colestase neonatal transitória e colestase intra-hepática da gravidez (STICOVA; JIRSA, 2020).

Os hepatócitos desempenham um papel importante no transporte de fosfolipídios para os canalículos biliares, um processo fundamental para preservar a integridade estrutural do sistema biliar. Os fosfolipídios presentes na bile desempenham uma função protetora importante ao formar micelas mistas com os ácidos biliares (MORITA; TERADA, 2014). Essa interação serve como um escudo para os colangiócitos, protegendo-os efetivamente contra danos na membrana hepatocitária, induzidos pelos ácidos biliares hidrofóbicos. O equilíbrio delicado entre sais biliares e fosfolipídios é crucial para manter a solubilidade do colesterol (DAVIT-SPRAUL et al., 2009). No entanto, mutações no gene ABCB4 acarretam ausência ou baixos níveis de fosfolipídios na bile que perturbam a estabilidade das micelas, consequentemente, obstruindo os lúmens dos pequenos ductos biliares e resultando na exposição persistente de colangiócitos a sais biliares hidrofóbicos. Esse processo culmina no desenvolvimento de colangite e também promove a precipitação de cristais de colesterol, formando cálculos biliares nos ductos biliares (PORTINCASA, MOSCHETTA; PALASCIANO, 2002). No contexto clínico mais amplo, aproximadamente 70% dos casos em que os pacientes mantêm a expressão da proteína MDR3 e a secreção residual de fosfatidilcolina (PC) apresentam uma resposta favorável ao ácido ursodesoxicólico (UDCA) (AMIRNENI et al., 2020).

1.1.2 Colangite Biliar Primária (CBP)

A colangite biliar primária (CBP), anteriormente referida como cirrose biliar primária, é uma doença hepática crônica que causa danos graduais aos pequenos ductos biliares intra-hepáticos no fígado, representados pelos colangiólos. Os danos dos ductos intra-hepáticos resultam em inflamação periportal, fibrose hepática, colestase e ductopenia progressiva. Se não tratada, a CBP pode levar à cirrose biliar e insuficiência hepática (SELMÍ et al., 2011). Embora a causa exata da CBP não seja completamente compreendida, estudos sugerem que fatores genéticos desempenham um papel importante em seu desenvolvimento (GULAMHUSEIN; HIRSCHFIELD, 2020; TANAKA, 2021). Além disso, fatores ambientais, como uso de medicamentos, exposição a toxinas, tabagismo, estresse, infecções e dieta, podem desencadear uma resposta autoimune em indivíduos com predisposição genética para a doença (JOSHITA et al., 2017; LAZARIDIS; LARUSSO, 2015). A presença de anticorpos antimitocôndria (AMA) no sangue é um dos principais indicadores de CBP. AMA é detectado em 90-95% dos pacientes, mas em menos de 1% dos indivíduos saudáveis (YOUNOSSI et al., 2019). Outros anticorpos, como o anticorpo antinuclear (ANA) com diferentes padrões de fluorescência, anticorpos anticentrômero (ACA), anticorpos nucleares múltiplo (anti-MND) e anticorpos antienvolpe nuclear (ANEAN), também podem ser encontrados em pacientes com CBP (GRANITO et al., 2012; BERETTA-PICCOLI et al., 2019). Em casos de testes para diagnóstico de CBP negativos para AMA, os anticorpos anti-gp210 e sp100 são considerados biomarcadores substitutos. ANA está presente em quase metade dos pacientes com CBP, e em alguns casos, parece estar associado a um curso clínico mais grave e prognóstico, como insuficiência hepática grave e a necessidade de transplante de fígado (ALI; CAREY; LINDOR, 2014).

A CBP é uma doença hepática mais comum em mulheres de meia-idade, com uma proporção no Brasil entre mulheres e homens de 10:1, no entanto, esta proporção vem diminuindo nos últimos anos. Geralmente a CBP é diagnosticada em indivíduos de 40 a 60 anos de idade e raramente é diagnosticada em adolescentes (GALOOSIAN et al., 2020; LLEO et al., 2020; MARSCHALL et al., 2019). Pacientes com CBP podem ser assintomáticos ou apresentar fadiga, que é o sintoma mais comum da doença. Outros sintomas podem incluir icterícia, prurido, diminuição da densidade mineral óssea, hiperlipidemia e xantelasma. A CBP também está fortemente associada a outras doenças autoimunes, como a Síndrome de *Sjogren*, tireoidite de Hashimoto e artrite reumatoide (FLOREANI et al., 2015). A progressão da doença está associada a desenvolvimento de cirrose

hepática, com ou sem hipertensão portal clinicamente significativa, complicada ou não com carcinoma hepatocelular, o que pode levar a uma indicação para transplante de fígado (JANMOHAMED; TRIVEDI, 2018; LEUNG; DEEB; HIRSCHFIELD, 2020).

O diagnóstico precoce e a intervenção oportuna são cruciais para o tratamento adequado dos pacientes. A CBP geralmente é diagnosticada por três critérios principais: 1) a presença de AMA $\geq 1:40$, 2) fosfatase alcalina elevada [ALP > 1,5 vezes o limite superior normal (LSN)] e 3) achados histológicos específicos nos ductos biliares (BOWLUS; GERSHWIN, 2014; LEUNG; DEEB; HIRSCHFIELD, 2020; LLEO et al., 2020). Embora esses critérios diagnósticos sejam geralmente confiáveis para detectar a maioria dos pacientes com CBP, é importante observar que alguns pacientes podem receber um resultado de teste negativo para AMA, o que representa 5-15% dos pacientes com CBP no mundo. Isso pode levar a um diagnóstico incorreto e atrasos no recebimento do tratamento adequado (LINDOR et al., 2019).

A CBP é uma doença para a qual não há cura, mas a progressão da doença para cirrose e insuficiência hepática pode ser prevenida ou retardada com a administração de UDCA (BOWLUS; GERSHWIN, 2014). O UDCA é conhecido por proteger os ductos biliares e as células epiteliais biliares contra lesões, alterando a concentração dos efeitos tóxicos de ácidos biliares endógenos. Em pacientes com CBP, o UDCA mostrou melhorar os níveis de ALP, reduzir a bilirrubina, retardar a progressão histológica e melhorar a sobrevida de pacientes que são submetidos ao transplante de fígado. Portanto, os níveis de bilirrubina e ALP são considerados marcadores substitutos para a progressão da doença e a resposta ao tratamento (LEUNG; DEEB; HIRSCHFIELD, 2020; LLEO et al., 2020).

Para indivíduos que não respondem ao tratamento com UDCA, pode ser administrado fibratos, como o bezafibrato, fenofibrato, pemafibrato. O fenofibrato, por exemplo, auxilia na diminuição dos níveis séricos de ácidos biliares primários e secundários tóxicos, como o ácido quenodesoxicólico (CDCA), o ácido litocólico (LCA) e o ácido desoxicólico (DCA) (GHONEM; ASSIS; BOYER, 2015).

O ácido obeticólico (OCA), um derivado sintético do CDCA, emerge como uma opção farmacológica quando associado no tratamento com UDCA. O OCA atua como um agonista seletivo do receptor X farnesóide (FXR) (FIORUCCI; DI GIORGIO; DISTRUTTI, 2019). O FXR, por sua vez, é um importante regulador das vias inflamatórias, fibróticas e metabólicas dos ácidos biliares (DE VINCENTIS et al., 2021). Aprovado para uso combinado com

UDCA, o OCA contribui para a melhoria dos níveis de ALP, γ -glutamiltanspeptidase (GGT) e alanina aminotransferase (ALT). No entanto, é essencial reconhecer que o OCA está associado a efeitos adversos prevalentes, incluindo prurido, fadiga e dor abdominal (KRUPA et al., 2024).

Se não tratada, a CBP pode levar a graves problemas de saúde. Assim, é importante explorar novos métodos diagnósticos para detectar a doença em estágios iniciais e prevenir complicações. Além disso, o desenvolvimento de novos biomarcadores pode ajudar na recolocação dos marcadores bioquímicos já existentes e levar a novas descobertas que auxiliem no desenvolvimento de novos medicamentos, uma vez que as atuais opções são limitadas.

Para investigar os complexos fenótipos da CBP, uma abordagem metabolômica *untargeted* baseada em cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de massas de alta resolução (LC-HRMS) foi utilizada para avaliar os metabólitos plasmáticos e urinários relacionados à CBP. Ao estudar o perfil plasmático e urinário, buscamos identificar processos bioquímicos que poderiam ser negligenciados se apenas um biofluido fosse estudado.

1.1.3 Colangite Esclerosante Primária (CEP)

A Colangite Esclerosante Primária (CEP) é uma doença crônica caracterizada por inflamação persistente, fibrose progressiva e estreitamento dos ductos biliares intra e extra-hepáticos, levando à obstrução completa e perda dos ductos biliares principais, de maior calibre (VLĂDUȚ et al., 2020). Atualmente, há conhecimento limitado sobre a etiologia da doença; no entanto, fatores genéticos e ambientais podem desempenhar um papel no desenvolvimento da CEP (LAZARIDIS; LARUSSO, 2015).

De acordo com Park *et al.* (2022) a prevalência global da CEP varia de 01 a 16 casos por 100.000 pessoas em todo o mundo. A faixa etária média na qual o diagnóstico é frequentemente realizado varia de 30 a 40 anos, com uma predominância de casos em homens, com uma proporção de diagnosticados de aproximadamente 2 homens para cada mulher (SONG et al., 2020).

A CEP está associada a outras doenças autoimunes, como a doença inflamatória intestinal (DII) e a colite ulcerativa, presente em aproximadamente 60% a 80% dos pacientes (CHAPMAN et al., 2010; POLLHEIMER et al., 2011). O mecanismo subjacente à relação entre CEP e DII não é totalmente claro; no entanto, existem duas principais hipóteses. A primeira, conhecida como a hipótese da "*Homing* Linfocitária Intestinal", a qual sugere que linfócitos ativados no intestino, inflamado e permeável, podem entrar na corrente sanguínea e persistir

como células de memória. Essas células de memória podem induzir inflamação no fígado. A segunda hipótese, chamada de hipótese do "Intestino Permeável", concentra-se na associação entre a progressão de lesões hepáticas e biliares e aumento da permeabilidade intestinal. De acordo com esse conceito, metabólitos bacterianos do intestino, devido à permeabilidade intestinal aumentada, podem se translocar para o fígado. O fígado, que está continuamente exposto a moléculas do microbioma intestinal, cruciais para a saúde, mas também potencialmente desempenhando um papel na patogênese de doenças hepáticas e intestinais (GRANT et al., 2002; PALMELA et al., 2018; TSAITAS; SEMERTZIDOU; SINAKOS, 2014).

A CEP é uma doença silenciosa que progride lentamente, frequentemente levando à cirrose biliar, aumento do risco de câncer e, consequentemente, em uma alta taxa de mortalidade (VALLE; BJÖRNSSON; LINDKVIST, 2011). Isso inclui o colangiocarcinoma, um tipo de câncer que afeta os ductos biliares (SONG et al., 2020), carcinoma da vesícula biliar, câncer pancreático e um risco significativamente elevado de câncer colorretal, intimamente associado a pacientes com DII (KORNFELD; EKBOM; IHRE, 1997; MARCHIONI BEERY; VAZIRI; FOROUHAR, 2014).

A maioria dos pacientes com CEP, além do aumento das enzimas colestáticas, apresentam aumento dos níveis de aminotransferases (1,5 vezes o limite superior do normal) (CHAPMAN et al., 2010). O anticorpo mais estudado em pacientes com CEP é o anticorpo perinuclear contra estruturas citoplasmáticas do neutrófilos (pANCA), um subtipo de ANA. Esse anticorpo é detectado em 26-94% dos pacientes; no entanto, ele é inespecífico e também pode ser encontrado em pacientes com CBP e Hepatite Autoimune (HAI) (ZEMAN; HIRSCHFIELD, 2010).

Dadas as complexidades e desafios envolvidos no diagnóstico, monitoramento e na distinção entre os diferentes tipos de colestase, esse trabalho visou investigar as características metabólicas pertinentes a três colestases hepáticas. Nesse sentido, foram realizadas análises metabolômicas *untargeted* de amostras de plasma e urina obtidas de pacientes diagnosticados com CBP, CEP e PFIC3. Utilizando LC-HRMS, foram identificados metabólitos discriminantes que podem aprimorar o conhecimento bioquímico dos diferentes tipos de colestases e promover um monitoramento da doença.

1.2 Abordagens Metabolômicas

Metabolômica é uma área de pesquisa em expansão no âmbito das pesquisas ômicas e que concentra-se na caracterização abrangente dos metabólitos em sistemas biológicos (YEUNG, 2018). A importância das análises metabolômicas reside na sua capacidade de proporcionar uma visão abrangente do perfil metabólico, acompanhada dos eventos bioquímicos relacionados às vias metabólicas. A metabolômica tem sido cada vez mais empregada no monitoramento terapêutico de diversos tratamentos clínicos (PU et al., 2022; SIDDIQA et al., 2023), como também no desenvolvimento de novos fármacos (ALARCON-BARRERA et al., 2022; PANG; HU, 2023). Além disso, as análises metabolômicas são aplicadas para analisar o impacto de mutações e *knockdown* genético no perfil metabólico de pacientes (BENEDETTI et al., 2023; LANZMASTER et al., 2020).

Aplicações metabolômicas vem crescendo em diversas áreas, como de produtos naturais (RAZZAQ et al., 2019), microorganismos (BARKAL et al., 2016; PINU; VILLAS-BOAS, 2017; TANG, 2011), ambiental (BUNDY; DAVEY; VIANI, 2009; LABINE et al., 2023) e testes *in vitro* (ARTATI; PREHN; ADAMSKI, 2019; ČUPERLOVIĆ-CULF et al., 2010). Além disso, as análises metabolômicas complementam outras abordagens ômicas, como a genômica, transcriptômica e proteômica (KADDURAH-DAOUK; KRISHNAN, 2009).

Demonstrando precisão e abrangência singulares, a metabolômica torna-se uma ferramenta indispensável para compreender o estado fisiológico de células e organismos, assim como suas respostas dinâmicas a alterações genéticas, ambientais, atividades cinéticas ou variações nos níveis enzimáticos (HOLMES; WILSON; NICHOLSON, 2008). Conforme descrito por WISHART (2016) a metabolômica desempenha um papel fundamental na revelação das intrincadas interações entre genes e o ambiente, preenchendo lacunas entre as informações genéticas codificadas no genoma e as influências externas do ambiente, possuindo a capacidade de traduzir as mudanças observáveis no fenótipo em alterações metabólicas de pequenas moléculas endógenas, como aminoácidos, açúcares, aminas biogênicas, nucleotídeos, carboidratos, lipídios e xenobióticos, os quais indicam perfis distintos na bioquímica celular. (BAR et al., 2020; BEGER, 2013; BURGESS; RANKIN; WEIDT, 2014; WISHART, 2016).

Essas mudanças intrínsecas, frequentemente imperceptíveis por métodos convencionais de análise, podem ser cruciais para compreender a adaptação de células e organismos a diferentes condições externas e vias

metabólicas. Além disso, a metabolômica é também uma poderosa ferramenta para identificar novos biomarcadores que levam à descoberta de novas e melhores estratégias terapêuticas para muitas doenças graves e potencialmente fatais (COLBURN, 2003; LV et al., 2016; MATTHEWS; HANISON; NIRMALAN, 2016).

Biomarcadores desempenham um papel versátil, ultrapassando a função diagnóstica e classificatória de doenças, mas abrangendo funções cruciais de monitoramento da progressão da doença, identificação de novos alvos terapêuticos, avaliação da eficácia do tratamento e medicina personalizada, através da estratificação de pacientes. Além disso, biomarcadores clínicos têm se mostrado fundamentais como biomarcadores prognósticos, possibilitando estratégias de intervenção precoce, antes do surgimento dos primeiros sintomas evidentes da doença (ARMITAGE; BARBAS, 2014; QIU et al., 2023; ROBERTS et al., 2012; TRIVEDI; GOODACRE, 2020).

As estratégias metabolômicas estão divididas em duas abordagens distintas: metabolômica global (do inglês, *untargeted metabolomics*) e metabolômica alvo (do inglês, *target metabolomics*). A metabolômica *untargeted* é a análise abrangente de todos os analitos mensuráveis em uma amostra, incluindo espécies químicas desconhecidas. Devido à sua natureza abrangente, a metabolômica *untargeted* deve ser associada a uma rigorosa etapa de processamento de dados, para reduzir os extensos conjuntos de dados, fazendo com que esses sejam mais gerenciáveis. A identificação dos *features* moleculares, tipicamente um pico ou sinal (m/z) detectado que representa um composto químico (metabólito), requerem processamento usando bibliotecas *in silico* ou investigações experimentais (LAZAR et al., 2015). As análises envolvendo metabolômica *untargeted* oferecem a oportunidade para a descoberta de novas informações biológicas, uma vez que as análises são capazes de detectar *features* moleculares em uma ampla faixa de m/z , com técnicas de alta sensibilidade e especificidade.

A metabolômica *target* é uma abordagem utilizada quando o interesse está em compreender ou quantificar um conjunto específico de metabólitos, associados a processos metabólicos ou vias bioquímicas específicas (QIU et al., 2023). Na análise metabolômica *target* são utilizados padrões das moléculas de interesse, acrescidos de padrões internos, que são substâncias quimicamente idênticas e marcadas isotopicamente ou moléculas similares, as quais são adicionadas às amostras para a correção de desvios analíticos no preparo das mostras e decorrentes da análise (ROBERTS et al., 2012). Nesse cenário o uso de substâncias padrões permite a quantificação dos metabólitos de interesse,

permitindo uma análise quantitativa absoluta (FIEHN, 2016), ou ainda semiquantitativa, na qual as relações de abundância relativa entre os metabólitos são avaliadas (ROBERTS et al., 2012).

Ambas as abordagens metabolômicas *target e untargeted* se referem às medidas comparativas entre grupos de amostras, permitindo a comparação do metaboloma de um grupo sujeito a alterações (ambientais, genéticas, alimentares, terapêutico, etc.) com um grupo de indivíduos não alterados (grupo controle). Essas comparações fornecem informações essenciais para o entendimento do fenótipo de um organismo, desempenhando um papel fundamental na biologia de sistemas (IVANISEVIC; WANT, 2019)

Contudo, os principais desafios das abordagens metabolômicas *untargeted* podem ser resumidos como: 1) protocolos de preparo de amostras genéricos e que, na maioria das vezes, consistem somente de procedimentos empregando a precipitação de proteínas; 2) no tempo necessário para processar os dados brutos gerados; 3) falta de normalização inter- e intra-laboratórios para as diferentes etapas de processamento de dados e nos softwares empregados; 4) dificuldades na identificação dos *features* moleculares provenientes das análises estatísticas, os quais são, na sua grande maioria, moléculas desconhecidas; 5) a diversidade química entre *features* moleculares presentes em uma mesma amostras, os quais variam de compostos de elevada a baixa polaridade; 6) a presença de *features* moleculares que diferem em abundância, dificultando a detecção daqueles *features* de menor intensidade de sinal, frente aos de elevada abundância (BRUCE et al., 2009). O desenvolvimento contínuo de bancos de dados e ferramentas de bioinformática é fundamental para avançar na identificação de metabólitos e na interpretação dos dados metabolômicos (MINNO et al., 2022).

Na metabolômica *target* os principais desafios incluem a sensibilidade e seletividade dos métodos analíticos, a necessidade de diferentes plataformas analíticas para uma cobertura metabolômica abrangente, e a padronização de procedimentos operacionais. Outros desafios incluem a precisão e exatidão das análises na quantificação dos metabólitos, a escolha de métodos de separação adequados e a uma detecção eficiente dos metabólitos a serem quantificados. Uma análise estatística robusta e a quantificação precisa e acurada dos metabólitos nas matrizes complexas são essenciais para garantir a confiabilidade dos estudos metabolômicos. De acordo com Koal e Deigner (2010) para superar os desafios enfrentados na quantificação de metabólitos endógenos, devido aos seus baixos níveis de concentração em amostras biológicas, é necessário a otimização das técnicas de preparo de amostras, associadas como

uma separação seletiva dos analitos de interesse por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) ou cromatografia gasosa (GC) e métodos sensíveis de detecção como os de espectrometria de massas (MS).

A heterogeneidade físico-química dos metabólitos impede a extração simultânea de todos os metabólitos em um único procedimento, exigindo a otimização das condições de extração para alcançar a eficiência ideal para diferentes classes de compostos, por exemplo, a extração de metabólitos e lipídeos da mesma amostra. Desta forma, as diferentes condições de extração e análise das amostras por diferentes grupos de pesquisa dificultam a comparação direta de dados metabolômicos entre laboratórios, mesmo quando as plataformas de técnicas analíticas são idênticas (KOAL; DEIGNER, 2010)

1.3 Metabolômica *Untargeted* Baseada em Análises por LC-MS

1.3.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) representa uma técnica analítica amplamente empregada na separação, identificação e quantificação de analitos em amostras complexas (CASS, 2015). Este método tem sido continuamente aprimorado e aplicado em diversos setores, incluindo indústrias farmacêuticas, química, ambiental e estudos clínicos.

Na cromatografia líquida (LC) o modo de eluição em fase reversa (RPLC, do inglês: *reversed-phase liquid chromatography*) utiliza-se uma fase estacionária hidrofóbica, geralmente composta por colunas C8 e C18, constituídas por grupos octilsilano e octadecilsilano, respectivamente.

O comprimento da cadeia carbônica da fase estacionária (C8 vs. C18) influencia na sua hidrofobicidade, ou seja, quanto maior a área superficial, maior as interações com os compostos de interesse. Assim, a coluna C18, de cadeia mais longa, permite uma eluição mais lenta de moléculas hidrofóbicas do que a coluna C8. A diversidade química de fases estacionárias para serem usadas no modo reverso de eluição facilita a separação de mistura complexas de diferentes analitos com polaridades diversas. A fase estacionária do tipo C18 é particularmente interessante para análises metabolômicas, onde há a presença de uma variedade de metabólitos com diferentes polaridades.

Com relação à fase móvel, o modo reverso de eluição emprega uma fase móvel (FM) com características polares, geralmente composta por misturas de água (solvente fraco) e modificadores orgânicos (solventes fortes), como acetonitrila (ACN) ou metanol (MEOH). Adicionalmente, pode-se fazer uso de

aditivos, como sais para ajustar a força iônica da FM e de ácidos ou bases para o ajuste dos valores de pH (YABRÉ et al., 2018).

A eluição gradiente é preferida em abordagens metabolômicas para a análise de amostras complexas contendo analitos com diferentes fatores de retenção (k). Na eluição gradiente, a força do solvente aumenta gradativamente e promove a eluição inicialmente de moléculas mais hidrofílicas, seguidos pelas moléculas de média e baixa polaridade, conforme mostrado na FIGURA 1.1. Assim, o aumento do teor de solvente orgânico na fase móvel promoverá a eluição de moléculas hidrofóbicas, altamente retidas, enquanto um alto teor de água diminuirá a retenção dessas mesmas moléculas (NEUE, 2007).

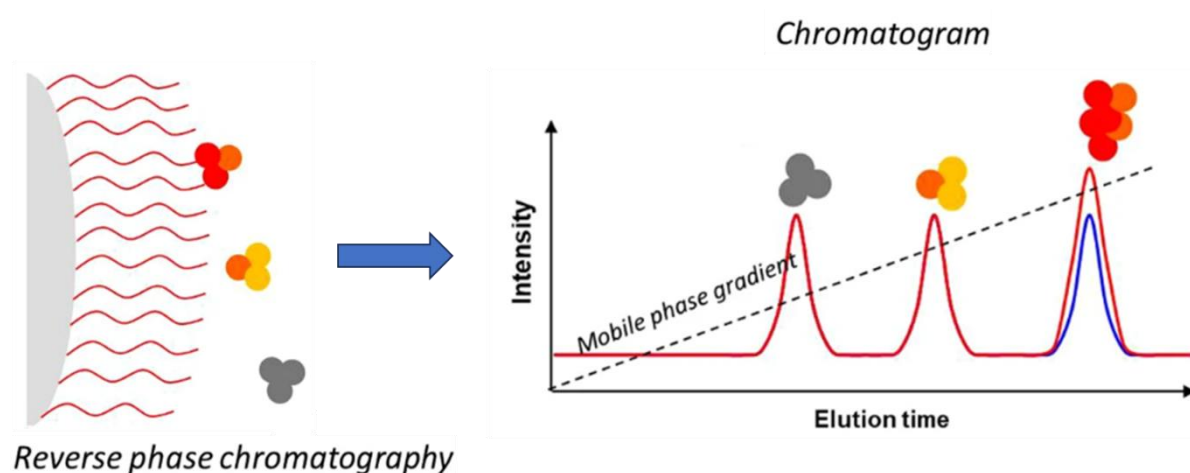


FIGURA 1.1 Representação esquemática da eluição de analitos no modo reverso de eluição, ilustrando a interação seletiva de moléculas com diferentes polaridades com uma fase estacionária hidrofóbica (adaptado de GENTILUOMO et al., 2019).

A separação cromatográfica por RPLC, proporciona separações adequadas para metabólitos de média e baixa polaridade, incluindo ésteres de colesterol, ácidos biliares, diacilgliceróis, esfingomielinas, fosfatidilcolinas, fosfatidiletanolaminas, ácidos graxos, entre outros metabólitos.

Contudo, muitos dos metabólitos consistem em pequenas moléculas altamente polares e hidrofílicas, apresentando dificuldades significativas de retenção e separação exclusivamente com emprego da eluição no modo RPLC. Dessa forma, a cromatografia líquida com o modo de separação por interação hidrofílica (HILIC, do inglês: *hydrophilic interaction chromatography*), complementa a abordagem de separação por RPLC.

O modo HILIC é a escolha mais eficiente em separar metabólitos altamente polares, oferecendo uma cobertura mais abrangente de metabólitos polares que podem ser analisados, resultando em melhorias significativas na

seletividade e reprodutibilidade das análises metabolômicas (CONTREPOIS; JIANG; SNYDER, 2015).

O modo HILIC é definido por uma fase estacionária com características hidrofílicas e uma fase móvel hidrofóbica (JENSEN et al., 2013). Há uma variedade de opções de fases estacionárias disponíveis para modos de interação do tipo HILIC, as quais abrangem desde sílica tradicional até géis de sílica com modificações químicas e a introdução de diversos grupos funcionais polares (BUSZEWSKI; NOGA, 2012). Entre esses grupos estão os dióis para a separação de proteínas, grupos amida empregados na separação de peptídeos, fases poliméricas com superfície zwitteriônica e grupos cianos, dentre outros (BUSZEWSKI; NOGA, 2012; CAVAZZINI; FELINGER, 2013).

Na separação no modo HILIC, a presença de pequenas quantidades de água na fase móvel (3-5%) são recomendadas para propiciar a formação e manutenção de uma camada de água ao redor da fase estacionária, que propicia a retenção de compostos hidrofílicos (JENSEN et al., 2013). A fase móvel mais comumente empregada no modo HILIC consiste em uma mistura de acetonitrila e água (CAVAZZINI; FELINGER, 2013). No entanto, muitas fases estacionárias que operam no modo de separação HILIC requerem o uso de aditivos e do ajuste de pH da fase móvel. Como alternativa, são preferencialmente empregados soluções salinas de sais solúveis em solvente orgânico, como formiato ou acetato de amônio, em diferentes concentrações molares e valores de pH (MCCALLEY, 2008). O bicarbonato de amônio também pode ser empregado, no entanto, sua solubilidade em solvente orgânico é limitada.

O modo HILIC utiliza solventes orgânicos em porcentagens mais elevadas na composição da fase móvel do que o modo RPLC e, além de promover a retenção seletiva de moléculas com características hidrofílicas, ainda promove um favorecimento no processo de nebulização/evaporação dos solventes com o emprego das fontes de ionização a pressão atmosférica (API, do inglês: *atmospheric pressure ionization*).

1.3.2 Espectrometria de Massas

A obtenção de dados metabolômicos pode ser realizada por meio da técnica analítica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (LC-HRMS). Essa abordagem implica na separação de substâncias presentes em amostras complexas utilizando a cromatografia líquida, seguida pela detecção das moléculas pela espectrometria de massas. Na espectrometria de massas, a fase líquida eluente da cromatografia líquida é primeiramente

evaporada, promovendo a ionização das moléculas presentes na amostra. Os íons gerados no processo de ionização são separados com base em sua relação entre massa e carga (m/z), que representa a massa molecular em função da carga elétrica (GLISH; VACHET, 2003).

Existem diferentes analisadores de massa, como o analisador híbrido quadruplo-tempo de voo (QqTOF, do inglês: *quadrupole-time of flight*) e o analisador Orbitrap, baseado em transformada de Fourier. (ZUBAREV; MAKAROV, 2013). Ambos se destacam pelo seu elevado poder de resolução de massas e têm sido extensivamente utilizados em análises metabolômicas *untargeted*.

Conforme descrito por Allen e McWhinney (2019) o analisador QqTOF é composto por um espectrômetro de massas do tipo quadrupolo associado a um tubo de tempo de voo. O quadrupolo inicial (Q1) atua como um filtro de massas, selecionando seletivamente íons com intervalo específico de m/z . No quadrupolo subsequente (Q2), chamado de célula de colisão, os íons sofrem colisões com moléculas neutras de gás nitrogênio, hélio ou argônio, resultando na fragmentação dos íons e gerando espectros de íons produtos (MS/MS). Esse processo é conhecido como dissociação induzida por colisão (CID). Ao sair da célula de colisão, os íons acelerados passam por um quadrupolo adicional que irá focalizar e direcionar os íons para a região do TOF. Os íons entram na região do TOF, onde são submetidos a um campo elétrico que os faz os íons acelerar, com a mesma energia cinética, em direção ao detector. Como diferentes íons têm m/z diferentes, eles levam tempos diferentes para percorrer a distância fixa até o detector (ALLEN; MCWHINNEY, 2019). O tempo de voo dos íons são usados para gerar um espectro de massas, relacionando a intensidade do sinal com a razão massa-carga (m/z), conforme mostrado na FIGURA 1.2.

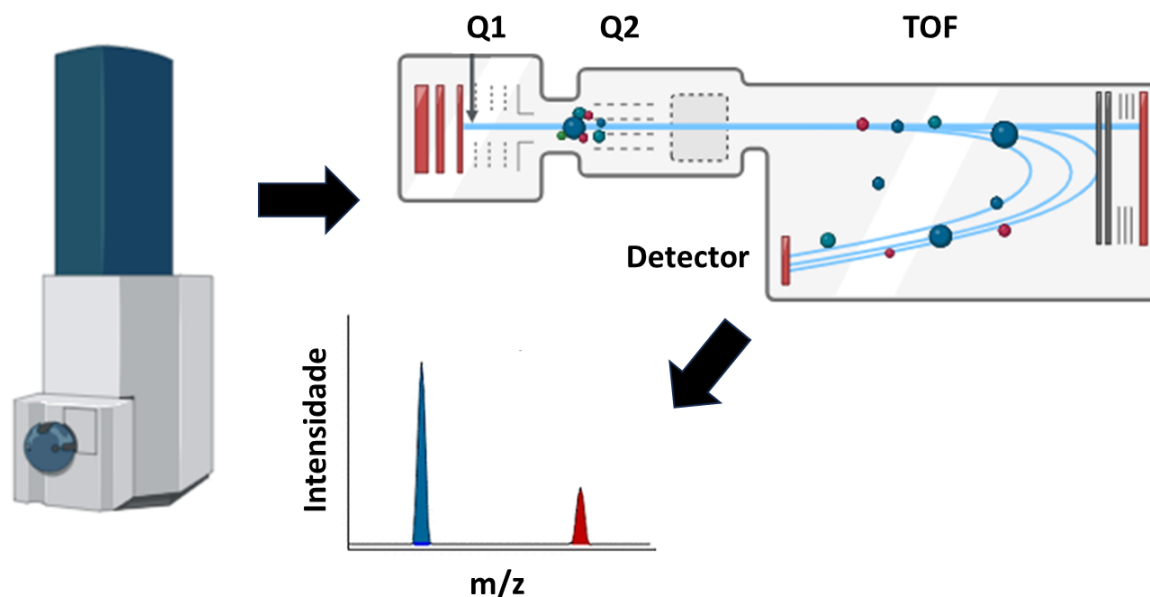


FIGURA 1.2 Representação esquemática de um espectrômetro de massas de alta resolução híbrido com analisador *quadrupole time-of-flight* (QqTOF) (adaptado de STRASSER et al., 2023)

A espectrometria de massas com ionização por *eletrospray* (ESI), desenvolvida por Fenn em 1989 (FENN et al., 1989), destaca-se como uma ferramenta essencial em laboratórios de análise por LC-MS ou LC-HRMS (HO et al., 2003). Conforme descrito por Pitt (2009), as amostras líquidas eluem através de um capilar metálico mantido com elevada voltagem (3 a 5 kV) e temperatura e são nebulizadas na ponta do capilar, formando um spray fino de gotículas carregadas. Após essa etapa, ocorre a evaporação repetida do solvente e a desintegração das gotas formadas, resultando em uma gota carregada cada vez menor que passa por uma explosão coulômbica, gerando o analito ionizado. Como a carga do analito ocorre por transferência de prótons o modo ESI produz moléculas protonadas $[M+H]^+$ ou desprotonadas $[M-H]^-$. Como a fase móvel constituinte da separação cromatográfica pode ter a presença de sais, é possível também ocorrer a formação de adutos de cátions no modo positivo de ionização, como exemplo: $([M+NH_4]^+)$ e $([M+Na]^+)$ ou formação de espécies anionizadas no modo negativo de ionização, conforme exemplo $([M+HCOO]^-)$ e $([M+C_2H_3O_2]^-)$ (HARVEY, 2000; PITT, 2009).

O método de ionização por ESI emerge como uma abordagem que minimiza a fragmentação intramolecular das moléculas, diferenciando-se favoravelmente de outros métodos de ionização. Esta característica singular possibilita a aquisição de espectros no modo *full MS Scan* ou *MS1*, conferindo uma visão abrangente e detalhada dos íons presentes na amostra, conhecidos como íons precursores. Todavia, para enriquecer a análise e promover a

identificação de moléculas, torna-se importante conduzir experimentos MS/MS ou MS2 (espectrometria de massas em tandem). Ou seja, dois estágios consecutivos de análise de massas são realizados. No primeiro estágio, na obtenção dos espectros de MS1, os íons são selecionados com base no intervalo de m/z . Esses íons são então submetidos a um segundo estágio (MS2) de análise, onde ocorre a fragmentação dos íons selecionados. A análise subsequente dos fragmentos gerados no MS2 proporciona informações adicionais sobre a estrutura química das moléculas (XIAO; ZHOU; RESSOM, 2012). Os experimentos de fragmentação (MS2) visam fornecer dados adicionais sobre a estrutura química dos metabólitos, facilitando a identificação dessas substâncias químicas em análises metabolômicas *untargeted* (GAUGLITZ et al., 2022).

Os estudos metabolômicos, apesar de sua ampla aplicação, enfrentam desafios analíticos consideráveis. Notadamente, as amostras biológicas apresentam uma complexidade intrínseca, abrangendo uma ampla variedade de compostos com diferentes polaridades. Com isso, a riqueza de metabólitos em amostras biológicas demanda abordagens analíticas que transcendam as limitações de um único sistema de separação, mesmo quando combinados com espectrometria de massas de alta resolução (HRMS) (SCHWAIGER et al., 2018; STEVENS et al., 2019).

1.3.3 Considerações Adicionais em Análises Metabolômicas

Além da etapa de separação e detecção dos analitos de interesse, a extração de metabólitos durante o preparo das amostras para a análise por LC-HRMS é de igual importância. Estratégias comuns para superar desafios de obter extrações eficientes e ampliar a cobertura do metaboloma, incluem etapas para concentrar os extratos das amostras, com o emprego de evaporação do solvente seguida de ressuspensão do material em pequeno volume de uma mistura de solvente-água. Adicionalmente, o desenvolvimento de procedimentos específicos de preparo de amostras permite otimizar a etapa de preparo de amostras, assim como, priorizar classes distintas de metabólitos polares e não polares (CANUTO et al., 2018).

Conforme reportado por Yang et al. (2013), a combinação de solventes orgânicos como acetonitrila-metanol tem se mostrado ser eficiente na precipitação de proteínas em comparado com o uso isolado de solventes orgânicos, como acetonitrila, metanol ou etanol (YANG et al., 2013). Esta abordagem, além de garantir uma eficiente precipitação de proteínas, também pode ser mais eficaz na recuperação de moléculas hidrofóbicas (YANG et al.,

2013). A precipitação de proteínas também é aplicada em análises com foco na extração de amostras polares. Nestes casos, existem protocolos que utilizam o metanol frio para a etapa de precipitação de proteínas (CRUICKSHANK-QUINN et al., 2014). Quando há a necessidade de remover ácidos graxos, lipídios e fosfolipídios da amostra, é possível adicionar a etapa de extração em fase sólida (SPE) para eliminar compostos hidrofóbicos de maneira mais eficiente (CRUICKSHANK-QUINN et al., 2014). Ainda, o método *Bligh and Dyer* e o método *Folch*, são específicos para a extração de lipídeos e muito empregados em extrações de amostras biológicas para análises metabolômicas (SAINI et al., 2021).

Assim, a combinação dos modos de separação RPLC e HILIC com diferentes procedimentos de extração das amostras, visa proporcionar a análise de uma ampla gama de compostos químicos essenciais para experimentos de metabolômica *untargeted* (SARIC et al., 2012; WAWRZYNIAK et al., 2018).

A escolha do modo de ionização também desempenha um papel crucial nas análises metabolômicas. Um único modo de ionização (positivo/negativo) não é capaz de priorizar eficientemente a formação de íons de classes distintas de moléculas, visto que alguns metabólitos são ionizados de forma mais eficaz no modo de ionização positivo, enquanto outros apresentam maior eficiência no modo negativo de ionização. A técnica de ionização por *eletrospray* (ESI) continua sendo a mais amplamente adotada, devido à sua capacidade de ionizar uma variedade de metabólitos de diferentes classes químicas, com mínima fragmentação (SCHWAIGER et al., 2018). Diante disso, a estratégia analítica mais eficaz envolve a condução de ensaios usando ESI em ambos os modos de ionização, positivo (ESI+) e negativo (ESI-), combinando diferentes abordagens cromatográficas ortogonais, como as de RPLC, associadas às do tipo HILIC.

Outro aspecto crítico nas análises metabolômicas está relacionado à alta produtividade do conjuntos de dados brutos e à necessária conversão desses dados em matrizes menores para o processamento estatístico (GOWDA et al., 2014; LAZAR et al., 2015). Existem softwares para processar os dados brutos, gerando uma matriz em 3D que relaciona m/z , tempo de retenção (t_R) e a intensidades dos íons detectados. Durante o processo de extração, deconvolução e alinhamento dos picos, a matriz de dados em 3D passa a ser 2D, relacionando-se o par m/z - t_R com a intensidade dos íons. Diferentes softwares executam essa geração de matrizes de dados, como *Profile Analysis*® (Bruker), *Compound Discovery*™ (Thermo Scientific), *Progenesis QI* (Waters Corporation) e *MassHunter Profiler* (Agilent Technologies). Antes da análise estatística, várias

etapas de pré-processamento das matrizes de dados são necessárias para extrair informações significativas. Métodos úteis de pré-processamento incluem principalmente normalização e dimensionamento, podendo ser utilizados de forma isolada ou em combinação. É crucial destacar que a reprodutibilidade do sistema de LC-HRMS é uma preocupação, e, portanto, amostras designadas de controles de qualidade (QCs) são indispensáveis nos experimentos para monitorar variações instrumentais.

2 Objetivos

O objetivo central deste trabalho consistiu em aplicar estratégias metabolômica *untargeted* por LC-HRMS em amostras de plasma e urina de pacientes submetidos a tratamentos com ácido ursodesoxicólico (UDCA), para identificar perfis e alterações metabólicas de doenças hepáticas colestáticas, nomeadamente, Colestase Intra-Hepática Familiar Progressiva tipo 3 (PFIC3), Colangite Biliar Primária (CBP) e Colangite Esclerosante Primária (CEP).

2.1 Objetivos Específicos

I) Avaliar a colangite biliar primária (CBP) em relação a um grupo controle, com o intuito de identificar metabólitos que possam contribuir para o entendimento das alterações bioquímicas e o monitoramento do distúrbio hepático colestático em paciente em tratamento com UDCA;

II) Investigar e diferenciar amostras de pacientes com diferentes tipos de doenças colestáticas hepáticas, PFIC3, CBP e CEP, com o propósito de identificar metabólitos discriminantes entre os três grupos de doenças hepáticas colestáticas, visando aprimorar os processos diagnósticos, prognósticos e de monitoramento dos pacientes;

III) Identificar rotas bioquímicas ou processos biológicos vinculados às alterações metabólicas, proporcionando uma melhor compreensão das bases fisiopatológicas subjacentes às doenças colestáticas hepáticas.

3 Materiais e Métodos

3.1 Generalidades

Os experimentos foram realizados no laboratório SEPARARE (Núcleo de Pesquisa em Cromatografia) do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

Os reagentes e solventes utilizados no preparo das amostras e análises por LC-HRMS incluíram metanol (MeOH), acetonitrila (ACN) e etanol de alta pureza cromatográfica (HPLC), adquiridos da Merck (*Darmstadt*, Alemanha). Ácido fórmico de grau LC-MS e acetato de *L*-leucina-encefalina anidra foram adquiridos da Sigma Aldrich (*St. Louis*, EUA). Água deionizada foi produzida utilizando um Sistema Milli-Q (Millipore, São Paulo, Brasil).

Para o preparo de amostras, foram utilizadas micropipetas Gilson (Gilson, Estados Unidos) e/ou *Eppendorf* (*Eppendorf*, Alemanha), um agitador vórtex MS3 basic (IKA, Alemanha) e centrífuga refrigerada 5415R (*Eppendorf*®, Alemanha).

3.2 Casuística e Coleta de Amostras

Este estudo foi conduzido em estrita conformidade com os princípios estabelecidos na Declaração de Helsinque e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Brasil (protocolo: 3.728.710, aprovado em 27 de novembro de 2019). Todos os participantes receberam informações sobre a pesquisa e forneceram consentimento, mediante assinatura de um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE – Apêndice IV). As amostras biológicas de plasma e urina dos pacientes com Colestase Intra-Hepática Progressiva Familiar tipo 3 (PFIC3), Colangite Biliar Primária (CBP) e Colangite Esclerosante Primária (CEP), foram coletadas pela enfermeira Celina Teixeira Prado, no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Clínica de Gastroenterologia. A seleção e monitoramento dos pacientes foram realizados pelo Prof. Dr. Eduardo Luiz Rachid Cançado. O grupo controle consistiu em indivíduos saudáveis e as amostras biológicas foram coletadas na Universidade Federal de São Carlos.

Dado o caráter de doenças raras, não foram empregados cálculos estatísticos para determinar o tamanho da amostra (*n*). Desta forma, estabeleceu-se a inclusão mínima de 30 participantes por grupo, conforme critérios

predefinidos de inclusão e exclusão. No total, foram coletadas amostras de 97 pacientes diagnosticados com PFIC-3, CBP e CEP. Adicionalmente, 35 voluntários sem diagnóstico de doença hepática foram incluídos como grupo controle. As amostras de plasma e urina foram coletadas no Ambulatório Central do Hospital das Clínicas de São Paulo durante o período de janeiro de 2020 a junho de 2021.

Os critérios de inclusão dos pacientes foram baseados nos padrões de diagnóstico estabelecidos pela *European Association for the Study of the Liver* (EASL) e pela *American Association for the Study of Liver Disease* (AASLD), conforme delineado por (BOWLUS et al., 2023).

3.3 Critérios de Inclusão

3.3.1 Pacientes Diagnosticados com PFIC3

- Níveis de fosfatase alcalina (ALP) elevado;
- Biópsia hepática com Imunohistoquímica feita para MDR3;

3.3.2 Pacientes Diagnosticados com CBP

- Níveis de fosfatase alcalina (ALP) elevado;
- Presença de anticorpo antimitocondrial (AMA) no soro, em concentrações acima de 1:40.
- A EASL recomenda que o diagnóstico de CBP, quando o resultado é negativo para AMA, pode ser feito em indivíduos com colestase e imunofluorescência específica de ANA (pontos nucleares ou aros perinucleares) ou resultados positivos por imunoensaios para anticorpos sp100 e gp210.
- Biópsia hepática;

3.3.3 Pacientes Diagnosticados com CEP

- Níveis de fosfatase alcalina (ALP) elevado;
- Colangioressonância e colangiografia retrógrada endoscópica;
- biópsia hepática;
- doença inflamatória intestinal

3.4 Critérios de Exclusão

Foram adotados como critérios de exclusão os seguintes casos: pacientes sem diagnóstico confirmado de doença colestática, indivíduos com idade inferior a 18 anos, aqueles que faziam uso de álcool, drogas ilícitas ou medicações hepatotóxicas, bem como aqueles que se recusaram a fornecer amostras para fins de pesquisa acadêmica.

3.5 Coleta das Amostras

Foram coletadas amostras de plasma e urina de quatro grupos de participantes. Conforme as predisposições de sexo estabelecidas, o grupo CBP era predominantemente feminino (100%), incluindo 30 pacientes com idades entre 37 e 81 anos; o grupo PFIC3 foi composto por 37 pacientes (idades entre 19 e 62 anos), incluindo 7 homens e 30 mulheres; o grupo CEP incluiu 35 pacientes (idades entre 20 e 75 anos), com 18 homens e 17 mulheres; e o grupo controle de indivíduos saudáveis (CS) incluiu 38 participantes, sendo 20 mulheres e 18 homens, com idades entre 21 e 66 anos.

Os pacientes diagnosticados com PFIC3, CBP e CEP fazem tratamento contínuo com ácido ursodesoxicólico (UDCA), com a dose comumente ajustada entre 12 e 16 mg/kg de peso corporal por dia, dividida em duas administrações diárias.

Os participantes nos grupos CBP, PFIC3, CEP e CS foram submetidos a um período de jejum de 12 horas com acesso à água. Amostras de sangue foram coletadas em tubos *vacutainer* de 5 mL com EDTA e passaram por centrifugação a 3.500 rpm por 15 minutos à temperatura ambiente para obtenção das amostras de plasma. As amostras de plasma coletadas foram cuidadosamente transferidas para *cryovials* e armazenadas a -80°C até serem preparadas para análise metabólica. Amostras de urina foram coletadas em frascos estéreis, depois de descartar o primeiro jato de urina, e igualmente preservadas a -80°C para análises futuras.

3.6 Preparo de Amostras de Plasma e Urina

3.6.1 Plasma

As amostras de plasma foram descongeladas em banho de gelo e homogeneizadas em vórtex por 15 segundos. Em seguida, foram transferidos 150 μL de cada amostra de plasma para tubos de centrifugação (1.5 mL), seguido pela adição de 450 μL de metanol gelado (na proporção de 1:3 v/v plasma:MeOH) para a precipitação de proteínas. Os tubos de centrifugação foram agitados durante 30 segundos em vórtex e, em seguida, a mistura foi mantida a -20°C por 5 min. Após esse período, foram homogeneizadas novamente durante 20 segundos e centrifugadas a 10.000 rpm a 4°C por 10 minutos. Posteriormente, foram transferidas alíquotas de 200 μL do sobrenadante para novos tubos de microcentrífuga, e adicionados 20 μL do padrão interno (*L*-leucina-encefalina acetato anidra a 5 mmol L^{-1}) em cada amostra.

Amostras de qualidade do branco (QB) foram preparadas substituindo o volume da amostra de plasma por 150 μL de água Milli-Q e seguindo o mesmo procedimento adotado para as amostras de plasma. A amostra de controle de qualidade (QC) foi preparada após a etapa de precipitação das proteínas. Para isso, foram misturadas alíquotas de 15 μL do sobrenadante de cada amostra individual dos pacientes e dos indivíduos saudáveis ($n=132$) a um tubo de centrifugação de 5 mL. A mistura final foi homogeneizada em vórtex por 10 segundos. Todas as amostras foram armazenadas a -80°C para posterior análise por LC-HRMS.

3.6.2 Urina

As amostras de urina foram descongeladas em banho de gelo e submetidas a uma homogeneização por vórtex de 2 minutos, seguida por centrifugação a 10.000 rpm a 4°C por 10 minutos. Alíquotas de 100 μL de urina de cada amostra foram transferidas para tubos de centrifugação (1.5 mL), onde foram adicionados 300 μL de uma solução gelada de etanol/metanol (1:1 v/v). A mistura resultante foi armazenada a -20°C por 5 minutos e depois submetida a centrifugação a 10.000 rpm a 4°C por 10 minutos. Em seguida, 20 μL do padrão interno (*L*-leucina-encefalina acetato anidra em água deionizada a 5 mmol. L^{-1}) foi adicionado às amostras de urina antes da análise. Posteriormente, alíquotas de 20 μL foram transferidas para novos tubos de microcentrífuga e diluídas com água Milli-Q (1:10). Amostras de qualidade do branco (QB) foram preparadas

substituindo o volume da amostra de urina por 100 μL de água Milli-Q, e seguindo o mesmo procedimento adotado para as amostras de urina. A amostra de QC foi preparada seguindo o mesmo procedimento adotado para a amostra QC de plasma.

3.7 Análise por Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrômetro de Massas de Alta Resolução (LC-HRMS)

As análises metabolômicas foram conduzidas usando um sistema de cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC) Agilent 1290 Infinity II (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA), composto por uma bomba binária (G7120A), um autoinjeter (G7129B) e um compartimento de coluna (G7116B – 1290),) acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução com analisador híbrido do tipo quadrupolo - tempo de voo (QqTOF), modelo Impact HD (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), com uma fonte de ionização por *eletrospray* operando no modo positivo (ESI+) ou no modo negativo (ESI-). A aquisição e processamento dos dados foi realizada utilizando o software *Data Analysis*® 4.2 (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Alemanha) e o *Profile Analysis*® 2.1 (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Alemanha).

3.7.1 Separação Cromatográfica no Modo Reverso de Eluição (RPLC)

A separação de metabólitos no plasma e na urina foram realizadas por cromatografia líquida no modo reverso de eluição (RPLC) usando uma coluna *Zorbax Eclipse XDB C18* (100 x 3,0 mm i.d.; 3,5 μm) da Agilent Technologies (Santa Clara, CA, EUA). A duração total da análise cromatográfica foi de 30 minutos, empregando o seguinte gradiente: 0 minutos, 1% B; 0-3,0 minutos, 1-2% B; 3-10 minutos, 2-30% B; 10-15 minutos, 30-50% B; 15-18 minutos, 50-80% B; 18-20 minutos, 80-90% B; 20-22 minutos, 90-95% B; 22-26 minutos, 95-99% B; 26,01-28 minutos, 99% B, para limpeza da coluna, e 28,01-30 minutos e 1% B, para condicionamento da coluna. A fase móvel para separações no modo RPLC consistiu em água (solvente A) e acetonitrila (solvente B), ambos com 0,1% de ácido fórmico.

Durante a limpeza da coluna, a válvula de 6 caminhos foi empregada para direcionar a vazão da fase móvel para o descarte, enquanto a solução de calibração (formiato de sódio 1 mmol.L^{-1} em ACN) era inserida na fonte de

ionização. Essa etapa possibilita a aquisição de íons de referência para a calibração de massas em cada análise.

3.7.2 Separação Cromatográfica no Modo HILIC de Eluição

A cromatografia de interação hidrofílica (HILIC) foi empregada para a análise de compostos polares, usando uma coluna *Agilent Infinity Poroshell 120 HILIC* (100,0 x 2,1 mm i.d.; 1,9 μm) da *Agilent Technologies*, Santa Clara, CA, EUA. A duração total da análise cromatográfica para o modo de eluição *HILIC* foi de 22 minutos, seguindo o seguinte gradiente: 0 minutos, 99% B; 0-3,0 minutos, 99-98% B; 3-10 minutos, 98-80% B; 10-18 minutos, 80-50% B; 18-18,5 minutos, 50-1% B; 18,5-20 minutos, 1% B; 20-20,1 minutos, 1-99% B; 20,1-22 minutos, 99% B; para recondicionamento da coluna.

A fase móvel para as análises no modo HILIC de separação foi composta por 0,1 mmol/L de formiato de amônio (pH = 3) (solvente A) e acetonitrila (solvente B). Em ambas as análises (RPLC e HILIC), o volume de injeção para plasma foi de 5 μL e para urina foi de 1 μL . As colunas RPLC foram mantidas a 40°C, e a coluna HILIC foi mantida a 30°C. Durante as análises, o autoinjeter foi mantido a 15°C. Durante a limpeza da coluna, a válvula de 6 caminhos redirecionou o fluxo da fase móvel para o descarte, ao mesmo tempo em que possibilitou a infusão da solução de calibração (formiato de sódio 1 mmol.L⁻¹ em ACN) na fonte de ionização. Essa etapa viabiliza a aquisição de íons de referência para a calibração de massas em cada análise.

Antes das análises, é crucial realizar a injeção de amostras de branco, comumente preparadas utilizando o mesmo solvente utilizado no processo de precipitação de proteínas, conhecidas como amostras (QB). Em seguida, antes do início da injeção das amostras biológicas, são injetadas amostras de controle de qualidade (QC) para condicionar a coluna cromatográfica. Essa etapa é fundamental para garantir a consistência e a precisão dos resultados ao longo do experimento. As amostras QC são então intercaladas com as amostras dos dois grupos de estudo, sendo que as injeções dos grupos em estudo são randomizadas. Esse procedimento é essencial para evitar erros analíticos e garantir a confiabilidade dos resultados obtidos nas análises metabolômicas.

3.8 Parâmetros para a Aquisição de Dados no sistema LC-HRMS

A aquisição de dados foi realizada utilizando um espectrômetro de massas de alta resolução (HRMS) equipado com um analisador de massas quadrupolo tempo de voo (QTOF), modelo *Impact HD QTOF™* (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). Este instrumento possui uma interface *eletrospray* (ESI), operando nos modos de ionização positivo ou negativo. Os dados foram coletados e armazenados no modo de aquisição centróide. Inicialmente, os espectros de massas foram obtidos no modo de ionização positiva (ESI+), seguido pela coleta de dados no modo de ionização negativa (ESI-).

Os parâmetros previamente otimizados para o modo de separação RPLC foram: voltagem do capilar de +4.0 e -3.0 kV para os modos de ionização positivo e negativo, respectivamente; potencial do cone de transferência (*end plate offset*) 500 V; gás nebulizador (N₂) 4 bar; vazão do gás de secagem (N₂) 8 L.min⁻¹; energia da célula de colisão 5 eV e intervalo de varredura completa MS (*full MS scan*) de *m/z* 50-1300.

Para análises no modo de separação HILIC os parâmetros utilizados foram: voltagem capilar de +4.5 kV e -3.0 kV para os modos positivo e negativo, respectivamente; potencial do cone de transferência (*end platte offset*) 450 V; gás nebulizador 4 bar; temperatura do gás de secagem (N₂) 180 °C; vazão do gás de secagem (N₂) 8 L.min⁻¹; e intervalo de varredura completa MS (*full MS scan*) de *m/z* 50-1300.

O modo MS/MS de aquisição dependente de dados (DDA) utilizou parâmetros dinâmicos com radiofrequência de colisão (RF) variando de 200,0 a 550,0 Vpp; tempo de transferência de íons de 50,0 a 90,0 µs; com temporização de 50,0% em cada; RF 1 e RF 2 do funil foram de 250,0 e 150,0 Vpp, respectivamente. A RF do hexapolo foi de 50,0 Vpp e a energia do quadrupolo foi de 5,0 eV com armazenamento de íons pré-pulso de 6,0 µs. A energia do quadrupolo e a energia da célula de colisão foram ambas mantidas fixas em 5eV (empregadas somente para deslocamento dos íons). Os parâmetros utilizados para acionar a fragmentação MS/MS foram de velocidade de aquisição de 2,0 Hz para íons de baixa intensidade (10.000 contagem/por soma de 1.000 íons) e 4,0 Hz para íons de alta intensidade (100.000 contagens/por soma de 1.000 íons), utilizando um tempo total de ciclo de 3 s. A intensidade absoluta foi de 1.491 contagens (302 contagens/por soma de 1.000 íons), com exclusão ativa de 1 espectro e liberação após 0,90 min. A aquisição no modo *full MS scan* foi ajustada a uma velocidade de aquisição de 2,0 Hz. A energia de colisão utilizada para fragmentação de íons

foi programada para variar de 250,0 a 100,0% do valor fixo de 20 eV inicialmente definido, com o seguinte intervalo de isolamento: m/z 100, 200 e 300, com largura do pico de 4 e para m/z 700 e 1000, uma largura do pico de 6. A calibração interna do espectrômetro de massas foi realizada com a infusão de formiato de sódio em acetonitrila (1 mmol.L^{-1}), utilizando um modelo de regressão quadrática de calibração de alta precisão (HPC). A solução de calibração foi injetada no final de cada análise e todos os espectros foram recalibrados antes do processamento dos dados. Os dados foram adquiridos utilizando o *Qtof Control Software v3.4* e os dados brutos foram processados com o *Brucker Data Analysis v4.3*, ambos da *Brucker (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha)*.

3.9 Processamento de Dados

Os dados brutos das análises por LC-HRMS foram processados utilizando os softwares *Data Analysis v4.3* e *Profile Analysis v2.1* (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). Para gerar a matriz de dados (*bucket list*) foi utilizado o algoritmo *Find Molecular features* selecionando-se os seguintes parâmetros:

I) Limite sinal/ruído (S/N) = 2 - O limite S/N definido como 2 é usado para determinar a significância do sinal em relação ao ruído instrumental. Sinais com uma razão S/N abaixo desse limite foram considerados como ruído e, portanto, não foram incluídos na lista de *features* moleculares extraídos;

II) Limite de coeficiente de correlação = 0.2 - Espectros com um coeficiente de correlação abaixo desse limite podem ser considerados suficientemente distintos para serem tratados como um novo *feature* molecular.

III) Aquisição mínima de espectros (*scans*) = 10 espectros – Esse parâmetro determina o número mínimo de espectros consecutivos necessários para que um sinal seja considerado um pico válido e, portanto, um *feature* molecular.

IV) Largura de suavização ou *smoothing* = 1 - O *smoothing* é uma técnica usada para reduzir variações indesejadas nos dados brutos. Uma largura de suavização de 1 indica que a suavização aplicada é leve ou ausente.

V) Intervalo de massa - m/z 50 a 1300;

VI) Filtro – *Value count of bucket* $\geq 70 \%$ - O filtro especifica que os "*buckets* ou molecular *features*" que possuem uma contagem de dados igual ou superior a 70% são mantidos na análise, enquanto aqueles com mais de 30% de dados ausentes são excluídos.

Após obter a matriz de dados com os *features* moleculares classificados com relação ao valor par *m/z*-tempo de retenção (*tR*) versus intensidade do sinal (*count*) para cada uma das amostras analisadas, procedeu-se com o processamento de dados, o qual incluiu na etapa de pré-processamento:

I) Subtração das amostras Branco (QB) - os *features* moleculares que apresentaram intensidade de sinais superiores a 5% das intensidades dos sinais obtidas para as amostras QB foram mantidos. Caso contrário, esses *features* moleculares são considerados como impurezas e/ou contaminantes do sistema de análise ou do processo do preparo das amostras e são removidos das análises posteriores.

II) Imputação de dados ausentes (*missing values*) – Os *features* moleculares que possuíam dados ausentes superiores a 30% nas amostras de QC foram excluídos da matriz de dados. Para *features* moleculares nos quais os dados ausentes foram $\leq 30\%$, os dados ausentes foram imputados usando o algoritmo *k-Nearest Neighbors* (KNN) utilizando o software *MetaboAnalyst 5.0* (<https://www.metaboanalyst.ca>) (DI GUIDA et al., 2016).

III) Coeficiente de variação (CV) – Esta etapa pode ser realizada após a etapa de normalização por *LOWESS* que será abordada nas seções 3.9.1.1 e 3.9.1.2. Nesta etapa calcula-se o coeficiente de variação para cada *feature* molecular utilizando as amostras dos QC. O CV é uma medida estatística que expressa a variabilidade relativa em relação à média de um conjunto de dados. A fórmula para calcular o coeficiente de variação (CV) está representada na Equação 1:

$$CV_{f,QC} = \frac{\text{Desvpad}(f \Sigma QC)}{\text{média}(f \Sigma QC)} \times 100\% \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:

Desvpad é o desvio padrão das amostras de controle de qualidade (QC=30) para cada *feature* molecular;

Média das amostras de controle de qualidade (QC=30) para cada *feature* molecular.

O resultado é expresso em porcentagem, representando a variação relativa em relação à média.

As amostras de QC (n=30) foram usadas para calcular o coeficiente de variação (CV), com um valor máximo definido em $\leq 25\%$ (DUNN et al., 2012; VISWANATHAN et al., 2007). Neste caso, *features* moleculares que apresentaram um $CV > 25\%$ foram removidos da matriz de dados.

3.9.1 Identificação Putativa dos Metabólitos

A identificação putativa dos metabólitos descritos no Capítulo I foi realizada utilizando bibliotecas externas de espectros, incluindo LipidMaps (<http://www.lipidmaps.org/>), Human Metabolome Database (<http://www.hmdb.ca/metabolites>) e MONA – Mass Bank North America (<https://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/>), todas estruturadas como arquivos de dados (.sdf). Para a identificação putativa dos metabólitos descritos no Capítulo II, além das bibliotecas externas, foram também utilizadas o Progenesis™ QI v2.4 (Waters Corporation™ © Nonlinear Dynamics, Newcastle, Reino Unido), com base nos dados de LC-HRMS. Os espectros foram adquiridos no modo de varredura MS completa (do inglês: full MS scan), com aquisição dependente de dados (DDA, do inglês: *data-dependent acquisition*) para obter os dados de MS/MS.

Durante a aquisição dos dados de LC-HRMS, diferentes níveis de energia foram aplicados para obter informações necessárias para a identificação dos metabólitos. Para os espectros MS1, que fornecem informações sobre os íons precursores, os espectros foram adquiridos sem fragmentação. Um erro de massa ≤ 5 ppm foi considerado para a identificar a massa exata dos íons precursores. Os íons fragmentos (MS/MS) obtidos em alta energia (a rampa de energia variou de 20-60 eV) foram avaliados com uma tolerância de erro de massa ≤ 10 ppm.

Para aumentar o número de correspondências de fragmentos e permitir a compatibilidade do PQI (Progenesis™ QI) com bibliotecas externas, foi utilizado uma ferramenta gratuita chamada "SDF2PQI", desenvolvida por (SANCHES et al., 2023).

Além disso, scores de identificação foram atribuídos com base em fatores como exatidão de massa exata, perfil de fragmentação e similaridade de isótopos. Esses critérios rigorosos desempenharam um papel fundamental na aceitação ou rejeição da anotação de uma molécula, garantindo uma identificação precisa e confiável (XIAO; ZHOU; RESSOM, 2012).

3.9.2. Normalização dos Dados

3.9.2.1 Método de Normalização dos Dados - Amostras de Plasma

Para lidar com as complexidades de grandes conjuntos de dados metabolômicos *untargeted* baseados em LC-HRMS, foi realizada uma correção de lote (do inglês, *batch correction*) nas amostras de plasma por meio da regressão polinomial local (*software LOWESS/Spline Normalization v1.1*), (FAN et al.,

2019). Segundo DUNN et al., (2011) o ajustes das curvas *LOWESS* combina a simplicidade da regressão clássica de mínimos quadrados lineares com a flexibilidade da regressão não linear, ajustando modelos simples a subconjuntos localizados dos dados para construir uma função que descreve a parte determinística da variação nos dados, ponto a ponto (DUNN et al., 2011).

A etapa de normalização é crucial na metabolômica *untargeted* para corrigir erros sistemáticos entre diferentes amostras, sendo esses decorrentes da ordem de injeção de cada amostra ao longo da sequência analítica, impactando a precisão das medidas. O método *LOWESS/Spline* é uma técnica flexível e adaptativa que se ajusta bem a padrões complexos nos dados. O método básico envolve o uso de amostras de QCs, que é uma mistura de todas as amostras biológicas que compõe os grupos em estudo e que são injetadas intercaladas a cada 10-12 amostras em estudo, ao longo da sequência de aquisição de dados. As amostras de QC são empregadas como amostras referência para a normalização (FAN et al., 2019). No entanto, esse método também possui limitações uma vez que considera, principalmente, a ordem em que as amostras são injetadas no instrumento, assumindo que os erros sistemáticos estão principalmente relacionados a efeitos de lote e sequência de aquisição de dados, não considerando os erros de medição entre metabólitos com diferentes propriedades físico-químicas (KLOUWER et al., 2017).

3.9.2.2 Método de Normalização de Dados para as Amostras de Urina - Pacientes Grupo CBP

A urina é uma fonte biológica de interesse considerável devido à sua coleta não invasiva e abundância em volume (GAGNEBIN et al., 2017). Entretanto, é importante notar que a concentração urinária pode variar naturalmente devido a diversos fatores, como ingestão de água, dieta e uso de medicamentos. Essa variação pode afetar a diluição das amostras, potencialmente levando a interpretações incorretas em estudos metabolômicos (DIETERLE et al., 2006).

Existem várias estratégias de normalização para mitigar os efeitos da variação na diluição entre amostras de urina. Um método comumente empregado é a normalização pela concentração de creatinina. De acordo com Li et al., (2022) isso se deve ao fato de que a concentração plasmática da creatinina costuma permanecer relativamente constante sendo evidenciada pela taxa de filtração glomerular (TFG). Com isso, a creatinina é livremente filtrada pelos rins, sendo excretada sem sofrer reabsorção (LI et al., 2022). No entanto, essa abordagem é

bastante restrita e pode introduzir imprecisões nas medições, uma vez que a excreção de creatinina pode variar dependendo de diversos fatores, como a idade, etnia, sexo, massa muscular, índice de massa corporal (IMC), dieta e doenças renais (BARR et al., 2005; HAYS; AYLWARD; BLOUNT, 2015; ROSEN VOLLMAR et al., 2019).

Outras estratégias empregadas para a correção da diluição da urina nas análises metabolômicas incluem a normalização por meio de um padrão interno ou composto de referência (como a creatinina), a gravidade específica ou a osmolalidade.

A gravidade específica, por exemplo, é calculada com relação entre a massa de um determinado volume de urina e a massa do mesmo volume de água. No entanto, conforme observado por MERVANT et al. (2021), esse parâmetro não é preciso devido à sua susceptibilidade a erros de medição, especialmente devido à presença de moléculas de maior massa molecular na amostra (MERVANT et al., 2021). A osmolalidade, por sua vez, representa a concentração total de solutos urinários, sendo considerada uma abordagem mais confiável. Entretanto, uma desvantagem associada a esse método é a necessidade de equipamentos específicos para sua medição (MERVANT et al., 2021).

Assim, técnicas de normalização pós-aquisição de dados, que não exigem procedimentos experimentais adicionais, têm sido amplamente empregadas (NAM et al., 2020). Um dos métodos empregados é o MSTUS (do inglês: *MS Total Useful Signal*), que se baseia na soma da intensidade total dos componentes comuns a todas as amostras (WARRACK et al., 2009). No entanto, JACOB et al. (2014) evidenciaram que essa técnica pressupõe que o número de metabólitos que aumentam e/ou diminuem é relativamente equivalente entre todas as amostras em estudo, estabelecendo uma conexão entre os *features* moleculares identificados. No entanto, o autor destaca que essa condição nem sempre é atendida em todos os estudos (JACOB et al., 2014).

Por fim, a Normalização pelo Quociente Probabilístico - PQN (do inglês: *Probabilistic Quotient Normalization*) é um método que considera que os efeitos de diluição impactam todos os sinais metabólicos (EMWAS et al., 2018). De acordo com EMWAS et al. (2018), este método se fundamenta no cálculo do quociente entre a variável de teste e a variável da amostra de referência (selecionada pelo usuário), em que a mediana de todos os quocientes é estimada. Em seguida, todas as variáveis de teste são divididas pelo quociente mediano. O controle de qualidade (QC) mediano pode ser empregado como referência nessas situações (GAGNEBIN et al., 2017).

Além da normalização associada à concentração natural da urina é imprescindível também avaliar a estabilidade instrumental com a injeção regular de amostras de controle de qualidade (QC) ao longo das análises experimentais. Etapas de pré-processamento de dados podem ser empregados para mitigar a variabilidade analítica e erros sistemáticos, ao mesmo tempo em que preservam a variabilidade biológica inerente às amostras do estudo (DUNN et al., 2012).

Dessa forma, as análises conduzidas com amostras de urina foram normalizadas utilizando o *software Noreva 2.0* (<http://idrblab.cn/noreva/>), onde empregou-se a normalização por correção robusta de sinal *LOESS* (do inglês: *Locally Estimated Scatterplot Smoothing*) baseada em controle de qualidade QC-RLSC (do inglês: *Quality Control–Based Robust LOESS signal correction*). Segundo GAGNEBIN et al., (2017) esse método emprega uma curva de suavização específica, utilizando a técnica de gráfico de dispersão ponderada localmente (*LOESS*), derivada para cada característica observada nas amostras de QC. Essas curvas são empregadas para avaliar qualquer desvio temporal em relação à ordem de processamento, utilizando os dados das amostras de QC (GAGNEBIN et al., 2017). E, para normalizar a concentração da urina, foi empregado o método PQN de normalização no *software MetaboAnalyst* (<http://www.metaboanalyst.ca>).

Após a etapa de normalização, foi realizado o escalonamento por pareto, onde se emprega a raiz quadrada do desvio padrão do *feature* molecular como fator de escala para atenuar o impacto de grandes variações nos sinais analíticos (ERIKSSON et al., 2004). Ou seja, reduz-se a importância de valores muito intensos frente àqueles de baixa intensidade, enquanto mantém todos os sinais mais próximos da medida original (VAN DEN BERG et al., 2006).

A avaliação da qualidade dos dados obtidos pelas análises de LC-HRMS após a etapa de pré-processamento e normalização foram conduzidas por emprego de análises multivariadas. Nesse caso, inicialmente utilizou-se o método da Análise de Componentes Principais (PCA), conforme discutido por Broadhurst, et al., (2018). A PCA é uma técnica que visa reduzir a dimensionalidade do conjunto de dados, projetando uma representação que descreve a máxima variância ortogonal nos dados, como explicado por (JOLLIFFE; CADIMA, 2016). Ao avaliar a qualidade do conjunto de dados, observamos se as amostras QCs estão agrupadas em comparação com a variação total na projeção dos dados das demais amostras analisadas, conforme mostrado no Apêndice III. Notavelmente, o agrupamento dos QCs indica que a variabilidade instrumental é menor do que a variabilidade biológica (BROADHURST et al., 2018)

3.10 Análises Estatísticas

Análise discriminante de quadrados parciais (PLS-DA) foram utilizadas para realizar análises estatísticas multivariadas e interpretação dos dados metabolômicos baseados em LC-HRMS. O modelo PLS-DA foi estabelecido para descrever os metabólitos discriminantes entre os grupos experimentais obtidos das análises RPLC e HILIC nos modos de ionização ESI (+/-). *Features* Moleculares com um *score* de importância variável na projeção (VIP) ≥ 1.0 foram considerados os mais importantes para a classificação entre grupos CBP e CS. Para garantir a qualidade e robustez do modelo e evitar *overfitting* dos dados, o modelo foi validado usando testes de permutação (mil permutações) e validação cruzada de deixar um de fora (LOOCV, do inglês: *leave one out cross-validation*) para identificar os metabólitos que podem distinguir entre os grupos CBP e CS. As áreas sob as curvas (AUC, do inglês: *area under the curve*) das curvas ROC foram usadas para determinar a eficácia diagnóstica dos metabólitos importantes. PLS-DA e as curvas ROC foram obtidas com o software online *MetaboAnalyst* 5.0 (<http://www.metaboanalyst.ca>).

Com base nos metabólitos retidos pelo *score* VIP ≥ 1.0 , foi realizada uma análise estatística univariada com o software RStudio versão 4.3.0. Antes da análise univariada, os testes de Levene e Shapiro-Wilk foram utilizados para verificar a normalidade da distribuição dos dados e as pressuposições de homogeneidade de variância, respectivamente.

Em situações em que a distribuição de dados provenientes da análise das amostras de plasma ou urina não apresentava distribuição normal ($p \geq 0,05$), uma transformação Box-Cox foi utilizada para converter dados não normais em uma distribuição normal para serem posteriormente utilizados com testes estatísticos paramétricos (BLUM; ELGENDI; MENON, 2022). A transformação de Box-Cox é utilizada para encontrar uma transformação adequada da variável dependente que a torne mais próxima da normalidade e avaliar a homoscedasticidade dos dados. Este método é bastante útil em modelos de regressão linear, onde a normalidade e homocedasticidade dos resíduos são pressupostos importantes (AZEVEDO; ANDRADE JÚNIOR; FERNANDES, 2016). A transformação de Box-Cox foi aplicada usando o software SPSS 25.0 (Chicago, Illinois, EUA). Em seguida, o teste de *t-Student* (teste paramétrico) ou o teste de Mann-Whitney (teste não-paramétrico) foram conduzidos levando em consideração a distribuição dos dados e a homogeneidade das variâncias, garantindo assim uma abordagem estatística robusta para investigar as diferenças metabólicas entre os grupos em estudo.

Para avaliar o potencial impacto do fator idade entre os grupos estudados (CBP *versus* CS e PFIC3 *versus* CBP *versus* CEP), foram realizadas análises estatísticas empregando-se a análise de covariância (ANCOVA), utilizando o software SPSS 25.0 (Chicago, Illinois, EUA) (Apêndice I). A análise de covariância (ANCOVA) é uma técnica estatística derivada da análise de variância (ANOVA) e da análise de regressão. Este método é utilizado para averiguar se uma variável em estudo pode ser explicada por fatores adicionais (covariáveis) além das variáveis dependentes (KHAMMAR; YARAHMADI; MADADIZADEH, 2020).

O *fold-change* (FC) foi expresso como regulação positiva (aumentada) quando [valores médios FC = CBP/CS] $\geq 1,5$ ou regulação negativa (diminuída) quando [valores médios FC = 1/ (valores médios CBP/CS)]. Assim, foram considerados impactantes os metabólitos que apresentaram um intervalo de FC $\geq 1,5$. No entanto, é importante observar que alguns metabólitos mostraram um valor de $p < 0,05$, mas seus valores correspondentes de FC não estavam dentro dessa faixa de regulação positiva ou negativa, não sendo, portanto, variações impactantes nas rotas bioquímicas.

O teste de correlação de Pearson (r) foi aplicado para investigar possíveis correlações entre os metabólitos alterados em amostras de plasma e urina que apresentaram VIP scores ≥ 1 . Dessa forma, quando existe correlação positiva, valores de r próximos a +1, as variáveis aumentam e/ou diminuem juntas numa mesma direção; se a correlação é negativa, valores de r próximos a -1, as variáveis variam inversamente uma em relação a outra; já valores de r próximos a 0, sugerem ausência de correlação linear entre as variáveis do estudo. Os metabólitos foram putativamente anotados com base nos valores de massa exata e nos padrões de fragmentação espectral usando o HMDB (<https://hmdb.ca/>) e o MassBank (<https://massbank.us/>). Os metabólitos anotados foram empregados na análise de vias metabólicas usando a ferramenta de Análise de *Pathway* (*MetaboAnalyst* 5.0) pela base de dados KEGG (do inglês: *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*).

Para o capítulo II, foi adicionalmente conduzida uma análise para determinar se as características moleculares identificadas podem estar associadas ao gênero. O grupo CBP era 100% feminino, e o grupo PFIC tinha uma alta prevalência de pacientes do sexo feminino (81,09%). Em contraste, o grupo CEP tinha 48,58% de indivíduos do sexo feminino e o grupo controle 52,63%, sendo esse último com uma distribuição mais equilibrada entre homens e mulheres. Dado que o estudo visa diferenciar doenças colestáticas com emprego de amostras de plasma e urina, foi realizada uma análise de covariância para avaliar se o

gênero tem um efeito nessas doenças. Neste caso, como o gênero é uma variável categórica, foi empregada uma ANOVA de dois fatores, empregando os gêneros (masculino e feminino) e a presença ou ausência de doenças colestatías.

Posteriormente, foi realizada uma análise estatística univariada usando o software R versão 4.3.0. ANOVA e testes *post-hoc* usando o método de Tukey. Este método realiza comparação *pairwise* entre os grupos e compara as diferenças nas médias de todos os pares de grupos e verifica se essas diferenças são estatisticamente significativas ($p < 0.05$), ajustando os intervalos de confiança para controlar o erro global entre as comparações *pairwise* (IBM DOCUMENTATION, 2023). Os resultados foram filtrados para reter apenas valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$ e $q < 0,05$). O *fold-change* (FC) também foi usado para quantificar o quanto a característica é diferente entre os grupos, considerando-se os mesmos critérios descritos acima.

Para a análise multivariada do Capítulo II, conduzidas no MetaboAnalyst 5.0, foi realizada a Análise Discriminante de Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) para investigar a separação e agrupamento de grupos. Para validar o modelo PLS-DA, empregamos duas abordagens distintas: a validação cruzada (especificamente, o método de CV 5-folds) e um teste de permutação. A validação cruzada garante a robustez e generalização do modelo, enquanto o teste de permutação envolve a randomização dos dados para avaliar a significância estatística dos resultados (BATURYNSKA; MARTINSEN, 2021). Para avaliar a qualidade do modelo PLS-DA, foi analisado: R^2 , representando a proporção de variabilidade dos dados explicada pelo modelo, e Q^2 , quantificando a capacidade preditiva do modelo. Além disso, identificamos os metabólitos que contribuíram significativamente para a projeção, conforme indicado por um valor de Importância Variável na Projeção (VIP) $\geq 1,0$. Esta análise estatística envolveu a normalização dos conjuntos de dados usando o método de Pareto. Essas análises foram conduzidas usando o MetaboAnalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>), (DAHABIYEH et al., 2023).

Capítulo I

***Investigação Metabolômica Untargeted da
Colangite Biliar Primária por LC-HRMS***

4 Resultados e Discussão

O Capítulo I envolveu a análise de 30 pacientes diagnosticados com CBP, em tratamento no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo, comparados a um grupo controle saudável (CS) composto por 20 indivíduos. As amostras de plasma e urina coletadas foram submetidas a análises por cromatografia líquida com separação no modo RPLC e no modo HILIC de eluição e detecção nos modos positivo e negativo (ESI+ e ESI-), permitindo uma cobertura metabólica abrangente. Cromatogramas de íons totais (TIC) representativos para as amostras de urina estão ilustrados na FIGURA 4.1. Os espectros dos íons deconvoluídos das análises RPLC e HILIC nas modalidades ESI (+/-) das amostras de plasma e urina estão representados nas FIGURA 4.2 e FIGURA 4.3, respectivamente.

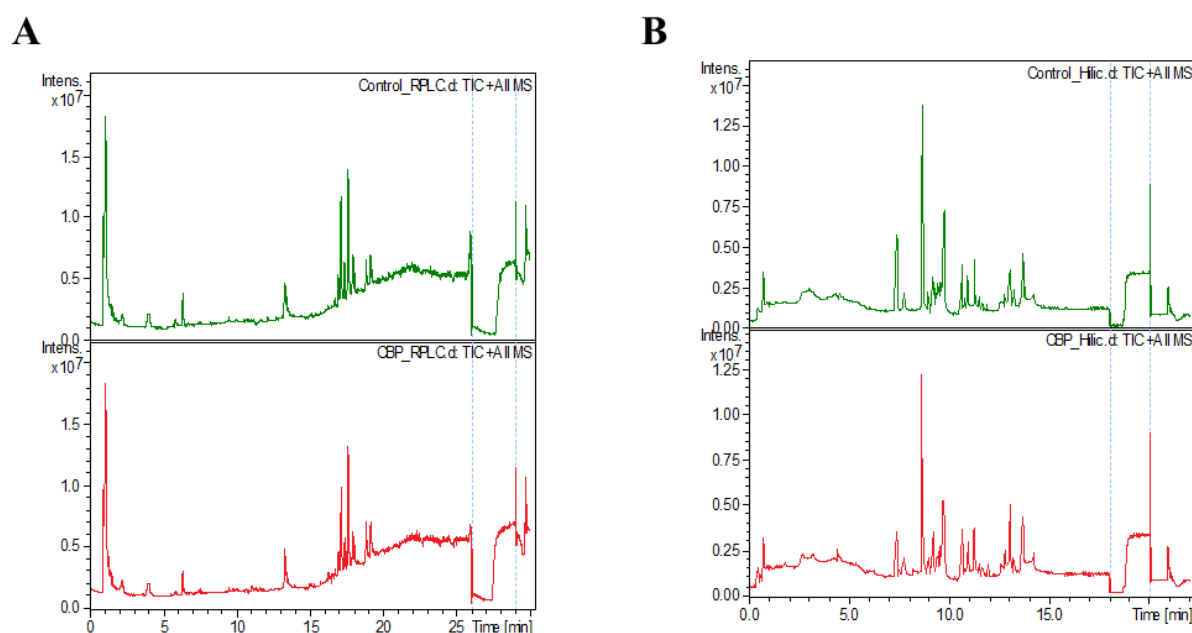


FIGURA 4.1 Cromatogramas de íons totais (TIC) das amostras de urina obtidos por LC-HRMS.

(A) Amostras de voluntários dos grupos CS (■) e CBP (■) analisadas no modo RPLC ESI (+).

(B) Amostras de urina dos grupos CS (■) e CBP (■) analisadas no modo HILIC ESI (+).

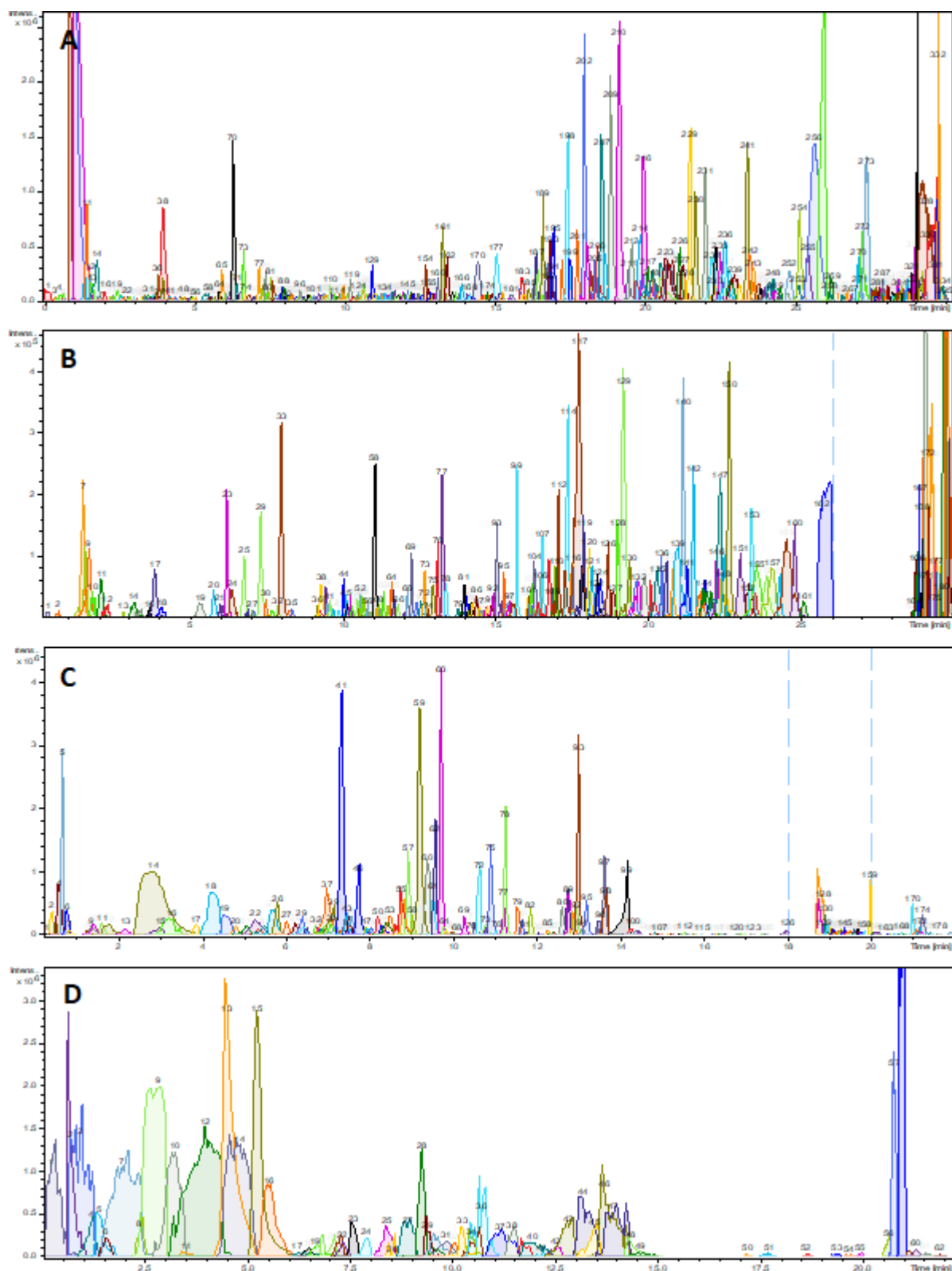


FIGURA 4.2 Espectros dos íons totais deconvoluídos das amostras de plasma obtidas pelas análises LC-HRMS. **(A)** RPLC (ESI +); **(B)** RPLC (ESI -); **(C)** HILIC (ESI +); **(D)** HILIC (ESI -).

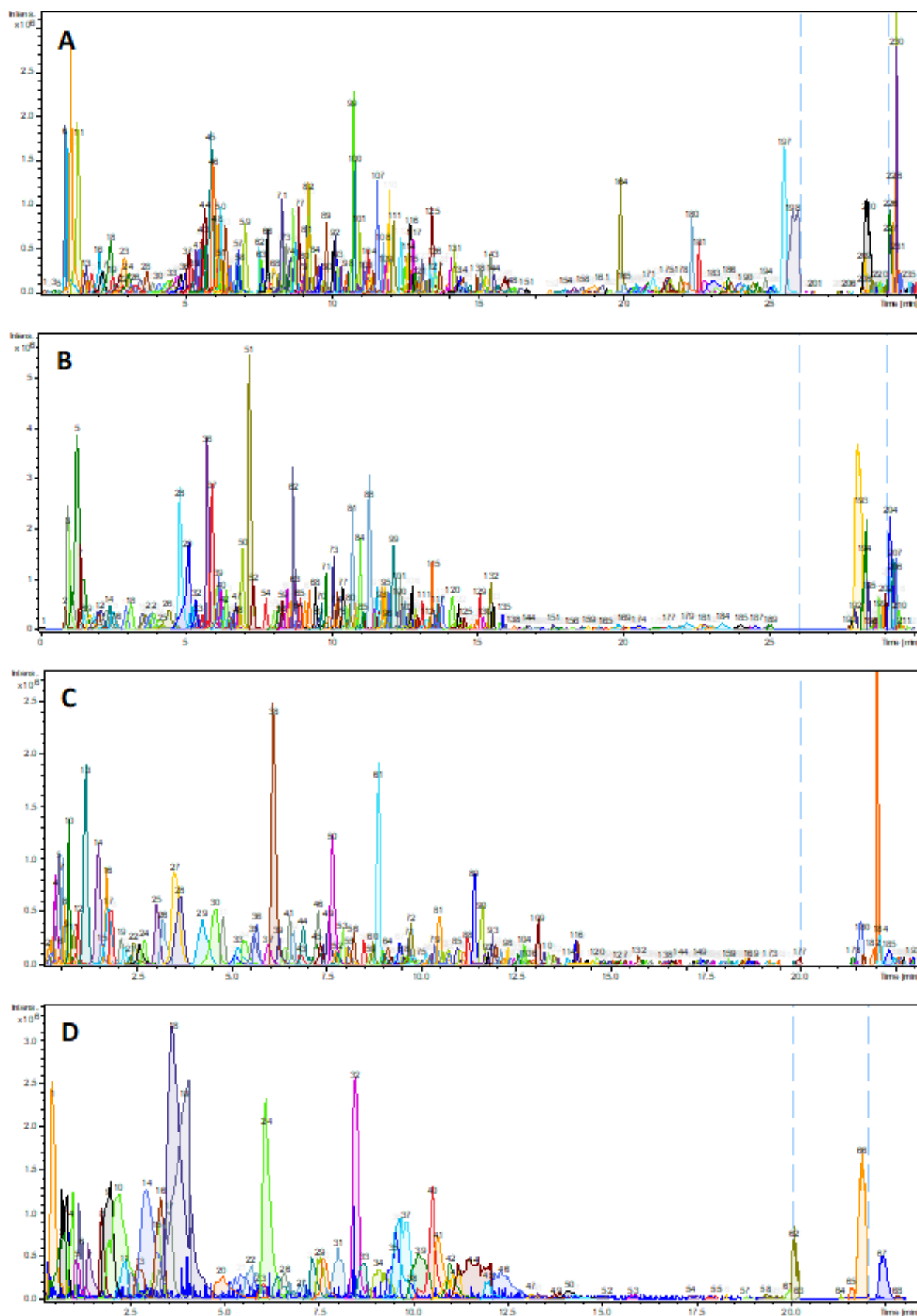


FIGURA 4.3 Espectros dos íons totais deconvoluídos das amostras de urina obtidas pelas análises LC-HRMS. **(A)** RPLC (ESI +); **(B)** RPLC (ESI -); **(C)** HILIC (ESI +); **(D)** HILIC (ESI -).

Os metabólitos foram putativamente identificados com base na massa exata e nos padrões de fragmentação espectral utilizando as bases de dados HMDB e *MassBank* em comparação com os espectros obtidos experimentalmente, conforme mostrado na FIGURA 4.4.

As análises de metabolômica *untargeted*, fundamentado em LC-HRMS/MS, resultou na identificação de 47 metabólitos estatisticamente significativos nas amostras de plasma de indivíduos com CBP e de 46 metabólitos significativos nas amostras de urina ($p \leq 0,05$).

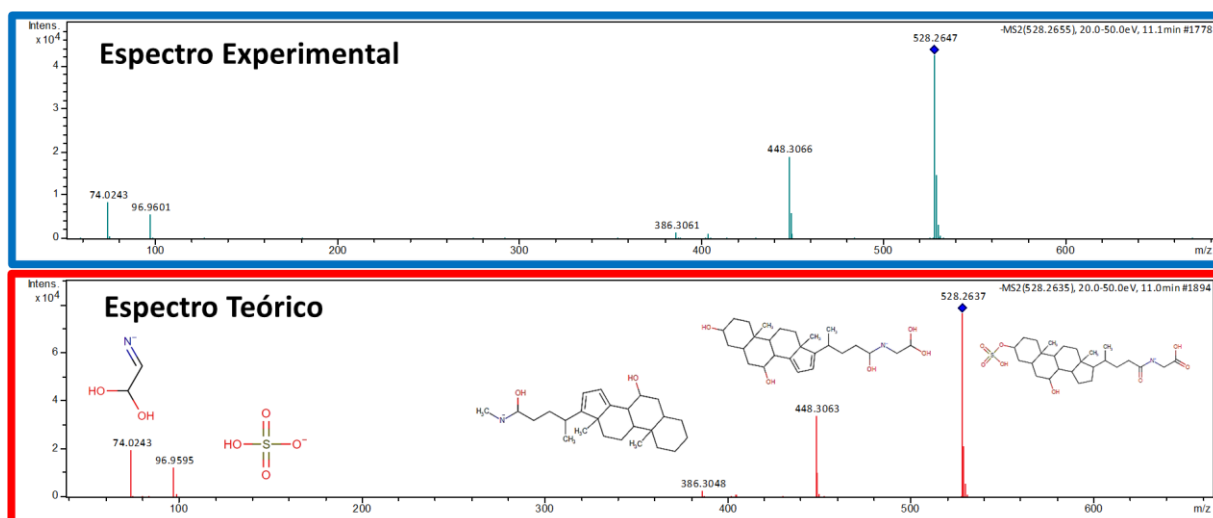


FIGURA 4.4 Representação da identificação do ácido glicoquadenodeoxicólico (GCDCA) em amostras de plasma, através da comparação entre o espectro experimental obtido nas análises LC-HRMS e o espectro de massas teórico disponível nas bibliotecas online.

Os modelos PLS-DA baseados nos conjuntos de dados das amostras de plasma e nas amostras de urina indicaram uma diferenciação confiável entre os grupos (CBP e CS). A robustez do modelo PLS-DA foi validada por testes de permutação ($p < 0,001$) e a qualidade do modelo multivariado foi avaliada pelos coeficientes de correlação (R^2) e coeficiente de predição (Q^2) do modelo. Para as amostras de plasma foram alcançados valores de $Q^2(Y) = 0,887$, $R^2(Y) = 0,905$, $R^2(\text{cum}) = 0,979$ e $Q^2(\text{cum}) = 0,793$, conforme mostrado na FIGURA 4.5. Para as amostras de urina foram obtidos valores de $Q^2 = 0,716$, $R^2Y = 0,762$, $R^2(\text{cum}) = 0,945$ (cum) e $Q^2(\text{cum}) = 0,732$, conforme mostrado na FIGURA 4.6.

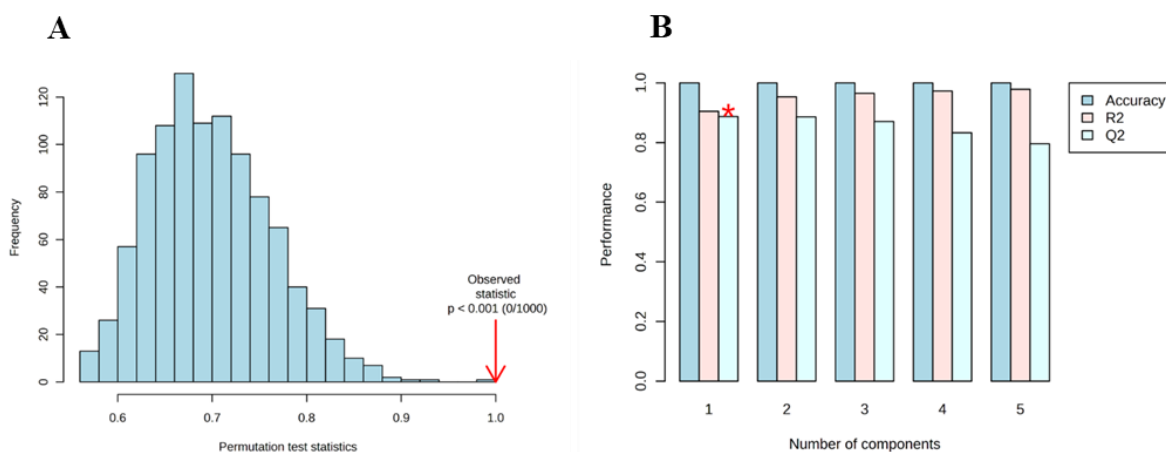


FIGURA 4.5 Análise multivariada de metabolômica *untargeted* usando PLS-DA para amostras de plasma. **(A)** Histograma do resultado dos testes de permutação. **(B)** Gráficos de barras das medidas de desempenho (precisão, R2 e Q2), com diferentes números de componentes. *Indica os melhores valores das medidas de desempenho que foram selecionadas (Q2). Parâmetros da modelagem para amostras de plasma, Q2 = 0,887, R2Y = 0,905, R2X = 0,979 (cum) e $p \leq 0,001$.

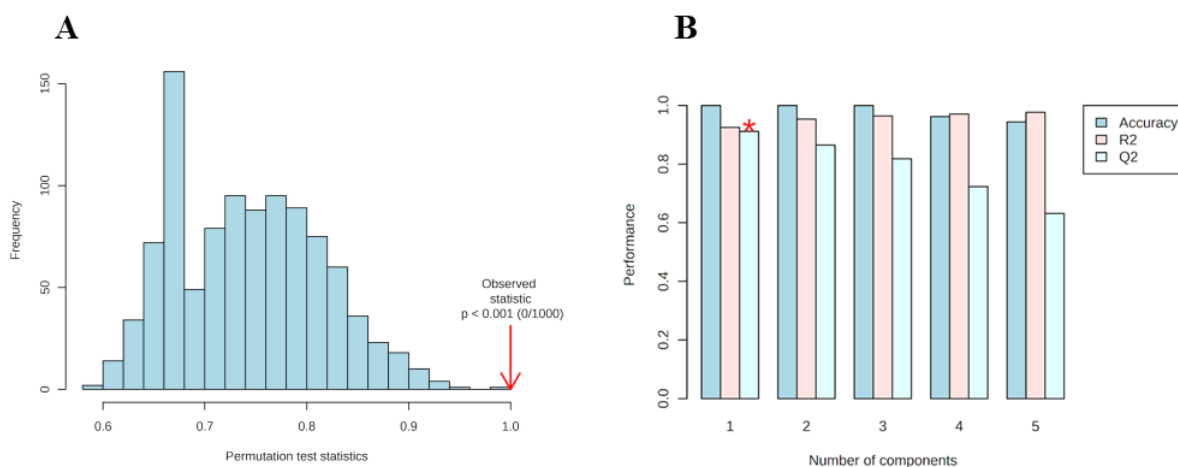


FIGURA 4.6 Análise multivariada de metabolômica *untargeted* usando PLS-DA para amostras de urina. **(A)** Histograma do resultado dos testes de permutação. **(B)** Gráficos de barras das medidas de desempenho (precisão, R2 e Q2) usando diferentes números de componentes. *Indica os melhores valores das medidas de desempenho que foram selecionadas (Q2). Parâmetros de modelagem para amostras de urina, Q2 = 0,709, R2Y = 0,757, R2(cum) = 0,943 (cum), Q2(cum) = 0,693 e $p \leq 0,001$.

O modelo PLS-DA mostrado na FIGURA 4.7 (A-B) para as amostras de plasma e urina, respectivamente, foi usado como medida de desempenho para discriminar entre os grupos CBP e CS e estabelecer um modelo diagnóstico. Com

base no VIP score ≥ 1 , o PLS-DA revelou 15 metabólitos no plasma, sendo esses: histidina, LPC(16:0), LPC(18:2), glutamilserina, sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEA-S), aspartil-hidroxiprolina, pseudouridina, LPC(18:1), alilcisteína, PC(16:0/16:0), ácido láctico, acetilcarnitina, LPC(P-16:0) ou LPC(O-16:1), ácido glicodeoxicólico (GDCA) e ácido glicoquenodesoxicólico (GCDCA), conforme mostrado na FIGURA 4.8.

Para as amostras de urina, com base no VIP score ≥ 1 , foram destacados 15 metabólitos, sendo esses: etil-lisina, leucina, 3-metil-histidina, glicodeoxicolato 3-glicuronídeo (GCDCA 3-glicuronídeo), isoleucina, beta-(pirazol-1-il)-alanina, urocanato, dimetilarginina, serina, 6-ceto-decanoilcarnitina, prolina, pseudouridina, ácido glicodeoxicólico (GDCA), ácido glicolítico (GLCA) e 2-octaoilcarnitina (FIGURA 4.9) como principais metabólitos no fator de classificação. Esses metabólitos evidenciaram níveis alterados de diferentes classes de compostos, constituídos por ácidos biliares específicos, fosfolipídios, ácidos graxos, aminoácidos e carnitinas no plasma ou na urina.

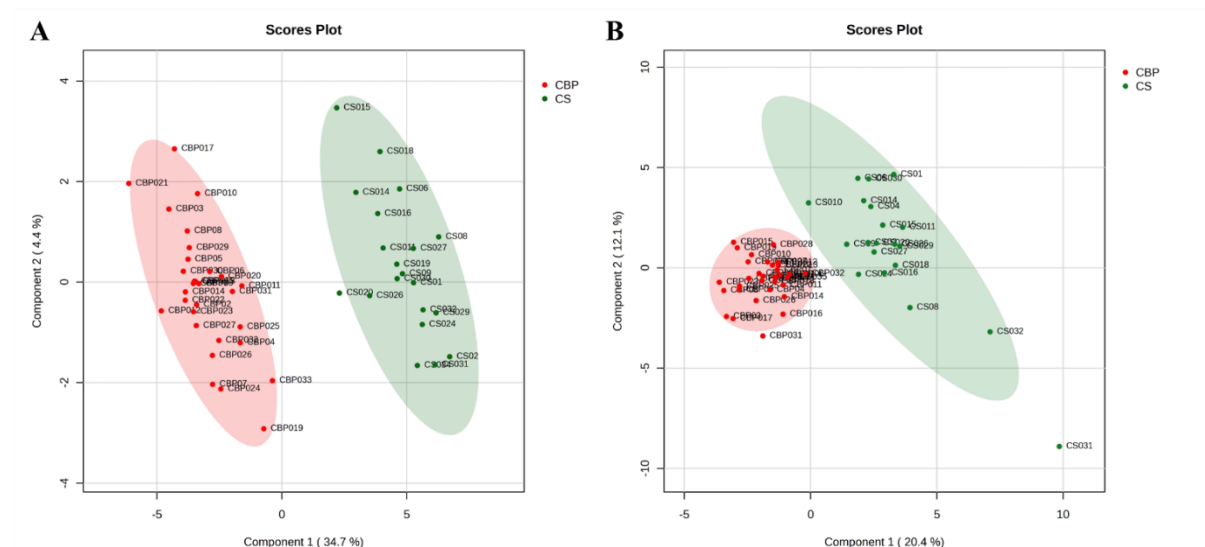


FIGURA 4.7 Gráficos de dispersão de scores com base nos modelos PLS-DA da análise multivariada e nos modos de ionização ESI(+) e ESI(-) obtidas das análises LC-HRMS/MS. **(A)** Amostras de plasma (n=50) entre os grupos CBP e CS; **(B)** Amostras de urina (n=50) entre os grupos CBP e CS. Grupo CBP (■) e o grupo CS (■).

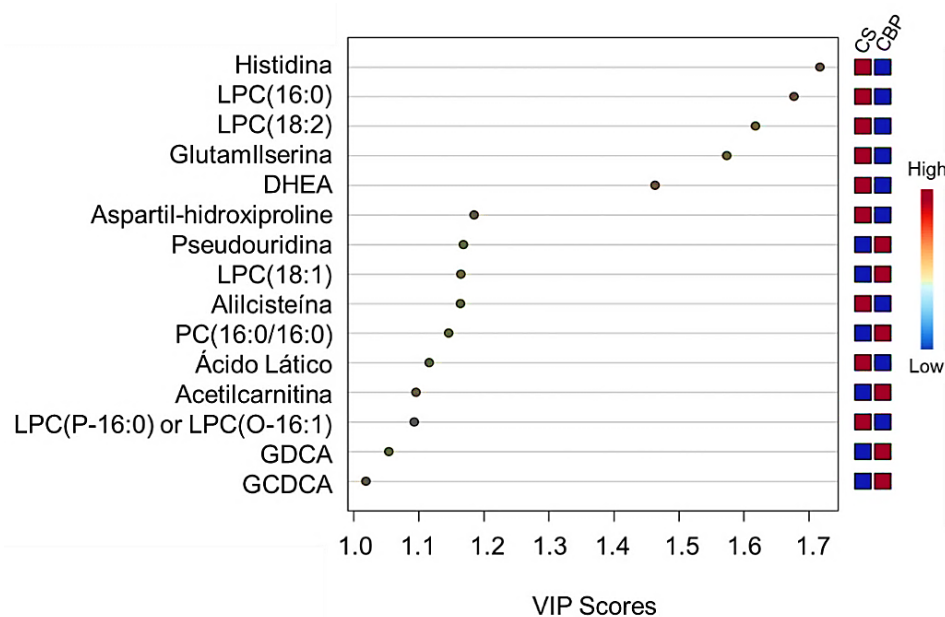


FIGURA 4.8 VIP scores obtidos a partir do modelo PLS-DA provenientes das análises das amostras de plasma. As caixas coloridas indicam se a concentração do metabólito está aumentada (■) ou diminuída (■) em comparação ao grupo CS.

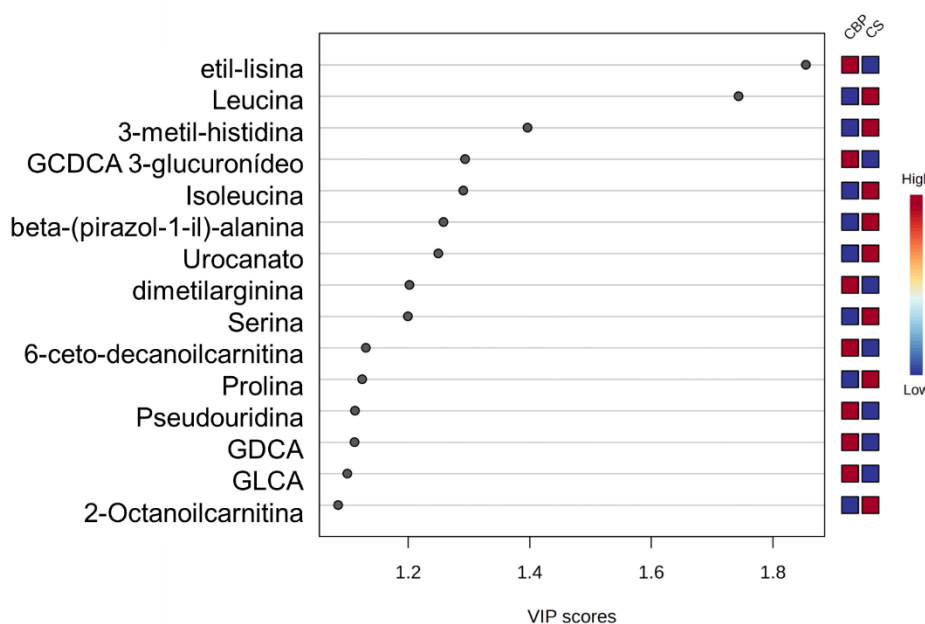


FIGURA 4.9 VIP scores obtidos a partir do modelo PLS-DA provenientes das análises das amostras de urina. As caixas coloridas indicam se a concentração do metabólito presente no grupo CBP está aumentada (■) ou diminuída (■) em comparação ao grupo CS.

Para avaliar a precisão da capacidade preditiva, o método PLS-DA foi empregado para obter a área sob a curva (AUC) com base nas curvas características de operação do receptor (ROC). Essas curvas foram geradas usando desempenho de validação cruzada de Monte Carlo (MCCV, do inglês: *Monte Carlo cross validation*). A curva ROC serviu como medida de desempenho do teste, ou seja, para indicar a eficácia do diagnóstico entre indivíduos com CBP e do grupo CS. Isso ajudou a estabelecer um ponto de corte diagnóstico para amostras de plasma e urina (FIGURA 4.10A e FIGURA 4.10B), respectivamente. Em uma curva ROC, o eixo *x* representa a taxa de falsos positivos (1 - especificidade), enquanto o eixo *y* representa a taxa de verdadeiros positivos (sensibilidade) conforme observado na TABELA 4.1. Uma curva ROC ideal se aproxima do canto superior esquerdo do gráfico, onde a sensibilidade é alta e a taxa de falsos positivos é baixa, indicando um excelente desempenho do modelo.

Observou-se que as curvas ROC apresentaram um bom desempenho preditivo, com AUC variando de 0,999 (IC 95%: 0,993-1) para a discriminação de metabólitos presentes nas amostras de plasma (FIGURA 4.10A) e de 0,979 (IC 95%: 0,952-1) para discriminação de metabólitos urinários (FIGURA 4.10B). De acordo com os resultados obtidos, 08 metabólitos apresentaram um bom desempenho preditivo em plasma e 07 metabólitos em amostras de urina. Esses metabólitos, obtiveram um $AUC \geq 0,907$, uma ampla faixa de sensibilidade (50,0 – 96,7%) e especificidade (85,0 - 100%), conforme mostrado na TABELA 4.1. O estudo avaliou a precisão diagnóstica de metabólitos individuais usando as curvas ROC (FIGURA 4.10A-B). Os resultados mostraram que ácidos biliares como o sulfato de glicoquenodeoxicólico (GCDCA 3-sulfato), sulfato de glicoursodeoxicolato (GUDCA 3-sulfato) e o 3-glicuronídeo de glicoquenodeoxicólico (GCDCA 3-glicuronídeo), juntamente com aminoácidos e fosfolipídios, tiveram um impacto significativo na precisão diagnóstica. O intervalo de confiança (CI) para essas descobertas foi de 95%.

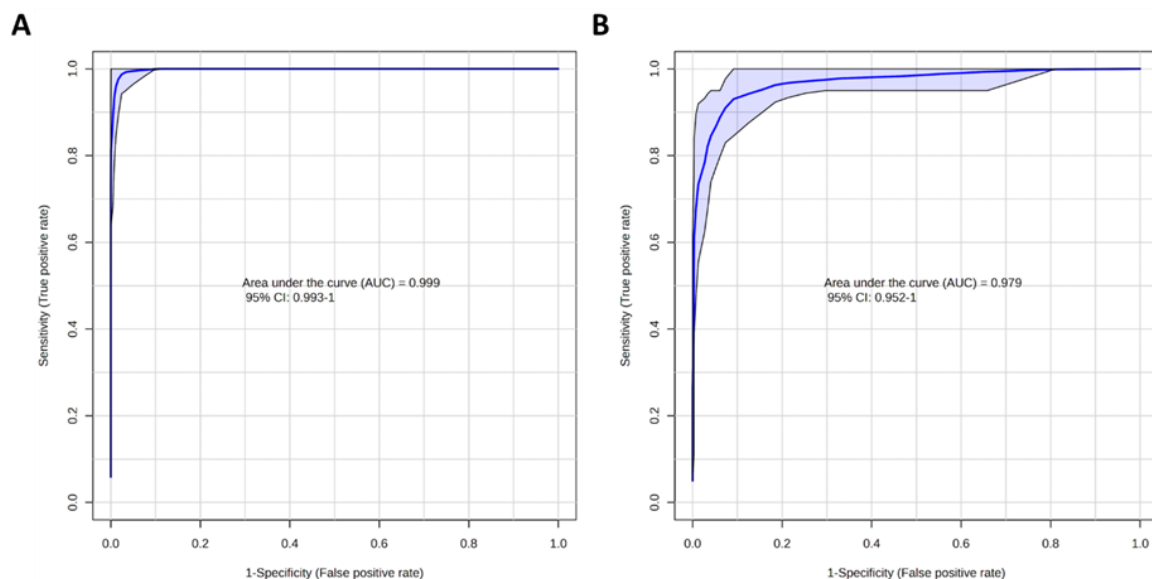


FIGURA 4.10 Curvas ROC pelo método estatístico multivariado no ponto de corte ideal definido pela distância mínima para o canto superior esquerdo. **(A)** Modelo otimizado gerou AUC de 0,999 (IC 95%: 0,993–1) a partir de amostras de plasma. **(B)** Modelo otimizado gerou AUC de 0,979 (IC 95%: 0,952–1) a partir de amostras de urina.

TABELA 4.1 Modelos de previsão a partir da regressão logística e análise da curva ROC dos metabólitos individuais em amostras de plasma e urina (AUC) $\geq$ 0,907.

Metabólito	AUC	95% CI	Sensibilidade	Especificidade	Matriz
Glutamilerina	0.993	0.971 - 1	0.967 (0.9-1)	0.9 (0.774-1)	Plasma
GCDCA 3-sulfato	0.992	0.970 - 1	0.848(0.758-0.955)	1(1-1)	Urine
GUDCA 3-sulfato	0.972	0.913 - 1	0.567(0.433-0.751)	1 (1-1)	Plasma
GDCA	0.972	0.915 - 1	0.6 (0.483-0.767)	1 (1-1)	Plasma
LPC(18:2)	0.971	0.915 - 1	0.967 (0.9-1)	0.85(0.7-0.976)	Plasma
LPC(16:0)	0.967	0.888 - 1	1 (1-1)	0.85 (0.7-1)	Plasma
Histidina	0.955	0.859 - 1	0.933 (0.849-1)	0.95 (0.85-1)	Plasma
β -(Pirazol-1-yl)-alanina	0.941	0.858 - 1	0.788(0.636-0.909)	1 (1-1)	Urine
3-metil-histidina	0.938	0.860 – 0.985	0.818(0.667-0.939)	0.95(0.824-1)	Urine
1-metil-adenosina	0.936	0.841 – 0.987	0.818(0.681-0.939)	0.85 (0.70-1)	Urine
Fenilalanine	0.935	0.857 – 0.986	0.727(0.606-0.848)	0.9(0.75-1)	Urine
N6,N6,N6-Trimetil-lisina	0.921	0.835 – 0.979	0.818(0.667-0.909)	0.95(0.824-1)	Urine
GCDCA 3-glicuronídeo	0.920	0.817 – 0.983	0.5(0.333-0.667)	1 (1-1)	Plasma
LPE(16:1)	0.913	0.795 – 0.987	0.533(0.367-0.717)	0.95(0.9-1)	Plasma
Dimetilarginina	0.907	0.803 – 0.974	0.788(0.667-0.925)	0.9(0.8-1)	Urine

Com base nos scores VIP ($p < 0,05$), foram obtidos mapas de correlação usando a correlação de Pearson (r). Em amostras de plasma (FIGURA

4.11A), observamos uma forte correlação positiva entre LPC (16:0) e histidina ($r = 0,92$), bem como LPC (16:0) e glutamylserina ($r = 0,84$) e LPC (16:0) e DHEA-S ($r = 0,65$). Da mesma forma, para LPC(18:2), foram observadas correlações significativas com histidina ($r = 0,86$), glutamylserina ($r = 0,84$), DHEA-S ($r = 0,66$) e LPC(16:0) ($r = 0,93$). Além disso, uma correlação positiva foi identificada entre pseudouridina e os ácidos biliares GCDCA ($p = 0,52$) e GDCA ($p = 0,58$), assim como com PC (16:0/16:0) ($r = 0,52$).

Para amostras de urina, a análise baseada em mapas de correlação revelou uma correlação positiva significativa entre ácidos biliares, carnitina e acilcarnitina. Especificamente, 5-beta-ciprinolsulfato, um intermediário na biossíntese de ácidos biliares, o qual exibiu uma alta correlação positiva com 9-decenoilcarnitina ($r = 0,80$) e 6-ceto-decanoilcarnitina ($r = 0,88$). Além disso, GCDCA mostrou uma correlação positiva com carnitina ($r = 0,64$) e 9-decenoilcarnitina ($r = 0,63$). Outro resultado obtido foi a forte correlação entre ácidos graxos, especificamente docosatrieno e ácido 3-carboxi-4-metil-5-pentil-2-furanpropanoico (3-CMPFP), com 5-beta-ciprinolsulfato ($r = 0,96$ e $r = 0,88$, respectivamente), como mostrado na FIGURA 4.11B.

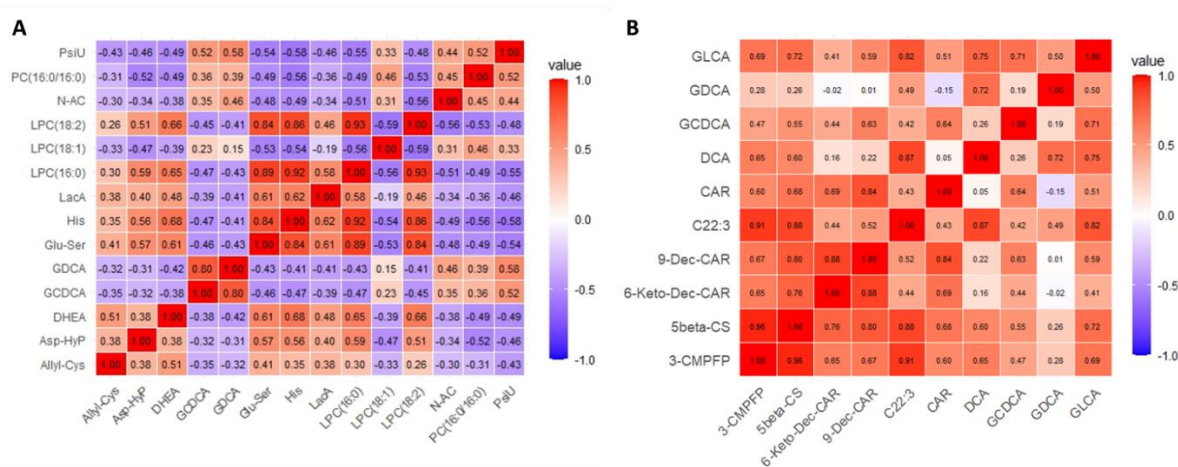


FIGURA 4.11 Matrizes de correlação baseadas nos metabólitos VIPs ≥ 1 . Correlações negativas entre os metabólitos são exibidas em e correlações positivas em . A intensidade da cor é proporcional ao coeficiente de correlação, sendo mais forte quanto mais próximo de -1 ou 1.

(A) Tabela de correlação referente aos metabólitos VIP scores do plasma LPC: lisofosfatidilcolina; PC: fosfatidilcolina; GCDCA: ácido glicoquenodeoxicólico; GDCA: ácido glicodeoxicólico; DHEA-S: sulfato de dehidroepiandrosterona; PsiU: pseudouridina; N-AC: N-acetilcarnitina; LaCA: ácido láctico; His:

Histidina; Glu-Ser: Glutamilserina; Asp-HyP: Aspartil-hidroxiprolina; Allyl-Cys: Allyl-cisteína.

(B) Tabela de correlação relacionados aos metabólitos VIPs scores da urina: ácido glicolítico; GCDCA 3-sulfate: ácido glicoquenodesoxicólico 3-glicuronídeo; GDCA: ácido glicodeoxicólico; GCDCA: ácido glicoquenodesoxicólico; DCA: ácido desoxicólico; CAR: carnitina; C22:3: Docosatrienoato; 9-Dec-CAR: 9-decenoilcarnitina; 6-Keto-CAR: 6-ceto-decanoilcarnitina; 5beta-CS: 5beta-ciprinolsulfato; 3-CMPFP: ácido 3-carboxi-4-metil-5-pentil-2-furanpropanóico.

Análises funcionais das vias metabólicas foram realizadas para identificar prováveis processos metabólicos e as potenciais associações com a CBP. O nível significativo para a via metabólica foi determinado como $p \leq 0,05$. No contexto das amostras de plasma (FIGURA 4.12), foram reveladas nove vias metabólicas significativamente modificadas nos pacientes com CBP. Foram observadas alterações significativas nas biossínteses de perfil lipídico, sendo esses o metabolismo de ácidos biliares ($p = 0,00147$), oxidação de ácidos graxos de cadeia ramificada ($p = 0,02$) e a biossíntese de fosfolipídios ($p = 0,0247$).

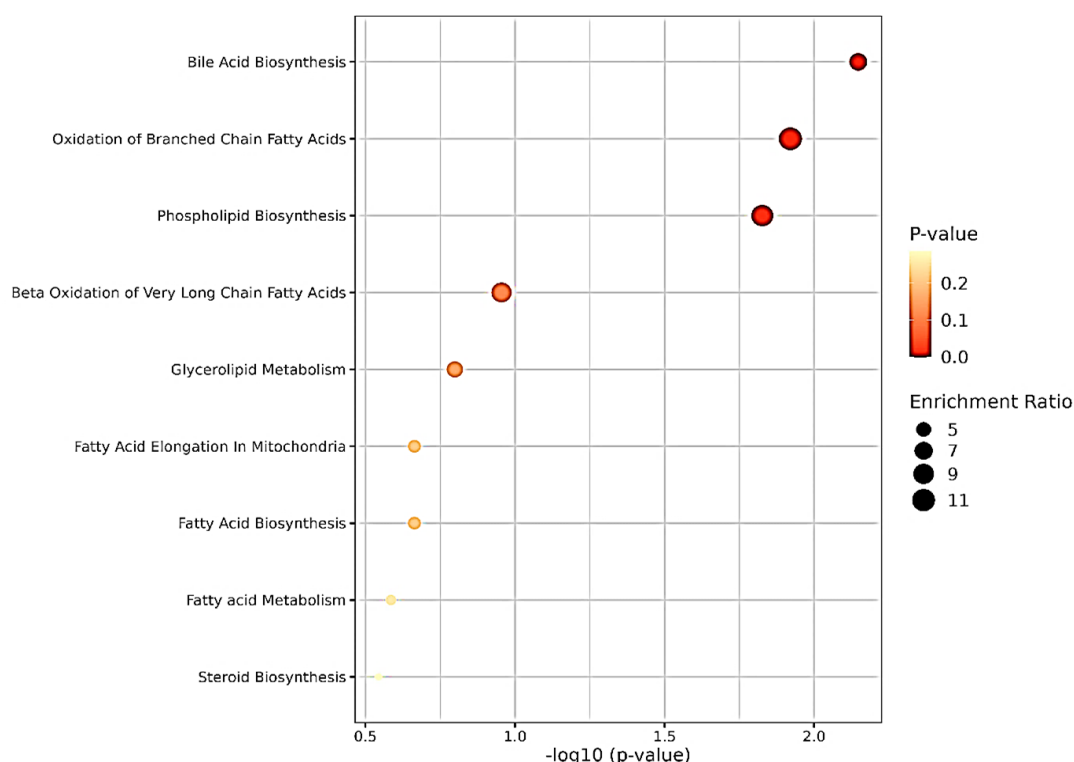


FIGURA 4.12 Mapeamento das vias metabólicas impactadas entre os grupos CBP *versus* CS em amostras de plasma. O eixo x representa o impacto da via metabólica, enquanto o eixo y representa o $-\log(p\text{-value})$. A cor varia de amarelo claro a vermelho escuro, indicando o nível de significância do enriquecimento, e o tamanho do círculo reflete o nível da taxa de enriquecimento.

Os resultados revelaram que os indivíduos com CBP apresentam níveis alterados de aminoácidos e seus derivados, ácidos biliares, carnitinas, nucleotídeos e esteroides, em ambas as amostras de plasma e urina. Embora os ácidos biliares sejam afetados em ambos os biofluidos, eles são mais proeminentemente alterados em amostras de plasma do que em urina. Por outro lado, o impacto na biossíntese de aminoácidos foi mais evidente em amostras de urina do que em plasma. Isso confirma nossa hipótese original de que a análise de ambas as matrizes biológicas oferece um maior potencial investigativo, proporcionando uma análise metabolômica mais abrangente. Em geral, as descobertas aqui relatadas demonstram que a CBP está associada a distúrbios metabólicos envolvendo múltiplas vias, como aminoácidos, biossíntese de ácidos biliares e metabolismo de glicerofosfolipídios, indicando o favorecimento do desenvolvimento progressivo de inflamação e fibrose hepática.

4.1 Níveis Alterados de Fosfolipídios em Amostras de Plasma de Pacientes com CBP

A desregulação lipídica desempenha um papel importante no desenvolvimento e progressão de doenças hepáticas, uma vez que os lipídios representam um grupo diversificado de biomoléculas com estruturas complexas. Os lipídios estão envolvidos em vários processos biológicos no corpo, desde armazenamento e metabolismo de energia até regulação epigenética, transdução de sinal, regulação imunológica, inflamação e reconhecimento celular (TORRES et al., 2021). Os fosfolipídios são conhecidos por suas estruturas anfipáticas e são considerados emulsificadores potentes de moléculas hidrofóbicas, como certos ácidos biliares. A concentração de fosfolipídios na bile hepática humana desempenha um papel importante na secreção de colesterol biliar (BOYER, 2013). Os principais fosfolipídios biliares são fosfatidilcolinas (PC), mas pequenas concentrações de lisofosfatidilcolinas (LPC), fosfatidiletanolaminas (PE) e esfingomielinas (SM) também estão presentes (HAUTON, 1976).

No presente estudo, há evidências de desregulação de lipídios ao avaliar o plasma de indivíduos com CBP em relação ao CS, principalmente relacionados à fosfatidilcolina (PC) e lisofosfatidilcolina (LPC), (TABELA 4.2). De 14 lipídios, 7 deles [LPC(P-16:0) ou LPC(O-16:1); LPC(P-18:0) ou LPC(O-18:1); LPC (16:0); LPC (18:2); LPC (20:4); LPC (22:6); e PC (22:0/6 ceto-PGF1alpha)] mostram um padrão de regulação negativa nos níveis plasmáticos, enquanto 6 lipídios [LPC (18:1), LPC (20:1); LPC (20:5); PC (16:0/16:0), PC (20:3/16:0), PC (20:5/16:0) e LPE(16:1)] mostraram regulação positiva.

O valor de FC da razão das médias de PCs totais em relação as médias de LPCs totais no grupo CBP (TABELA 4.2) mostra um $FC = 1,78$ ($p < 0,00076$), indicando níveis aumentados de PCs no grupo CBP, sendo uma resposta ao tratamento com UDCA. O UDCA reduz significativamente a saturação de colesterol na bile, inibindo a absorção de colesterol no intestino e sua secreção na bile (RESHETNYAK; MAEV, 2022), promovendo uma redução no conteúdo de LPC. Os resultados apresentados estão de acordo com a administração de UDCA e podendo ser usados para monitorar a eficácia no progresso do tratamento da CBP.

LPC é um precursor do ácido lisofosfatídico (LPA), que está associado a várias doenças pruriginosas. O prurido severo é um fator-chave que prejudica a qualidade de vida de pacientes que sofrem de doenças hepáticas colestáticas; além de ser um sintoma debilitante, o tratamento do prurido ainda é uma necessidade médica não atendida. Um passo fundamental para entender a patogênese do prurido colestático foi a observação de que os níveis de LPA estão significativamente aumentados no soro de pacientes com coceira colestática (KREMER et al., 2010), cuja magnitude aumenta significativamente com a gravidade do prurido. O LPA é produzido pela ação da enzima lisofosfolipase D autotaxina (ATX), que hidrolisa LPC em LPA e colina. Portanto, níveis mais baixos de LPC reduzem a produção de LPAs e, em seguida, diminuem o prurido em pacientes, o que também auxilia no manejo do tratamento. Além da relação com prurido, níveis diminuídos de LPC também foram observados em várias condições inflamatórias, incluindo sepse, artrite reumatóide, diabetes, esquizofrenia, síndrome dos ovários policísticos, doença de Alzheimer, hipertensão arterial pulmonar, envelhecimento, asma e cirrose hepática (LIU et al., 2020).

Recentemente, LPC (18:1) também foi identificado como o subtipo de fosfolípídio mais pruriginoso, induzindo prurido por meio da comunicação entre epitélio e neurônios sensoriais, ativando diretamente o TRPV4 da queratinócito da pele (CHEN et al., 2021). Neste trabalho, os resultados mostram que o LPC(18:1) sozinho foi regulado positivamente em 220% no grupo CBP ($FC = 2,2$; $p < 0,00001$). Os níveis de outros lisofosfolípídios individuais, como LPC(20:1) ($FC = 1,7$; $p = 0,0000516$) e LPC(20:5) ($FC = 2,2$; $p = 0,00227$), diferiram significativamente no grupo CBP em relação ao grupo CS. Esses dados foram apresentados em gráficos *boxplot*, que mostram a distribuição de valores normalizados para cada característica. Os valores do grupo CS foram normalizados para 1, o que serviu como linha de base para fins de comparação. Nestes gráficos, um valor de 1 indica equivalência à média do grupo controle.

Valores > 1 indicam um aumento no nível de metabólito, enquanto valores < 1 indicam uma diminuição. As diferenças em relação à linha de base (valor 1) refletem mudanças biológicas significativas entre os grupos CBP e CS, como mostrado na FIGURA 4.13.

TABELA 4.2 Resumo da regulação de fosfatidilcolina (PC), lisofosfatidilcolina (LPC) e lisofosfatidiletanolamina (LPE) em amostras de plasma de pacientes com CBP e grupo CS.

Metabólito	Fórmula Molecular	Regulação	CBP (n=30)	CS (n=20)	P-value
		CBP vs. CS	Média $\pm$ SD	Média $\pm$ SD	
LPC(P-16:0) or LPC(O-16:1)	C ₂₄ H ₅₀ NO ₆ P	↓	0.6782 $\pm$ 0.1375	1.0342 $\pm$ 0.3759	0.0023
LPC(P-18:0) or LPC(O-18:1)	C ₂₆ H ₅₄ NO ₆ P	↓	0.6294 $\pm$ 0.2636	0.9204 $\pm$ 0.4538	0.006
LPC (16:0)	C ₂₄ H ₅₀ NO ₇ P	↓	0.0918 $\pm$ 0.0480	0.5116 $\pm$ 0.1816	< 0.00001
LPC (18:1)	C ₂₆ H ₅₂ NO ₇ P	↑	1.2628 $\pm$ 0.5560	0.5745 $\pm$ 0.2055	< 0.00001
LPC (18:2)	C ₂₆ H ₅₀ NO ₇ P	↓	0.1127 $\pm$ 0.0692	1.0140 $\pm$ 0.4439	< 0.00001
LPC (20:1)	C ₂₈ H ₅₆ NO ₇ P	↑	1.2630 $\pm$ 0.5947	0.7443 $\pm$ 0.3259	0.00005
LPC (20:4)	C ₂₈ H ₅₀ NO ₇ P	↓	0.7789 $\pm$ 0.2455	1.0502 $\pm$ 0.3852	0.024
LPC (20:5)	C ₂₈ H ₄₈ NO ₇ P	↑	1.0572 $\pm$ 0.9688	0.4847 $\pm$ 0.3572	0.00227
LPC (22:6)	C ₃₀ H ₅₀ NO ₇ P	↓	0.6165 $\pm$ 0.2843	1.0502 $\pm$ 0.3852	0.00022
LPE (16:1)	C ₂₁ H ₄₂ NO ₇ P	↑	1.6202 $\pm$ 0.8896	0.6979 $\pm$ 0.3937	< 0.00001
PC (16:0/16:0)	C ₄₀ H ₈₀ NO ₈ P	↑	2.1200 $\pm$ 0.7967	1.1335 $\pm$ 0.4145	< 0.00001
PC (20:3/16:0)	C ₄₄ H ₈₂ NO ₈ P	↑	1.1976 $\pm$ 0.6103	0.6195 $\pm$ 0.3337	0.000181
PC (20:5/16:0)	C ₄₄ H ₇₈ NO ₈ P	↑	1.7803 $\pm$ 0.7610	1.0771 $\pm$ 0.7734	0.00314
PC (22:0/6 ceto-PGF1)	C ₅₀ H ₉₄ NO ₁₂ P	↓	0.4575 $\pm$ 0.3867	0.6968 $\pm$ 0.3275	0.0079

A significância foi calculada usando o teste *t-Student* $*p \leq 0.05$. *Os resultados são apresentados como médias de valores normalizados, e os valores *p* são derivados de testes estatísticos para determinar a significância das alterações observadas.

Observações:

"↓" indica uma redução nos níveis do fosfolípido.

"↑" indica um aumento nos níveis do fosfolípido.

"FC" é a medida de alteração em relação ao grupo de controle.

"*p-value*" é o valor de significância estatística.

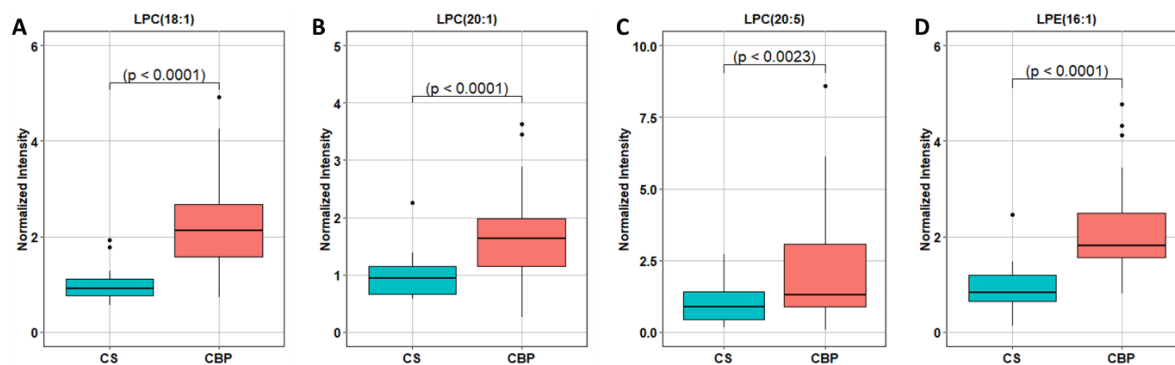


FIGURA 4.13 Boxplots (*box-and-whisker*) para fosfolipídios em amostras de plasma de pacientes com CBP vs. grupo CS. O eixo y representa as intensidades normalizadas dos metabólitos. **(A)** LPC(18:1); **(B)** LPC(20:1); **(C)** LPC(20:5); e **(D)** LPE(16:1). O boxplot representa a faixa interquartil (IQR), abrangendo a maioria dos dados, enquanto as extremidades (“*whiskers*”) se estendem aos valores extremos. A significância estatística foi avaliada usando o teste *t-Student*, com um limiar de $p \leq 0,05$.

LPE(16:1), o único lipídio estatisticamente significativo desta sub-espécie, apresentou níveis expressivamente aumentados ($FC = 2,32$; $p < 0,00001$) (FIGURA 4.13D). A fosfatidiletanolamina (PE) representa aproximadamente 30% dos lipídios mitocondriais, juntamente com a fosfatidilcolina (PC; ~40%), a cardiolipina (CL) e a fosfatidilinositol (PI), que juntos representam ~10 a 15%, e o ácido fosfático (PA) e a fosfatidilserina (PS) que somam aproximadamente 5% dos fosfolipídios mitocondriais totais (OSMAN; VOELKER; LANGER, 2011).

A lisofosfatidiletanolamina (LPE) é um produto desacetilado da hidrólise da fosfatidiletanolamina (PE) induzida pela fosfolipase A1/A2 (PLA1/PLA2). A LPE possui uma estrutura semelhante à LPC, mas com grupo terminal etanolamina ao invés de colina. No entanto, se a LPE tem um efeito semelhante à LPC na colestase hepática, essa informação ainda é desconhecida. Em trabalhos já reportados, foi demonstrado que a LPE(18:2) afetou o acúmulo e o metabolismo de lipídios em uma linhagem celular hepática humana (YAMAMOTO et al., 2022) e desempenhou um papel patológico na indução de doença hepática gordurosa. Portanto, há evidências da importância da LPE(18:2) para doenças hepáticas. Assim, estudos adicionais usando metabolômica *target* devem ser conduzidos para determinar se as LPEs, especificamente a LPE(18:2), podem ser utilizadas como um novo biomarcador para o monitoramento da CBP, com e sem o emprego de UDCA. Além disso, diante da falta de biomarcadores de diagnósticos específicos para os diferentes tipos de doenças hepáticas colestáticas,

é importante investigar a capacidade preditiva dos LPEs em diferenciar entre CBP (colangite biliar primária), CEP (colangite esclerosante primária) e PFIC3 (colestase intra-hepática familiar progressiva tipo 3), o que poderia levar ao estabelecimento de uma ferramenta diagnóstica importante.

Os resultados obtidos das amostras de plasma para fosfolipídios sugerem que a perturbação nos lipídios no grupo CBP leva a alterações na composição de fosfolipídios, especialmente PC, LPC e LPE. Um aspecto importante é que as alterações nos níveis de fosfolipídios podem contribuir para a gravidade da doença afetando a liberação de ácidos biliares no duodeno, prejudicando a digestão e absorção de nutrientes solúveis em gordura (SAEED et al., 2017).

4.2 Níveis Alterados de Ácidos Biliares, Carnitina, Ácidos Graxos e Esteroides em Amostras de Plasma e Urina de Pacientes com CBP

A bile consiste principalmente em água, ácidos biliares (BAs), fosfolipídios, bilirrubina, colesterol e sais inorgânicos. Os BAs são produzidos pelo fígado durante o metabolismo do colesterol produzindo os ácidos biliares primários, sendo esses o ácido cólico (CA) e ácido quenodesoxicólico (CDCA). CA e CDCA são então conjugados com glicina ou taurina, aumentando suas solubilidades. Os BAs são inicialmente secretados na bile e liberados da vesícula biliar no duodeno. No intestino delgado, os ácidos biliares primários são convertidos pela microbiota em ácidos biliares secundários, incluindo ácido litocólico (LCA), ácido desoxicólico (DCA) e ácido ursodesoxicólico. A maioria dos ácidos biliares é absorvida no íleo e entra na circulação entero-hepática para manter a composição de ácidos biliares (COMBES et al., 1999; DI CIAULA et al., 2017). A liberação insuficiente de BAs primários no intestino leva a alterações na composição do microbioma, resultando em um desequilíbrio nas bactérias intestinais (disbiose), promovendo esteatorréia em pacientes com CBP e subsequente desnutrição e perda de peso progressiva (RESHETNYAK; MAEV, 2022).

Os ácidos biliares hepáticos atuam como detergentes ao impulsionar a solubilização micelar do colesterol, promovendo a detoxificação do fígado, a absorção de vitaminas lipossolúveis e gorduras alimentares. Além disso, os BAs também atuam como moléculas sinalizadoras e integradoras metabólicas ao manter a homeostase lipídica, regular a glicose, o metabolismo energético e a resposta imune por meio da ativação de diversos receptores nucleares ativados

por ligantes intracelulares (DI CIAULA et al., 2017; LI; CHIANG, 2014). BAs hidrofóbicos são lipolíticos e citotóxicos em altas concentrações, e seu desequilíbrio é uma fonte potencial de estresse inflamatório no fígado ou intestino, levando a condições colestáticas (TRAUNER et al., 2008). Os BAs formam micelas ou vesículas mistas com fosfolipídios biliares e colesterol, uma condição que atenua a toxicidade dos sais biliares nas células epiteliais biliares (IKEDA; MORITA; TERADA, 2017).

Neste trabalho, os níveis de BAs, conjugados e não conjugados com glicina, apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre pacientes com CBP e CS, conforme representado na TABELA 4.3 e na FIGURA 4.14. No entanto, observamos uma notável regulação positiva nos ácidos biliares conjugados, como o ácido glicodeoxicólico (GDCA) ($FC = 10,5$; $p < 0,00001$); glicoursodeoxicolato 3-sulfato (GUDCA) ($FC = 48,8$; $p < 0,00001$); ácido glicoquenodeoxicólico 3-glicuronídeo (GCDCA) ($FC = 13,2$; $p < 0,00001$), ácido glicolitocólico (GLCA) ($FC = 6,9$; $p < 0,00001$). Os BAs primários, CA e CDCA, também mostraram regulação positiva, com um aumento de 2,3 e 2,8 vezes, respectivamente. Essas descobertas foram especialmente evidentes nas amostras de plasma. Também foi observado que os espécimes de BAs para pacientes com CBP estavam conjugados em maior extensão com glicina. Conjugados de taurina não foram significativamente diferentes entre os grupos estudados nas condições utilizadas neste trabalho.

TABELA 4.3 Resumo da regulação de aminoácidos, ácidos biliares, carnitinas, ácidos graxos, esteróides e nucleotídeos em amostras de plasma de indivíduos com CBP.

Classificação	Fórmula Molecular	Metabólito	Regulação CBP vs. CS	CBP (n=30) Média ± SD	CS (n=20) Média ± SD	p-value
Aminoácidos e Derivados	C ₁₃ H ₁₆ O ₇	p-cresol glucuronideo	↑	1.6190 ± 1.0708	0.9873 ± 0.6883	0.00642
	C ₂₄ H ₄₀ O ₅	CA	↑	1.4483 ± 1.9414	0.6360 ± 0.8785	0.006
	C ₂₄ H ₄₀ O ₄	CDCA	↑	1.6853 ± 1.4416	0.5999 ± 0.4179	0.0005
Ácidos Biliares	C ₂₄ H ₄₀ O ₄	UDCA	↑	0.9591 ± 0.8557	0.2091 ± 0.3062	0.00002
	C ₃₂ H ₅₁ NO ₁₁	GCDCA	↑	1.3985 ± 1.3191	0.1057 ± 0.0783	<0.00001
	C ₂₆ H ₄₃ NO ₅	GDCA	↑	1.3345 ± 0.7266	0.4649 ± 0.4058	<0.00001
	C ₂₆ H ₄₃ NO ₅	GUDCA	↑	1.0268 ± 0.9917	0.0210 ± 0.0156	<0.00001
	C ₂₆ H ₄₃ NO ₇ S	GLCA	↑	1.3784 ± 1.3584	0.1972 ± 0.0911	<0.00001
Carnitinas	C ₉ H ₁₇ NO ₄	acetilcarnitina	↑	1.6224 ± 0.5252	0.9712 ± 0.3507	<0.00001
	C ₁₀ H ₁₉ NO ₄	propionilcarnitina	↑	1.1873 ± 0.3799	0.8564 ± 0.2769	0.00086
	C ₁₉ H ₃₅ NO ₄	trans-2-dodecenilcarnitina	↑	1.2155 ± 0.6339	0.8346 ± 0.4044	0.01250
Ácidos graxos e Derivados	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	ácido oléico	↑	1.4316 ± 0.9506	0.5134 ± 0.3561	0.000018
	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	ácido palmítico	↑	1.8033 ± 1.3137	0.8636 ± 0.1948	<0.00001
	C ₁₈ H ₃₂ O ₄	13-hidroxi-10-oxo-11-octadecenoato	↑	0.9486 ± 0.5404	0.4250 ± 0.2722	<0.00001
	C ₂₆ H ₄₁ NO ₃	N-eicosapentaenoil Isoleucina	↑	1.1002 ± 1.0852	0.2587 ± 0.1270	<0.00001
	C ₂₆ H ₅₀ O ₄	1-O-isopentil-3-O-octadeco-2-enoil glicerol	↓	0.0820 ± 0.3386	1.0502 ± 0.3755	0.03630
Nucleotídeos	C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₆	pseudouridina	↑	1.1520 ± 0.2118	0.8327 ± 0.1899	0.00059
	C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₆	uridina	↑	1.2112 ± 0.5670	0.8652 ± 0.2906	0.00014
Esteróides	C ₂₇ H ₄₆ O ₄ S	colesterol sulfato	↑	1.2056 ± 0.4282	0.7574 ± 0.3212	0.00015
	C ₁₉ H ₂₈ O ₅ S	DHEA-S	↓	0.2769 ± 0.2077	1.3098 ± 0.6418	<0.00001

CA: ácido cólico; CDCA: ácido quenodesoxicólico; UDCA: ácido ursodesoxicólico; GCDCA: ácido glicocenedesoxicólico; GDCA: ácido glicodeoxicólico; GUDCA: ácido glicoursodesoxicólico; GLCA: ácido glicolitocólico; DHEA-S: dehidroepiandrosterona. A significância estatística foi calculada usando o teste *t-Student* **p* < 0.05

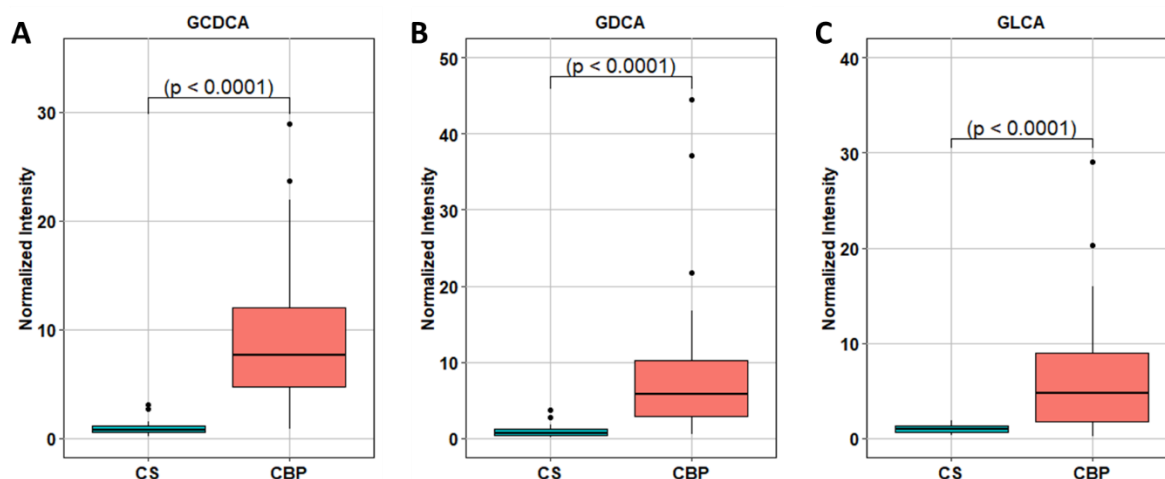


FIGURA 4.14 Boxplots (*box-and-whisker*) dos ácidos biliares glicoconjugados em amostras de plasma dos grupos CBP e CS. O eixo y representa as intensidades normalizadas dos metabólitos. **(A)** GCDCA; **(B)** GDCA; **(C)** GLCA. O boxplot representa a faixa interquartil (IQR), abrangendo a maioria dos dados, enquanto as extremidades (“whiskers”) se estendem aos valores extremos. A significância estatística foi avaliada usando o teste *t-Student*, com um limiar de $p \leq 0,05$.

Já foi relatado que certos ácidos biliares não conjugados, como o CDCA, podem contribuir para a carcinogênese devido ao acúmulo intra-hepático (ALTAMIRANO-BARRERA et al., 2016). Níveis mais elevados de toxicidade estão associados ao aumento da hidrofobicidade desses ácidos biliares (CA, LTA, CDCA) na circulação entero-hepática (MEADOWS et al., 2020). De acordo com um estudo de (YANG; DUAN, 2016), os ácidos biliares interagem com as células do sistema imunológico inato, produzindo fatores inflamatórios específicos. Essa interação desempenha um papel crucial na regulação do sistema imunológico do intestino e da mucosa, além de determinar a composição do microbioma intestinal. Portanto, no desenvolvimento de novos medicamentos pode ser benéfico considerar moléculas que regulem especificamente os níveis de ácidos biliares.

O acúmulo de ácidos biliares nos hepatócitos tem efeitos citotóxicos, e várias doenças e condições foram associadas a um aumento expressivo nas concentrações de ácidos biliares (PERINO et al., 2021). No entanto, para determinar se essa citotoxicidade é mediada por disfunção mitocondrial, novos estudos foram conduzidos sobre a função mitocondrial do fígado. Esses estudos são cruciais para entender os efeitos nocivos dos ácidos biliares e os mecanismos pelos quais causam danos (SOUZA et al., 2019).

O acúmulo de ácidos biliares também afeta negativamente as atividades dos complexos enzimáticos mitocondriais e o metabolismo energético.

Isso leva à regulação da produção aeróbica de energia intracelular, diminuindo a atividade da cadeia respiratória. A superprodução de CDCA, CA e GCDCA, detectada em amostras de CBP, promove a ligação à membrana externa das mitocôndrias e a desintegração da membrana interna. Consequentemente, induz a fragmentação mitocondrial e disfunção celular grave, como um aumento na taxa de morte celular, o que contribui para a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês: *reactive oxygen species*), lesão hepatocelular e fibrose (HOPPEL, 2003; YU et al., 2022a).

Mudanças bioquímicas adicionais relacionadas ao metabolismo lipídico também foram observadas para ácidos graxos em amostras de CBP, como mostrado na TABELA 4.3. A colestase tem sido associada à diminuição da oxidação de ácidos graxos e à função mitocondrial anormal (CORRIGAN; HIRSCHFIELD, 2015; HAO et al., 2017; WANG et al., 2016). Isso pode ser causado por defeitos no transporte de elétrons que afetam a oxidação de ácidos graxos e uma deficiência de fosfoenolpiruvato carboxicinase.

No presente estudo, os resultados indicaram níveis alterados de ácidos graxos insaturados plasmáticos, como aumento nos níveis de ácido oleico (FC = 2,79; $p = 0,0000184$) e ácido palmítico (FC = 2,09; $p < 0,00001$). Além disso, houve um aumento nos níveis de derivados do ácido linoleico, como o ácido 13-hidroxi-10-oxo-11-octadecenoico (FC = 2,23; $p < 0,00001$) e *N*-eicosapentaenoil isoleucina (FC = 4,25; $p < 0,00001$), classificado como *N*-acilamida de cadeia longa. Essas alterações sugerem que pacientes com CBP têm uma assinatura inflamatória e estão experimentando estresse oxidativo. Como resultado, uma cascata de resposta inflamatória é desencadeada, o que eventualmente leva à fibrose (HAO et al., 2017).

A carnitina é essencial para processos mitocondriais, como o metabolismo de ácidos graxos, a produção de ATP e a produção de energia. A diminuição nos níveis de carnitina está ligada a distúrbios mitocondriais, caracterizados por redução na produção de energia e acúmulo de ácidos graxos. Nas células, a principal função da carnitina é o transporte de ácidos graxos de cadeia longa para as mitocôndrias para posterior β -oxidação (VIRMANI; CIRULLI, 2022).

A carnitina também se liga a resíduos acílicos derivados do metabolismo intermediário de aminoácidos e promove sua excreção. Esse mecanismo é essencial na ligação/remoção de ácidos orgânicos anormais em várias acidemias orgânicas e explica a deficiência secundária de carnitina que pode resultar delas. A conjugação de carnitina diminui o número de resíduos acílicos ligados à coenzima A (CoA) e aumenta a relação entre ácidos livres e

acílicos-CoA. Esse mecanismo é especialmente importante em distúrbios da oxidação mitocondrial de ácidos graxos, quando os acílicos-CoA de ácidos graxos se acumulam em órgãos como o coração, induzindo apoptose e inflamação. Portanto, qualquer interrupção no metabolismo de ácidos graxos de cadeia longa pode levar a alterações nos níveis de carnitina (HOPPEL, 2003).

Esta investigação revelou concentrações plasmáticas elevadas de acilcarnitinas de cadeia curta, como acetilcarnitina (C2) (FC = 1,67; $p < 0,00001$), propionilcarnitina (C3) (FC = 1,39; $p = 0,00086$) e acilcarnitina *trans*-2-dodecenil média (C12) (FC= 1,46; $p = 0,0125$), juntamente com um aumento significativo na acilcarnitina 6-ceto-decanoil (C10) na urina (FC= 3,15; $p = 0,00065$). Além disso, o estudo observou diminuição nas concentrações urinárias da acilcarnitina de cadeia média (C10) (FC= 0,60; $p = 0,0011$), 2-octenoilcarnitina (C8) (FC= 0,53; $p = 0,00098$) e 3-hidroxi-octanoilcarnitina (C8) (FC= 0,55; $p = 0,015$), juntamente com um aumento nos níveis de carnitina livre (FC= 1,57; $p = 0,000025$) em indivíduos com CBP, como mostrado na TABELA 4.4.

Estudos anteriores mostraram que indivíduos com perfis cirróticos excretam mais acilcarnitinas livres de cadeia curta em comparação com o grupo controle (Bell et al. 2015; TANG et al. 2015). No entanto, neste estudo, foram identificados níveis negativamente regulados de três acilcarnitinas de cadeia média excretadas na urina quando comparadas ao grupo CS, exceto no caso da acilcarnitina 6-ceto-decanoil (C10). Com base na pesquisa conduzida por LEHMANN et al. (2010), descobriu-se que a acilcarnitina de cadeia média, que varia de C8 a C12, pode aprimorar efetivamente a β -oxidação do palmitato, especialmente quando a L-carnitina está presente (LEHMANN et al., 2010).

Esses resultados sugerem que esse processo metabólico pode indicar uma ligação potencial entre altos níveis de ácidos graxos de cadeia longa e uma diminuição na excreção de acilcarnitinas de cadeia média na urina. Alguns estudos relataram que baixos níveis de acilcarnitinas de cadeia curta podem estar associados à oxidação deficitária de ácidos graxos em pacientes diagnosticados com infecção crônica pelo vírus da hepatite B (HBV) e doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD) (ENOOKU et al., 2019). Conforme relatado por (MCCANN et al., 2021), acilcarnitinas de cadeia curta e média indicam uma disfunção metabólica que altera o metabolismo de glicose, aminoácidos de cadeia ramificada (BCAAs) e ácidos graxos. Valina, leucina e isoleucina, classificadas como aminoácidos essenciais e conhecidas como aminoácidos de cadeia ramificada (BCAAs), são importantes na regulação do metabolismo de glicose e lipídios e estão implicadas na fisiopatologia de doenças hepáticas (TAJIRI; SHIMIZU, 2018). O estudo conduzido por Lake et al. (2015) demonstrou que um

aumento nos níveis plasmáticos de acilcarnitinas de cadeia curta em pacientes com esteato-hepatite não alcoólica (NASH) está associado a níveis elevados de BCAA, que servem como fontes alternativas de energia. Esses resultados são considerados um indicador da progressão e prognóstico da cirrose (TAJIRI; SHIMIZU, 2018).

Foram ainda identificados níveis elevados de valina na urina (FC = 2,70; $p < 0,00001$). No entanto, os níveis de leucina (FC = 0,16; $p < 0,00001$) e isoleucina (FC = 0,45; $p < 0,00001$) foram significativamente mais baixos em pacientes com CBP do que no grupo CS, indicando alterações metabólicas substanciais em BCAAs em pacientes com CBP. De acordo com Yu et al (YU et al., 2022b), os metabólitos de carnitina estão relacionados à DII, CBP e CEP. No entanto, os níveis de três acilcarnitinas excretadas na urina foram regulados negativamente em comparação ao grupo CS. Alguns estudos relatados na literatura mostraram que baixos níveis de acilcarnitinas podem estar relacionados à oxidação prejudicada de ácidos graxos hepáticos devido à esteatose hepática e colestase (BOUGNÈRES et al., 1981; MORRIS et al., 2013). Em casos de deficiência grave de carnitina, foi demonstrado que a carnitina estimula citocinas pró-inflamatórias, levando à apoptose de enterócitos, atrofia vilosa, inflamação e lesão intestinal (BOUGNÈRES et al., 1981; TANG et al., 2015).

Níveis elevados de uridina (FC = 1,40; $p < 0,00001$) e pseudouridina (FC = 1,39; $p < 0,00001$) foram identificados em amostras plasmáticas. Além disso, os níveis de 5,6 dihidrouridina (FC = 2,31; $p < 0,00001$) aumentaram nas amostras de urina de pacientes com CBP. Essas alterações estão associadas à disfunção hepatorenal em pacientes cirróticos (SEKULA et al., 2017).

Níveis elevados de *p*-cresol glicuronídeo (FC = 1,64; $p = 0,00642$), ácido α -hidroxihidroxipúrico (FC = 1,92; $p = 0,00017$) e sulfato de fenol (FC = 1,98; $p = 0,789$) também foram observados, sendo principalmente gerados como produtos da biotransformação da tirosina por bactérias intestinais anaeróbias no fígado. Fenilalanina e ácido hipúrico podem indicar uma alteração relevante no metabolismo da microbiota intestinal em pacientes com CBP e podem estar envolvidos na progressão da doença (VIGNOLI et al., 2019). No entanto, as amostras de CBP são de pacientes que estão sendo tratados com UDCA, que mostra ser eficaz na regulação de toxinas urêmicas (KIM et al., 2018).

De acordo com os resultados obtidos, o nível de sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEA-S) (FC = 0,21; $p < 0,00001$) apresentou uma redução de 4,7 vezes nas amostras plasmáticas ao comparar os grupos CBP e CS, e foi relatado que este metabólito se altera com o processo de envelhecimento ($p = 0,042$). Estudos anteriores indicaram que mulheres diagnosticadas com CBP

antes dos 40 anos, a resposta imune parece ser o primeiro sinal do desenvolvimento da doença. No entanto, em mulheres mais velhas diagnosticadas com CBP (com 65 anos ou mais), os níveis de estrogênio também desempenham um papel na progressão da doença, além da resposta imune (ALVARO et al., 2006; KILANCZYK et al., 2022).

A resposta inflamatória e fibrose associadas à CBP podem ser potencialmente moduladas por DHEA-S e seus metabólitos. Trabalhos anteriores mostraram que o metabólito sulfonado, DHEA-S, pode reduzir os níveis de interleucinas pró-inflamatórias (IL-8 e TNF- α) em colangiócitos semelhantes à CBP, bem como a interleucina pró-fibrótica IL-13 em hepatócitos (BLATKIEWICZ et al., 2023). Além disso, foi demonstrado que a DHEA-S tem uma função protetora em hepatócitos contra o estresse oxidativo induzido por *tert*-butilhidroquinona (*t*BHQ), bem como a apoptose em células HEPG2 (KILANCZYK et al., 2022).

A análise dos dados também revelou que o metabolismo de aminoácidos é um fator importante em indivíduos com CBP. A cistina, uma forma dîmera oxidada da cisteína, foi encontrada em níveis significativamente elevados em pacientes com CBP (FC = 1,46; $p = 0,00002$). Estudos anteriores mostraram uma correlação positiva entre os níveis de cistina e a gravidade da doença hepática em pacientes com CBP, indicando que a capacidade antioxidante do enxofre tem um efeito benéfico na inflamação e na fibrose hepática (WEISKIRCHEN, 2015).

Na urina, os níveis de histidina (FC = 0,47; $p = 0,00076$), fenilalanina (FC = 0,55; $p = 0,00001$), beta-(pirazol-1-il)-*L*-alanina (FC = 0,55; $p < 0,00001$), serina (FC = 0,53; $p < 0,00001$), leucina (FC = 0,16; $p < 0,00001$) e isoleucina (FC = 0,45; $p < 0,00001$) foram significativamente menores ($p \leq 0,05$) em indivíduos com CBP em comparação ao grupo CS. No entanto, os níveis de valina aumentaram nas amostras de CBP (FC = 2,70; $p < 0,00001$), conforme mostrado na TABELA 4.4 e na FIGURA 4.15.

TABELA 4.4 Resumo da regulação de aminoácidos, ácidos biliares, carnitinas, ácidos graxos, nucleotídeos e esteróides em amostras de urina de indivíduos com CBP.

Classe	Fórmula Molecular	Metabólito	Regulação CBP vs. CS	CBP (n=30) Média ± SD	CS (n=20) Mean ± SD	P-value
Aminoácidos	C ₆ H ₉ N ₃ O ₂	histidina	↓	0.6087 ± 0.3737	1.2832 ± 1.0960	0.00076
	C ₇ H ₁₁ N ₃ O ₂	3-metil-histidina	↓	0.5478 ± 0.2274	1.2044 ± 0.5578	<0.00001
	C ₆ H ₆ N ₂ O ₂	urocanato	↓	0.5198 ± 0.2868	0.9335 ± 0.5009	0.0023
	C ₆ H ₁₃ NO ₂	leucina	↓	0.2661 ± 0.1032	1.6613 ± 1.0444	<0.00001
	C ₆ H ₁₃ NO ₂	isoleucina	↓	0.5082 ± 0.1894	1.1269 ± 0.5240	<0.00001
	C ₉ H ₁₁ NO ₂	fenilalanina	↓	0.6189 ± 0.2228	1.1150 ± 0.3364	<0.00001
	C ₆ H ₉ N ₃ O ₂	β-(pirazol-1-il)-L-alanina	↓	0.5191 ± 0.2405	0.9347 ± 0.2142	<0.00001
	C ₅ H ₉ NO ₂	prolina	↓	0.7037 ± 0.2523	1.1090 ± 0.1911	0.00002
	C ₃ H ₇ NO ₃	serina	↓	0.6022 ± 0.1422	1.1294 ± 0.4241	<0.00001
	C ₅ H ₁₁ NO ₂	valina	↑	1.2428 ± 1.1447	0.4618 ± 0.3458	0.00004
	C ₆ H ₆ O ₄ S	fenol sulfato	↑	1.0782 ± 0.7370	0.4397 ± 0.2784	0.0002
Ácidos Biliares	C ₃₀ H ₄₈ O ₁₀	DCA 3- glicuronídeo	↑	1.3828 ± 1.1713	0.3755 ± 0.2705	0.000035
	C ₃₂ H ₅₁ NO ₁₁	GCDCA 3-glicuronídeo	↑	1.0000 ± 0.6532	0.1531 ± 0.1347	<0.00001
	C ₂₆ H ₄₃ NO ₈ S	GCDCA 3-sulfato	↑	0.7703 ± 0.5607	0.0364 ± 0.0211	<0.00001
	C ₃₂ H ₅₁ NO ₁₁	GLCA	↑	1.0074 ± 0.8723	0.1697 ± 0.0935	0.00109
	C ₂₆ H ₄₃ NO ₅	GDCA	↑	0.9619 ± 0.7973	0.1568 ± 0.1170	0.00031
Carnitinas	C ₇ H ₁₅ NO ₃	carnitina	↑	0.8532 ± 1.3291	0.5435 ± 1.1788	0.000025
	C ₁₇ H ₃₁ NO ₅	6-ceto-decanoilcarnitina	↑	1.2290 ± 0.9199	0.3901 ± 0.2365	0.00065
	C ₁₇ H ₃₁ NO ₄	9-decenoilcarnitina	↓	0.5006 ± 0.2932	0.8318 ± 0.5239	0.0011
	C ₁₅ H ₂₉ NO ₅	3-hidroxi-octanoilcarnitina	↓	0.7775 ± 0.5953	1.4188 ± 1.0834	0.015
	C ₁₅ H ₂₇ NO ₄	2-octanoilcarnitina	↓	0.5631 ± 0.3389	1.0633 ± 0.5928	0.00098
Ácidos Graxos e Derivados	C ₂₂ H ₃₈ O ₂	docosatrienoato	↑	1.1062 ± 0.3713	0.6890 ± 0.1448	0.0025
	C ₁₄ H ₂₀ O ₅	ácido 3-carboxi-4-metil-5-pentil-2-furanopropanoico	↓	1.8754 ± 1.1054	2.2982 ± 0.8274	0.0015
Nucleotídeos	C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₆	pseudouridina	↑	0.8752 ± 0.3297	0.6572 ± 0.3604	0.013
	C ₉ H ₁₄ N ₂ O ₆	5,6-diidrouridina	↑	1.4004 ± 1.3923	0.6055 ± 0.6258	<0.00001
Esteróides	C ₂₅ H ₃₈ O ₈	androsterona glicuronídeo	↓	0.7623 ± 0.4535	1.4197 ± 0.9515	0.000017
	C ₂₈ H ₃₇ N ₃ O ₉ S	4-hidroxiestrona-2-glutaciona	↓	1.9488 ± 2.0801	0.5583 ± 0.4099	0.00053
	C ₂₇ H ₄₈ O ₈ S	5β-ciprinolsulfato	↑	1.2592 ± 0.3778	0.7993 ± 0.2220	0.00004

CA: ácido cólico; DCA: ácido desoxicólico; GCDCA: ácido glicoquenodesoxicólico; GDCA: ácido glicodeoxicólico; GLCA: ácido glicoliticólico.

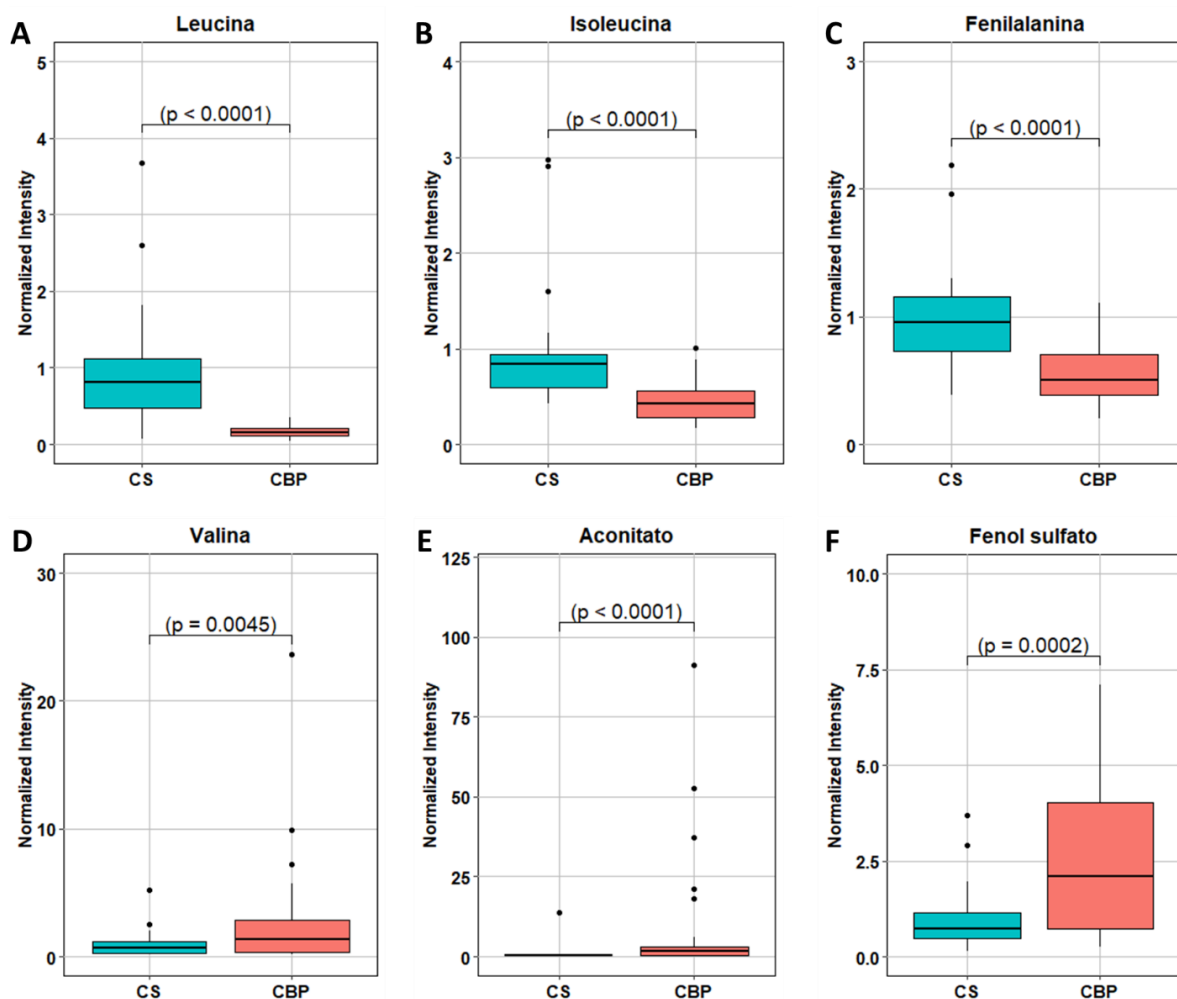


FIGURA 4.15 Boxplots (*box-and-whisker*) para aminoácidos em amostras de urina de grupos CBP e CS. O eixo y representa as intensidades normalizadas dos metabólitos. (A) leucina; (B) isoleucina; (C) valina; (D) fenilalanina; (E) trans-aconitato; (F) sulfato de fenol. O boxplot representa a faixa interquartil (IQR), abrangendo a maioria dos dados, enquanto as extremidades (“whiskers”) se estendem aos valores extremos. A significância estatística foi avaliada usando o teste *t-Student*, com um limiar de $p \leq 0,05$.

Além disso, foi identificado um aumento nos níveis de *trans*-aconitato na urina (FC = 8,15; $p = 0,000022$) em amostras de pacientes com CBP. Esse aumento está associado a uma taxa de mortalidade mais alta, conforme relatado anteriormente por Mindikoglu et al. (MINDIKOGLU et al., 2019).

Em resumo, as descobertas aqui apresentadas demonstram alterações metabólicas significativas nas amostras biológicas de indivíduos com CBP, mesmo esses estando em tratamento com UDCA. Foram identificados níveis elevados de ácidos biliares, alterações de fosfolipídios, glicerofosfolipídios e ácidos graxos detectados em amostras de plasma. As análises das amostras de

urina, complementarmente, mostraram diminuição nos níveis de biossíntese de aminoácidos que pode trazer novas perspectivas sobre o perfil autoimune da doença CBP. Este estudo de metabolômica *untargeted* utilizou dados da análise de duas matrizes biológicas (plasma e urina), permitindo uma cobertura abrangente do metaboloma. No entanto, esse estudo foi possível apenas com participantes do sexo feminino e já em tratamento com UDCA. Assim, entendemos ser relevante analisar um grupo maior de pacientes, incluindo homens e mulheres, conduzir estudos genéticos para correlacionar com as descobertas metabolômicas e incluir grupos de indivíduos que não estejam em tratamento com UDCA. Adicionalmente, realizar análises metabolômica *target* para validar os metabólitos que se mostraram alterados como biomarcadores potenciais para o monitoramento e prognóstico de pacientes com CBP.

5 Conclusões e Limitações do Capítulo I

Os resultados do capítulo I indicaram alterações metabólicas associadas à doença da CBP e suas potenciais implicações em distúrbios mitocondriais. As descobertas revelaram metabólitos específicos alterados relacionados ao metabolismo de carnitinas, oxidação de ácidos graxos, biossíntese de ácidos biliares e biossíntese de aminoácidos ligados à CBP. Descobrir biomarcadores é um processo desafiador e que requer uma assinatura única de metabólitos que se correlacione inequivocamente com eventos biológicos. Nessa parte do estudo, foram demonstrados uma série de metabólitos relevantes associados às assinaturas moleculares da CBP em duas matrizes biológicas complexas. No entanto, correlacioná-los assertivamente a eventos biológicos requer a fase de validação dos metabólitos via metabolômica *target* e/ou metabolômica em fluxo com o emprego de marcação isotópica. Os ensaios de metabolômica *target* e em fluxo são fundamentais para alcançar a precisão e exatidão das descobertas, através da quantificação absoluta dos metabólitos estatisticamente alterados, traduzindo essas descobertas em aplicações clinicamente relevantes, aprimorando o diagnóstico, prognóstico e o manejo da CBP.

Certamente, os resultados deste trabalho fornecem percepções valiosas sobre as alterações metabólicas associadas à CBP, lançando luz sobre os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na doença. A identificação de uma série de metabólitos específicos e que se mostraram alterados abre novos caminhos para potenciais alvos e estratégias terapêuticas direcionadas e tratamentos personalizados.

É importante observar que os autores desse trabalho reconhecem a natureza exploratória empregada nas análises metabolômicas *untargeted* e a necessidade de continuidade do estudo com modelos amostrais maiores, com a inclusão de participantes de ambos os sexos e de indivíduos diagnosticados com CBP, mas que não estejam sob nenhuma administração medicamentosa, incluindo indivíduos com e sem a administração de UDCA.

Em resumo, este estudo representa um avanço significativo na compreensão da fisiopatologia da CBP e estabelece as bases para pesquisas futuras e desenvolvimento de intervenções que poderiam impactar positivamente a vida das pessoas afetadas por essa condição clínica.

Capítulo II

*Estratégias de Metabolômica Untargeted
para a Classificação de Colestase Intra-
hepática Familiar tipo 3 (PFIC3), Colangite
Biliar Primária (CBP) e Colangite
Esclerosante Primária (CEP)*

6 Resultados e Discussão

6.1 Perfil Metabólico de Três Doenças Hepáticas Colestáticas (PFIC3, CBP e CEP) Comparadas ao Grupo Controle (CS) em amostras de plasma

Neste estudo de perfil metabólico, um total de 132 amostras de plasma e urina foram analisadas. O estudo incluiu 30 pacientes com CBP, 33 pacientes com CEP, 34 pacientes com PFIC3 e 35 indivíduos saudáveis como grupo controle (CS). Utilizando uma abordagem metabolômica *untargeted* com base em análises de LC-HRMS foram identificados 87 metabólitos em amostras de plasma usando separação por cromatografia de fase reversa (RPLC) e 47 metabólitos foram identificados usando a separação no modo HILIC de separação. Desse conjunto, 92 metabólitos foram considerados estatisticamente significativos ($p \leq 0,05$ e $q \leq 0,05$) e foram identificados como compostos discriminantes que se diferenciam entre os grupos de colestase (CBP, PFIC e CEP) e/ou em comparação com o grupo CS no plasma. Adicionalmente, o estudo explorou as alterações metabólicas entre os três grupos colestáticos (CBP vs. PFIC; CBP vs. CEP e CEP vs. PFIC), abrangendo 43 espécies lipídicas, como ácidos biliares, glicerofosfolipídios, ácidos graxos, carnitinas, como também 30 aminoácidos, 07 carboidratos, 02 peptídeos, 02 nucleotídeos, entre outros, conforme mostrado na FIGURA 6.1.

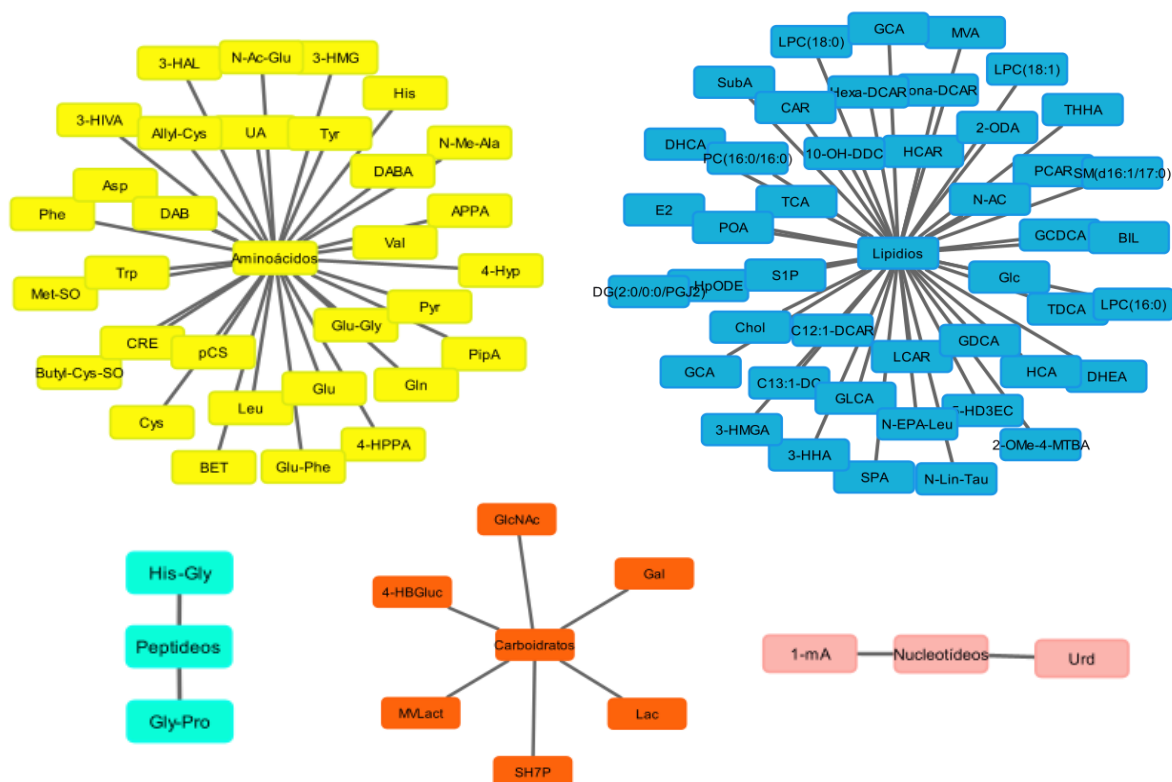


FIGURA 6.1 Metabólitos putativamente identificados nas análises de plasma por LC-HRMS obtidos nos modos de eluição RPLC e HILIC, à partir de amostras de indivíduos diagnosticados com diferentes tipos de doenças colestáticas (CBP, CEP e PFIC3), bem como do grupo CS. As principais classes de metabólitos identificados são codificadas pelas seguintes cores: Aminoácidos (■); Lipídios (■), Peptídeos (■), Carboidratos (■) e Nucleotídeos (■).

Para explorar possíveis padrões de segregação ou agrupamento entre os grupos CBP, PFIC3, CEP e CS, foi realizada uma análise estatística multivariada, utilizando um gráfico de pontuação da Análise Discriminante de Quadrados Parciais (PLS-DA), conforme ilustrado na FIGURA 6.2A. O modelo PLS-DA evidenciou uma separação distinta entre CS e os grupos com condições colestáticas, apontando diferenças metabólicas significativas no plasma dos indivíduos com colestase. O modelo PLS-DA aplicados aos conjuntos de dados plasmáticos em comparação ao grupo CS revelaram uma diferenciação entre os grupos (CBP vs. CS; CEP vs. CS e PFIC vs. CS) (FIGURA 6.2A). A robustez do modelo PLS-DA foi verificada por meio de testes de permutação ($p < 0,0001$) e a qualidade do modelo multivariado foi avaliada com base no coeficiente de regressão (R^2) e no desempenho preditivo (Q^2), os quais resultaram em $Q^2 = 0,5301$, $R^2 = 0,5771$ e Q^2 acumulado (cum) = 0,9459, R^2 acumulado (cum) = 0,9741.

Um modelo PLS-DA também foi realizado para verificar a comparação somente entre combinações dos grupos de colestase (CBP vs. CEP; CBP vs. PFIC e CEP vs. PFIC), conforme mostrado na FIGURA 6.2B. Neste caso, obteve-se $Q^2 = 0,3490$, $R^2 = 0,3893$, alcançando R^2 (cum) = 0,9706 e Q^2 (cum) = 0,9184. A validação foi realizada por meio de testes de permutação no modelo PLS-DA, demonstrando um valor $p < 0,0001$ após 1000 permutações.

Vale ressaltar que nos modelos PLS-DA não se esperava uma discriminação completa entre os grupos, considerando que os três tipos de colestase apresentam características bioquímicas muito similares entre si.

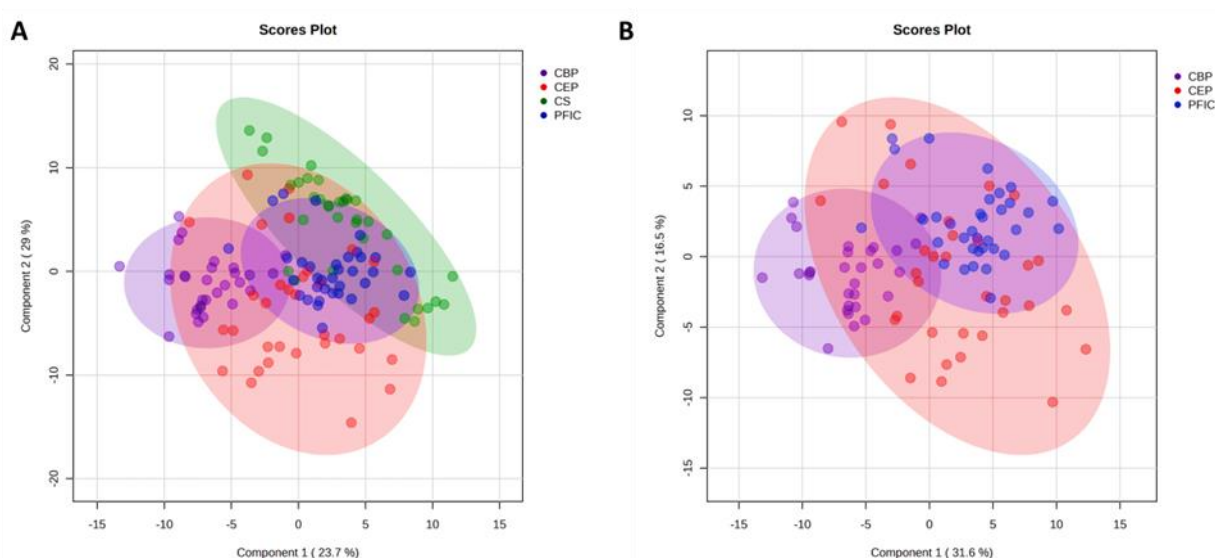


FIGURA 6.2 Análise multivariada PLS-DA das amostras de plasma entre os grupos de CBP, CEP, PFIC3 e CS. **(A)** Gráfico de dispersão de *scores* PLS-DA de 132 amostras de plasma exibindo a separação entre os grupos CBP (■), CEP (■), PFIC3 (■) e o grupo CS (■); **(B)** Gráfico de dispersão de *scores* PLS-DA para os três tipos de colestase: CBP (■), CEP (■) e PFIC3 (■). Análises LC-HRMS, nos modos de ionização ESI(+) e ESI(-).

Para identificar putativamente os metabólitos responsáveis pela discriminação dos diferentes tipos de colestase, utilizou-se a Importância Variável na Projeção (VIP) ($VIP \geq 1$), conforme mostrado na FIGURA 6.3. Os metabólitos-chave que contribuíram para essa separação no PLS-DA ($VIP \geq 1$) incluíram ácidos biliares glicoconjugados, como: ácido glicocólico (GCA), ácido glicoquenodeoxicólico (GCDCA), ácido glicodeoxicólico (GDCA) e ácido glicolitocólico (GLCA). Além disso, o diacilglicerídeo DG(2:0/PGJ2); as acilcarnitinas 10-hidroxidodecanoilcarnitine (10-OH-DDC) e dodecenoilcarnitine (C12:1-DCAR) e tridec-6-enedioilcarnitine (C13:1-DC); os

ácidos graxos ácido 13-hidroperoxi linoleico (13-HpODE) e ácido 2-octenodióico (2-ODA); aminoácidos e seus derivados, como alilcisteína (Alyl-Cys), triptofano (Trp), histidilglicina (His-Gly) e leucine (Leu), e por fim carboidrato β -galactosil (β -Gal), conforme ilustrado na FIGURA 6.3.

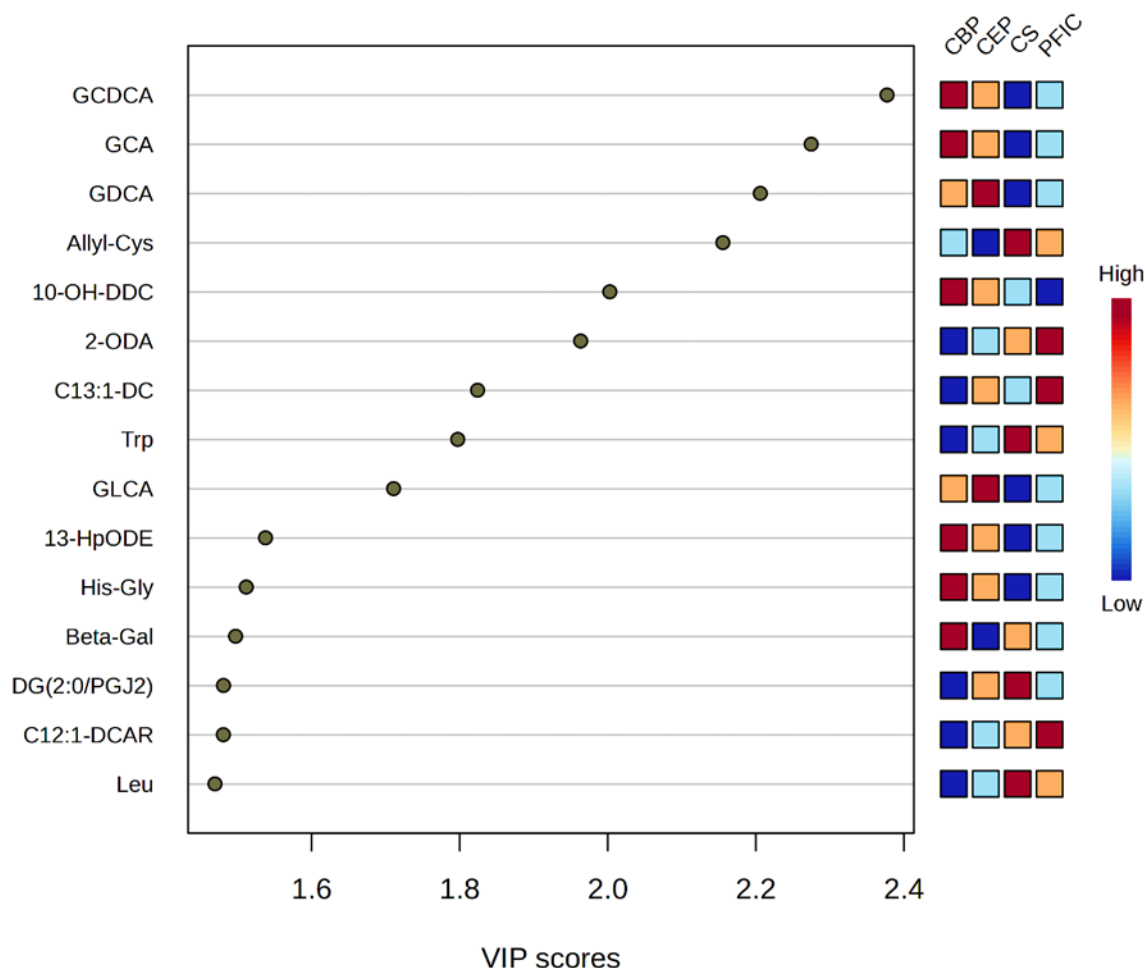


FIGURA 6.3 VIP scores obtidos a partir do modelo PLS-DA provenientes das análises das amostras de plasma. As caixas coloridas indicam se a concentração do metabólito está aumentada (■) ou diminuída (■) em comparação ao grupo CS.

Ainda sobre o VIP scores, cada um dos grupos em estudo apresenta, pelo menos um metabólito que se encontra regulado positivamente ou negativamente, sendo um potencial metabólito discriminante entre os diferentes tipos.

Foram conduzidas análises estatísticas univariadas empregando o método ANOVA para investigar os efeitos do gênero sobre os metabólitos discriminantes. Como resultado, constatou-se a influência significativa do gênero

em relação aos seguintes metabólitos presentes nas amostras de plasma: ácido 3-hidroxi-isovalérico ($p=0,0054$); ácido 9,10,16-triidroxihexadecanóico ($p=0,0251$); estradiol ($p = 0,013$), ácido láctico ($p = 0.0046$); sedoheptulose 7-fosfato ($p = 0.0284$) e uridina ($p = 0.0139$).

Por meio das análises *post-hoc*, foram determinados os níveis de significância de cada metabólito comparativamente entre todos os grupos em estudo (CBP, CEP, PFIC e CS). Isso permitiu obter os valores de p e q associados a cada comparação. Foram realizadas comparações entre os grupos de colestases e o grupo CS (CBP vs. CS; CEP vs. CS; PFIC3 vs. CS). Da mesma forma foram realizados testes *post-hoc* para analisar as alterações metabólicas entre os diferentes tipos de colestase (PFIC3 vs. CBP; CBP vs. CEP e PFIC3 vs. CEP). A partir dos resultados obtidos, foi elaborada uma lista detalhada de todos os metabólitos putativamente identificados. A tabela completa está disponível no Apêndice II.

A análise metabólica do plasma revelou uma complexa interconexão entre 92 metabólitos, destacando as alterações específicas que ocorrem exclusivamente entre as colestase e/ou em comparação com o grupo CS. Esses resultados indicam a presença de grupos de metabólitos que podem tornar o diagnóstico mais específico para cada colestase.

As comparações entre os metabólitos que diferiram significativamente ($p \leq 0,05$ e $q \leq 0,05$), produziram

CBP vs. CS – 63 metabólitos;
 CEP vs. CS – 52 metabólitos;
 PFIC vs. CS – 48 metabólitos;
 CBP vs. PFIC3 – 36 metabólitos;
 CBP vs. CEP – 27 metabólitos e
 PFIC vs. CEP – 15 metabólitos.



Notavelmente, pacientes com CBP, CEP e PFIC3 apresentaram elevações significativas em vários ácidos biliares hepáticos, com significância estatística ($p \leq 0,05$ e $q \leq 0,05$). Ácidos biliares primários conjugados, incluindo ácido glicocólico (GCA), ácido glicoquenodeoxicólico (GCDCA) e ácidos biliares secundários conjugados como o ácido glicodeoxicólico (GDCA), os quais exibiram níveis extremamente elevados nos grupos de doenças hepáticas, conforme ilustrado na TABELA 6.1. Para avaliar o quanto um metabólito é alterado em comparação aos demais grupos foram calculados os valores de *fold-change* (FC).

Dessa forma, um aumento significativo foi observado em ácidos biliares glicoconjugados, como o glicoquenodeoxicolato 3-glicuronídeo (GCDCA-3-glicuronídeo) - (CBP vs. CS: FC = 14,34; $p < 0,0001$); (PFIC3 vs. CS: FC = 9,27; $p \leq 0,0001$) e (CEP vs. CS: FC = 21,95; $p < 0,0001$); ácido glicocólico 3-glicuronídeo (GCA-3-glicuronídeo) (CBP vs. CS: FC = 28,15; $p \leq 0,0001$; PFIC3 vs. CS: FC = 13,27; $p \leq 0,000179$ e CEP vs. CS: FC = 26,48; $p < 0,0001$); ácido glicodesoxicólico (GDCA) - (CBP vs. CS: FC = 88,56; $p < 0,0001$; PFIC3 vs. CS: FC = 56,06; $p < 0,0001$ e CEP vs. CS: FC = 155,20; $p < 0,0001$); ácido glicolitocólico 3-sulfato (GLCA 3-sulfato) - (CBP vs. CS: FC = 4,70; $p \leq 0,000082$; PFIC3 vs. CS: FC = 4,13; $p \leq 0,000243$ e CEP vs. CS: FC = 5,12; $p \leq 0,00002$).

Da mesma forma, elevações significativas foram observadas em ácidos biliares tauro conjugados como TCA (CBP vs. CS: FC = 18,55; $p \leq 0,0002$; PFIC3 vs. CS: FC = 55,93; $p \leq 0,00001$ e CEP vs. CS: FC = 49,56; $p \leq 0,00006$), ácido taurodesoxicólico (TDCA) - (CBP vs. CS: FC = 9,57; $p \leq 0,001$; PFIC3 vs. CS: FC = 16,52; $p \leq 0,00001$ e CEP vs. CS: FC = 35,70; $p \leq 0,000002$) e ácido biliares 3,7-dihidroxicolan-24-oico (CBP vs. CS: FC = 3,32; $p \leq 0,00087$; PFIC3 vs. CS: FC = 4,88; $p \leq 0,005$ e CEP vs. CS: FC = 5,26; $p \leq 0,006$) em indivíduos com doença hepática.

Além disso, o estudo observou um aumento em diferentes classes de lipídios, incluindo PC (16:0/16:0) (CBP vs. CS: FC = 1,72; $p \leq 0,0000325$; PFIC3 vs. CS: FC = 1,71; $p \leq 0,0000815$ e CEP vs. CS: FC = 1,94; $p < 0,0001$), e SM (d16:1/17:0) (CBP vs. CS: FC = 1,32; $p \leq 0,005$; PFIC3 vs. CS: FC = 1,62; $p < 0,0001$ e CEP vs. CS: FC = 1,35; $p \leq 0,0000507$). Um aumento substancial nos níveis de *N*-eicosapentaenoil leucine (N-EPA-Leu.) também foi identificado (CBP vs. CS: FC = 4,71; $p = 0,0000943$; PFIC3 vs. CS: FC = 4,13; $p \leq 0,00024$ e CEP vs. CS: FC = 5,12; $p \leq 0,00015$) e ácido palmitoléico (POA) (CBP vs. CS: FC = 2,12; $p \leq 0,000024$; PFIC3 vs. CS: FC = 1,93; $p \leq 0,00003$ e CEP vs. CS: FC = 2,16; $p \leq 0,000015$)

Estes resultados estão em concordância com estudos de perfil lipídico onde a colestase intra-hepática foi induzida por isotiocianato de α -naftila (ANIT). Os pesquisadores observaram um aumento significativo em vários componentes lipídicos no fígado. Esses componentes lipídicos incluem várias formas de fosfatidilcolina (PC), lisofosfolipídio (LPC), esfingomielina (SM) e carnitinas (WANG et al., 2019). Foram reportadas alterações nos perfis lipídicos hepáticos de indivíduos colestatos associadas às alterações na expressão de genes específicos, incluindo colina quinase (Chk), fosfodiesterase de esfingomielina (SMPD) e estearoil-coenzima A desaturase-1 (SCD1) (WANG et

al., 2019). Níveis discretamente elevados para esfinganina foram observados para PFIC3 e CEP ($p \leq 0.05$ e $q \leq 0.05$) em comparação ao grupo CS, no entanto, esses valores não foram significativos para o FC.

Foi também observado uma correlação positiva entre o ácido graxo N-EPA-Leu e ácidos biliares, como o GCA 3-glicuronídeo ($r= 0,52$), GCDCA 3-glicuronídeo ($r= 0,70$), GDCA ($r= 0,77$), GLCA ($r= 1,0$) e TDCA ($r=0,62$), conforme mostrado na FIGURA 6.4. Uma correlação positiva sugere que o aumento dos níveis de ácidos biliares pode levar ao aumento dos níveis de N-EPA-Leu.

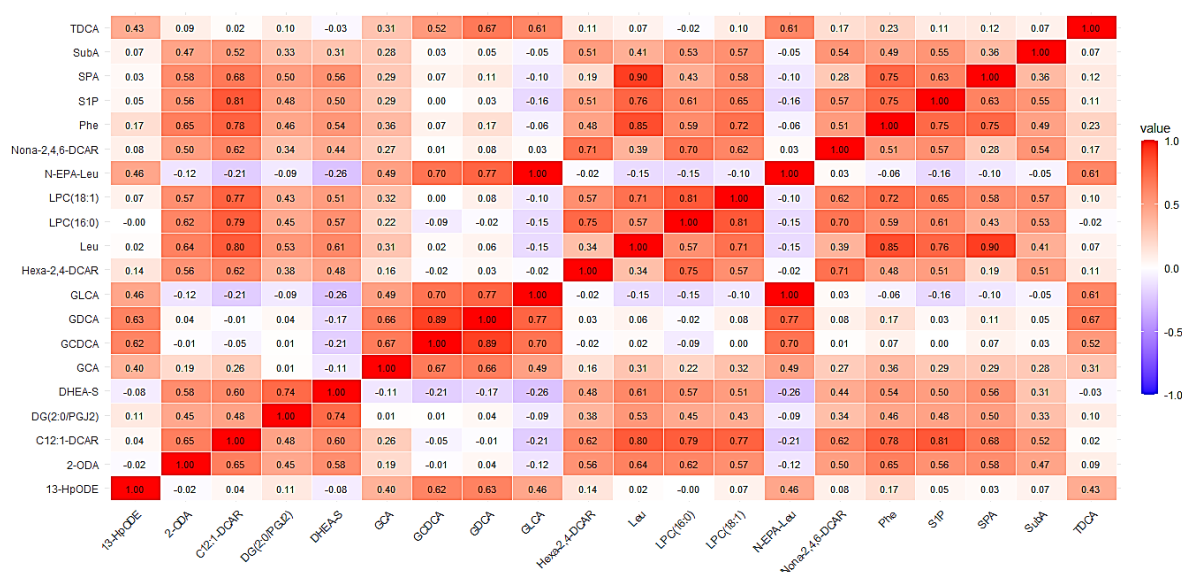


FIGURA 6.4 Matrices de correlação baseadas nos metabólitos VIPs ≥ 1 provenientes das amostras de plasma. Correlações negativas entre os metabólitos são exibidas em ■ e correlações positivas em ■. A intensidade da cor é proporcional ao coeficiente de correlação, sendo mais forte quanto mais próximo de -1 ou 1.

TDCA: ácido taurodesoxicólico; SubA: ácido subérico; SPA: esfinganina; S1P: esfingosina 1-fosfato (d16:1-P); Phe: fenilalanina; Nona-2,4,6-DCAR: Nona-2,4,6-trienoilcarnitine; N-EPA-Leu: N-eicosapentaenoil leucina; LPC: lisofosfatidilcolina; Leu: leucina; Hexa-2,4-DCAR: hexa-2,4-dienedioilcarnitina; GLCA: ácido glicolítico; GCDCA: ácido glicoquenoideoxicólico; GDCA: ácido glicodeoxicólico; GCA: ácido glicocólico; DHEA-S: sulfato de dehidroepiandrosterona; C12:1-DCAR: dodecenoilcarnitina; 2-ODA: 2-ácido-octenedioico; 13-HpODE: ácido 13-hidroperoxilinoico;

Foram também observadas diminuição nos níveis de alil cisteína (Allyl-Cys) (CBP vs. CS: FC = 0,47 e $p < 0,0001$; PFIC3 vs. CS: FC = 0,59 e $p < 0,0001$; e CEP vs. CS: FC = 0,46 e $p < 0,0001$), bem como sulfóxido de butilcisteína (CBP vs. CS: FC = 0,61 e $p < 0,0001$; PFIC3 vs. CS: FC = 0,76 $p \leq 0,000466$; e CEP vs. CS: FC = 0,70 e $p \leq 0,0000585$).

A S-allyl-cys é um doador natural de sulfeto de hidrogênio (H_2S) no corpo humano, desempenhando papéis cruciais no trato gastrointestinal e no fígado (CHOI et al., 2020; GONG et al., 2018; KODAI et al., 2007). Estudos têm ilustrado o impacto positivo do tratamento com S-Allyl-Cys, administrado na dose de 50 mg/kg por dia, na mitigação da fibrose hepática induzida por CCl_4 em ratos. Isso foi substanciado por avaliações de lesões hepáticas por meio de coloração histológica e marcadores bioquímicos no sangue. Além disso, o tratamento com S-Allyl-Cys resultou em uma redução na expressão de genes associada à inflamação e fibrose hepática, juntamente com uma diminuição na fosforilação de proteínas envolvidas em vias de sinalização fibrosa. Esses achados destacam o potencial do S-Allyl-Cys como agente terapêutico para doenças hepáticas. No entanto, é essencial realizar mais pesquisas para avaliar abrangentemente sua eficácia em humanos (CHOI et al., 2020; GONG et al., 2018; KODAI et al., 2007).

Foram observadas diminuições em aminoácidos e derivados, incluindo 4-hidroxiprolina para os grupos CBP e CEP (CBP vs. CS: FC = 0,55 e $p \leq 0,0001$; e CEP vs. CS: FC = 0,71 e $p \leq 0,0001$). Esses resultados também foram observados em (BELL et al., 2015). Houve aumento nos níveis de ácido glutâmico (CBP vs. CS: FC = 1,62 e $p \leq 0,000141$; PFIC3 vs. CS: FC = 1,47 e $p \leq 0,0001$; e CEP vs. CS: FC = 1,88 e $p \leq 0,0001$) e N-metil-beta-alanina (CBP vs. CS: FC = 1,45 e $p \leq 0,0001$; PFIC3 vs. CS: FC = 1,43 $p \leq 0,00002$; e CEP vs. CS: FC = 1,73 e $p \leq 0,0001$). Os metabólitos estatisticamente significativos na comparação entre os tipos de colestase e o grupo CS estão apresentados na TABELA 6.1, juntamente com os metabólitos significativos obtidos das amostras de urina que serão discutidos na seção 6.2.

TABELA 6.1 Tabela *heatmap* contendo os metabólitos significativos entre os tipos de colestase (CBP, CEP ou PFIC3) com amostras do grupo controle (CS) por ANOVA *post-hoc* de Tukey ($p \leq 0.05$). (continuação)

Classe	Metabólito	Matriz Biológica	CBP / CS	PFIC / CS	CEP / CS
			FC	FC	FC
Acilcarnitinas	acetilcarnitina	Plasma	1.91	1.39	1.45
	tridec-6-enodionilcarnitina	Plasma	0.8	1.42	1.67
	10-hidroxi-dodecanoilcarnitina	Plasma	1.88	1.04	1.54
	9-hexadecenilcarnitina	Plasma	1.61	1.24	1.79
	O-adipoilcarnitina	Urina	1.31	1.27	2.26
	3-hidroxideca-6,8-dienoilcarnitina	Urina	0.2	0.32	0.33
	4-octenoilcarnitina	Urina	0.22	0.36	0.38
Aminoácidos e Derivados	alilcisteína	Plasma	0.47	0.59	0.46
	cistina	Plasma	1.78	1.36	1.45
	ácido glutâmico	Plasma	1.6	1.47	1.88
	histidilglicina	Plasma	2.17	1.29	2.24
	N-metil- β -alanina	Plasma	1.45	1.43	1.73
	ácido pirúvico	Plasma	1.34	1.38	1.34
	valina	Plasma	1.63	1.39	1.66
	N-acetilvalina	Urina	8.06	7.63	7.95
	5-aminovalerato	Urina	4.41	3.23	3.83
	tirosina	Urina	0.89	2.29	1.96
	urocanato	Urina	0.94	1.73	1.62
	triptofano 2-C-manosídeo	Urina	1.32	1.15	1.62
	serina	Urina	2.71	3.13	3.86
	prolina	Urina	6.07	7.92	7.4
Ácidos Biliares	GCA 3-glicuronídeo	Plasma	28.15	13.27	26.48
	GCDCA 3-glicuronídeo	Plasma	14.81	6.89	17.05
	GCDCA 3-sulfato	Urina	16.32	12.61	35.6
	GDCA	Plasma	88.56	56.06	155.2
	GLCA 3-sulfato	Plasma	4.70	4.12	5.12
	GLCA	Urina	4.30	4.07	7.91
	TCA	Plasma	18.54	55.93	49.56
	TDCA	Plasma	9.57	16.52	35.7
Ácidos Graxos	ácido 13-hidroperoxilinoico	Plasma	1.86	1.12	1.86
	N-eicosapentanoil-leucina	Plasma	4.71	4.13	5.12
	N-eicosapentanoil-leucina	Urina	3.22	4.02	6.55
	linoleil carnitina	Plasma	1.22	1.41	1.61
	ácido palmitoleico	Plasma	2.12	1.93	2.16
	ácido subérico	Plasma	1.01	1.6	1.41

TABELA 6.1 Tabela *heatmap* contendo os metabólitos significativos entre os tipos de colestase (CBP, CEP ou PFIC3) com amostras do grupo controle (CS) por ANOVA *post-hoc* de Tukey ($p \leq 0.05$).

Classe	Metabólitos	Matriz Biológica	CBP / CS	PFIC / CS	CEP / CS
			FC	FC	FC
Glicerofosfolipídios	PC (16:0/16:0)	Plasma	1.72	1.71	1.94
Esfingolipídios	SM(d-16:1/17:0)	Plasma	1.32	1.62	1.35
Esteroides	DHEA-S	Plasma	0.13	0.65	0.43

Os valores de *fold-change* (FC) indicam as variações observadas quando a comparação entre cada conjunto avaliado resultou em um *p-value* e *q-value* ≤ 0.05 , após a aplicação do teste de Tukey para correção *post-hoc*.

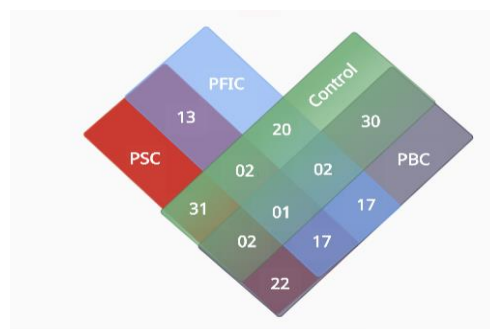
Escala de cor Máx  Min.

6.2 Perfil Metabólico de Três Doenças Hepáticas Colestáticas (PFIC3, CBP e CEP) Comparadas ao Grupo Controle (CS) em amostras de urina

No estudo das amostras de urina 46 metabólitos foram putativamente identificados nos modos de separação RPLC ESI(+) e ESI(-) e 30 metabólitos foram putativamente identificados nos modos HILIC ESI(+) e ESI(-). Dentre o total de 76 metabólitos, 49 foram considerados estatisticamente significativos ($p \leq 0,05$ e $q \leq 0,05$).

Nas comparações entre os metabólitos que diferiram significativamente ($p \leq 0,05$ e $q \leq 0,05$), tem-se:

- CBP vs. CS – 30 metabólitos;
- CEP vs. CS – 31 metabólitos;
- PFIC vs. CS – 20 metabólitos;
- CBP vs. PFIC – 17 metabólitos;
- CBP vs. CEP – 22 metabólitos;
- PFIC vs. CEP – 13 metabólitos.



As classes majoritárias de metabólitos incluem 20 espécies lipídicas, como os ácidos biliares, ácidos graxos, carnitinas, 15 aminoácidos, 03 carboidratos, 03 ácidos orgânicos, 03 xenobióticos, entre outros, conforme descrito na FIGURA 6.5.

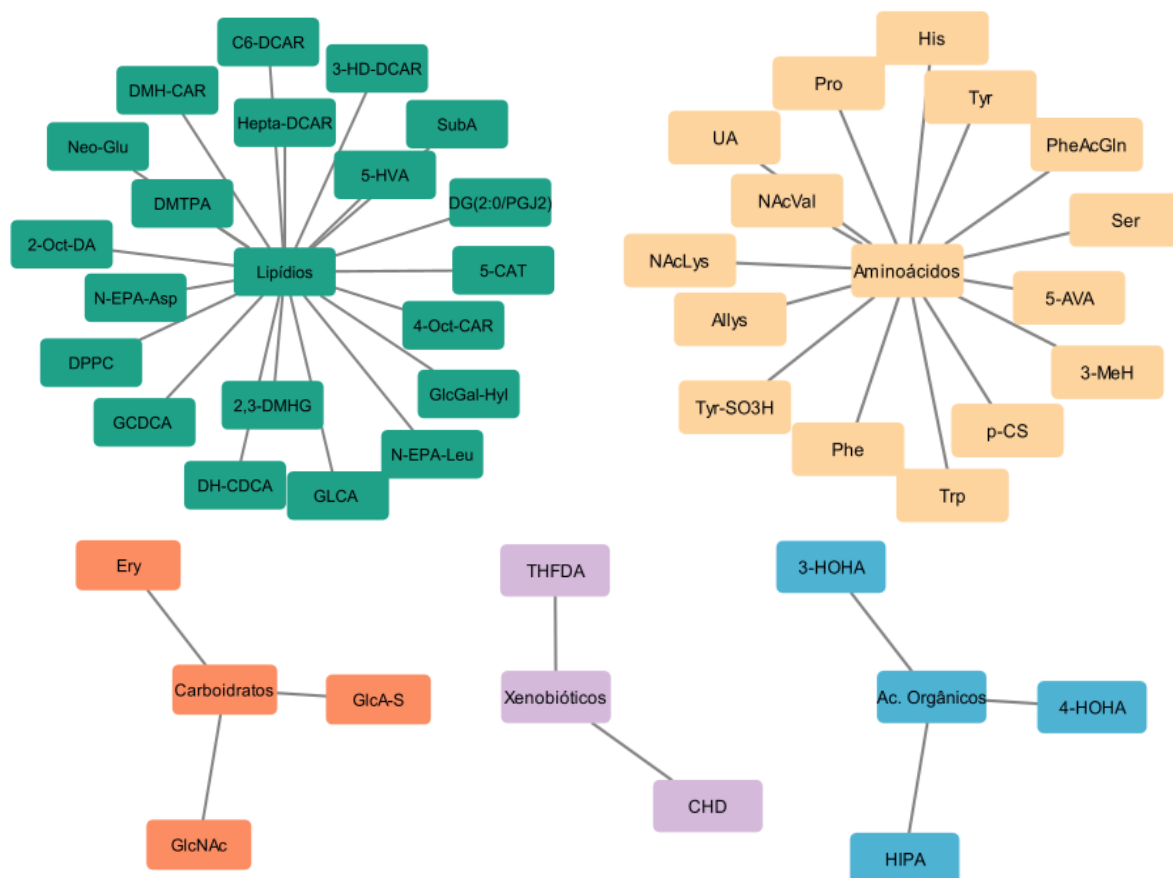


FIGURA 6.5 Metabólitos putativamente identificados nas análises de urina por LC-HRMS nos modos de eluição RPLC e HILIC, a partir das amostras de indivíduos diagnosticados com diferentes tipos de doenças colestáticas (CBP, CEP e PFIC3), bem como do grupo CS. As principais classes de metabólitos são codificadas pelas seguintes cores: Aminoácidos (laranja); Lipídios (verde), Carboidratos (vermelho), Ácidos orgânicos (azul) e Xenobióticos (púrpura).

Os modelos PLS-DA dos dados da urina revelaram uma diferenciação entre os grupos colestáticos e amostras controle (CBP, CEP e PFIC3 vs. CS) e entre os tipos das doenças colestáticas (CBP, CEP e PFIC3), conforme descrito nas FIGURA 6.6A e FIGURA 6.6B. Para ambas as análises foram realizadas normalização Pareto. A robustez do modelo PLS-DA foi verificada por meio de testes de permutação ($p \leq 0,0001$) e a qualidade do modelo multivariado foi avaliada com base no coeficiente de regressão (R^2) e no desempenho preditivo (Q^2), resultando em $Q^2 = 0,4299$, $R^2 = 0,5145$ e Q^2 (cum) = $0,5220$, R^2 (cum) = $0,7589$.

Foram avaliados apenas os grupos de indivíduos com colestase (CBP vs. CEP; CBP vs. PFIC e CEP vs. PFIC) e um modelo PLS-DA também foi conduzido, onde obteve-se $Q^2 = 0,2967$, $R^2 = 0,3889$, alcançando R^2 (cum) = $0,7906$ e Q^2 (cum) = $0,4344$. A validação foi realizada por meio de testes de

permutação no modelo PLS-DA, demonstrando um valor $p \leq 0,0001$ após 1000 permutações.

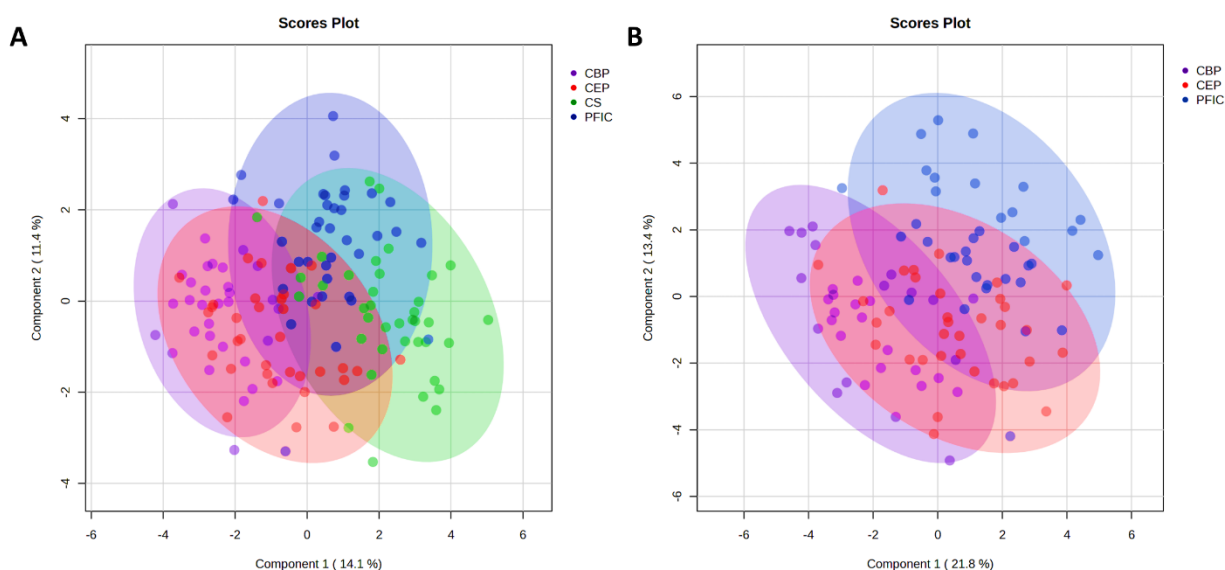


FIGURA 6.6 Análise multivariada PLS-DA das amostras de urina entre os grupos de CBP, CEP, PFIC3 e CS. **(A)** Gráfico de dispersão de *scores* PLS-DA de 132 amostras de urina exibindo a separação entre o grupo CBP (■), CEP (■), PFIC3 (■) e o grupo CS (■); **(B)** Gráfico de dispersão de *scores* PLS-DA exibindo a separação entre os três tipos de colestase: CBP (■), CEP (■) e PFIC3 (■). Análises LC-HRMS, nos modos de ionização ESI(+) e ESI(-).

Para classificar os metabólitos responsáveis pela separação dos grupos, utilizou-se a pontuação de Importância Variável na Projeção (VIP) ($VIP \geq 1$), conforme mostrado na FIGURA 6.7. Os metabólitos-chave que contribuíram para essa separação no PLS-DA ($VIP \geq 1$) incluíram diversos ácidos biliares, como o 5β -cholane- $3\alpha,7\alpha,12\alpha,24$ -tetrol (5-CAT), o ácido deidroquenodesoxicólico (DH-CDCA), bem como ácidos biliares glicoconjugados, como o ácido glicoquenodeoxicólico (GCDCA), o diacilglicerol DG(2:0/PGJ2), além das carnitinas: 2,6-dimetil-heptanoil carnitina (DMH-CAR), 3-hidroxideca-6,8-dienoilcarnitina (3-HD-DCAR), 4-octanoilcarnitina (4-Oct-Car) e hepta-2,4-dienoilcarnitina (Hepta-DCAR), os aminoácidos citraconato (Cit), o-sulfotirosina (Tyr-SO₃H), fenilalanina (Phe), histidina (His), o corpo cetônico (3-OHB) e 3-hidroxi-butirato e o ácido graxo *N*-eicosapentaenoil aspartato (*N*-EPA-Asp) e o ácido 2-octenedioico (2-Oct-DA) (FIGURA 4.7).

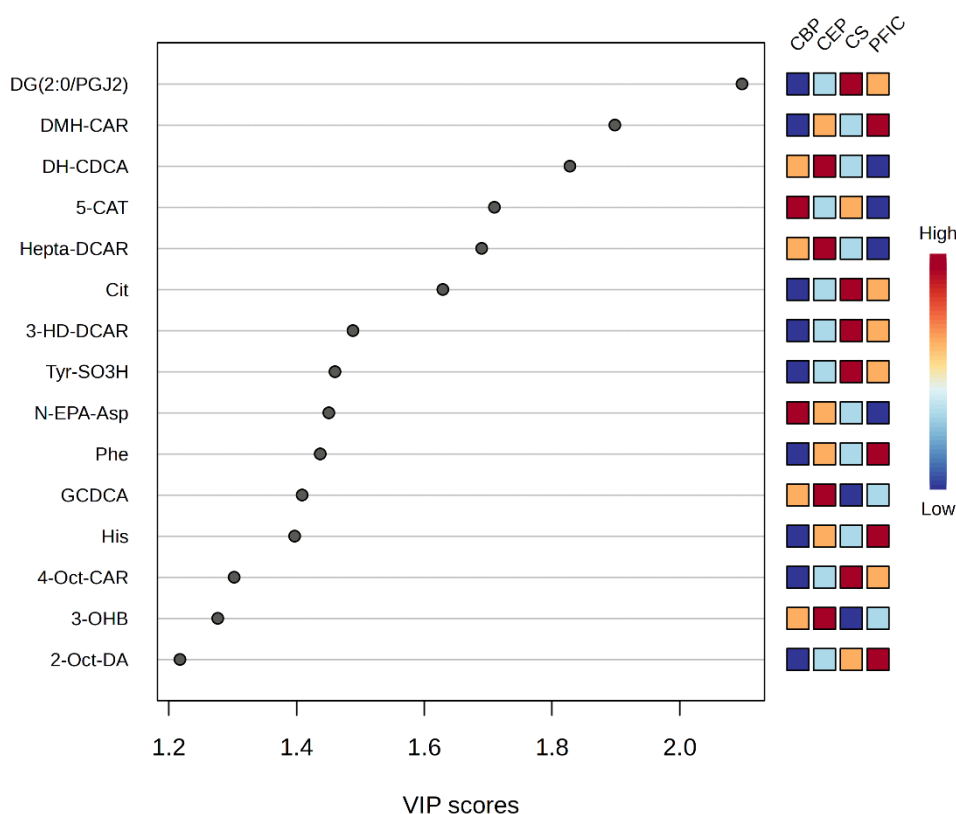


FIGURA 6.7 VIP scores obtidos a partir do modelo PLS-DA das análises das amostras de urina. As caixas coloridas indicam se a concentração de metabólitos está aumentada (vermelha) ou diminuída (azul).

Consistente com os resultados das amostras de plasma (TABELA 6.1), foram observados níveis elevados de ácidos biliares glicoconjugados, como o glicoquenodesoxicolato 3-sulfato (GCDCA 3-sulfato) (CBP vs. CS: FC = 16,32 e $p \leq 0,00001$; CEP vs. CS: FC = 12,61 e $p \leq 0,000001$; e PFIC3 vs. CS: FC = 35,60 e $p \leq 0,0003$). Foram também observadas alterações nos níveis de ácido glicolítico 3-sulfato (GLCA 3-sulfato) (CBP vs. CS: FC = 4.30 e $p \leq 0,0005$; CEP vs. CS: FC = 7.91 e $p \leq 0,0002$; PFIC3 vs. CS: FC = 4.07 e $p \leq 0,001$).

Além disso, foram identificados níveis elevados de *N*-eicosapentaenoil leucina (CBP vs. CS: FC = 3.23 e $p \leq 0,0006$; CEP vs. CS: FC = 6.55 e $p \leq 0,002$; PFIC3 vs. CS: FC = 4.03 e $p \leq 0,004$) e 3-hidroxihipurato (CBP vs. CS: FC = 3.49 e $p \leq 0.0004$; CEP vs. CS: FC = 3,26, $p \leq 0,0001$; PFIC3 vs. CS: FC = 3.10 e $p \leq 0,0001$).

Ao contrário dos resultados obtidos para as amostras de plasma, na urina foram detectados níveis reduzidos de carnitinas para as espécies 3-hidroxideca-6,8-dienoilcarnitina (CBP vs. CS: FC = 0,20 e $p \leq 0,0001$; CEP vs. CS: FC = 0.32 e $p \leq 0,00006$; PFIC3 vs. CS: FC = 0.33 e $p \leq 0,00003$) e 4-octenoilcarnitina (CBP vs. CS: FC = 0.22 e $p \leq 0,000001$; CEP vs. CS: FC = 0.36

e $p \leq 0,00001$; PFIC3 vs. CS: FC = 0.38 e $p \leq 0,00004$), em comparação ao grupo CS.

Aminoácidos, incluindo prolina (CBP vs. CS: FC = 6.07 e $p < 0,0001$; CEP vs. CS: FC = 7.40 e $p < 0,0001$; PFIC3 vs. CS: FC = 7.92 e $p < 0,0001$); fenilacetilglutamina (CBP vs. CS: FC = 4.18 e $p < 0,0001$; CEP vs. CS: FC = 3.25 e $p < 0,0001$; PFIC3 vs. CS: FC = 3.98 e $p < 0,0001$); *N*-acetilvalina (CBP vs. CS: FC = 8.06 e $p < 0,0001$; CEP vs. CS: FC = 7.95 e $p < 0,0001$; PFIC3 vs. CS: FC = 7.63 e $p < 0,0001$); 3-metilhistamina (CBP vs. CS: FC = 1.40 e $p \leq 0,0001$; CEP vs. CS: FC = 1.44 e $p \leq 0,0001$; PFIC3 vs. CS: FC = 1.46 e $p \leq 0,00004$); serina (CBP vs. CS: FC = 2,71 e $p < 0,0001$; CEP vs. CS: FC = 3,86 e $p < 0,0001$; PFIC3 vs. CS: FC = 3,13 e $p < 0,0001$); 5-aminovalerato (PFIC3 vs. CS: FC = 3,23 e $p < 0,0001$; CEP vs. CS: FC = 3,82 e $p < 0,0001$; CBP vs. CS: FC = 4.42 e $p < 0,0001$); *N*- α -acetil-lisina (CEP vs. CS: FC = 2,76 e $p \leq 0,0002$; PFIC3 vs. CS: FC = 2,51 e $p < 0,0001$; CBP vs. CS: FC = 1,89 e $p \leq 0,0003$), exibiram níveis significativamente elevados em indivíduos diagnosticados com colestase em comparação com o grupo CS.

Também foi observado alterações nos níveis do corpo cetônico de 3-hidroxi-butarato (CBP vs. CS: FC = 1,40 e $p < 0,0001$; CEP vs. CS: FC = 1,44 e $p < 0,0001$; PFIC3 vs. CS: FC = 1,46 e $p < 0,0001$). Os corpos cetônicos são substâncias produzidas pelo fígado a partir da oxidação dos ácidos graxos livres, que ocorre principalmente durante períodos de jejum prolongado, dietas com baixo teor de carboidratos ou em situações de metabolismo alterado, como na diabetes. Durante este processo, os ácidos graxos são transportados dos tecidos adiposos até o fígado, onde são convertidos em corpos cetônicos, incluindo o ácido 3-hidroxi-butírico (MØLLER, 2020).

Foram consistentemente observadas elevações nos níveis de ácidos biliares tanto na urina quanto no plasma em todos os três grupos colestatos, em comparação com o grupo CS. Especificamente, os pacientes com PFIC3 apresentaram as menores elevações, enquanto o grupo CEP e CBP exibiram as mudanças mais pronunciadas. Além disso, identificamos concentrações alteradas de carnitinas e ácidos graxos tanto em amostras de plasma quanto de urina desses indivíduos.

Foram investigados os efeitos do gênero sobre os metabólitos discriminantes presentes na urina. Os resultados indicaram que o gênero exerce influência significativa sobre os seguintes metabólitos, incluindo ácido urocânico ($p = 0,004$); eritrose ($p = 0,001$); 1,2-ciclohexanediol ($p = 0,001$), histidina ($p = 0,001$); *N*-estearoil valina ($p = 0,01$); 2,3-dipalmitoilglicerilcisteína ($p = 0,020$); creatinina ($p = 0,014$) e DG(2:0/0:0/PGJ2) ($p < 0,00001$).

No geral, essas descobertas destacam a presença de interrupções metabólicas em várias vias bioquímicas, incluindo o metabolismo de aminoácidos, ácidos graxos, carnitinas e glicerofosfolipídios. Essas observações sugerem alterações no metabolismo mitocondrial, processo inflamatório recorrente e possíveis progressões para fibrose hepática em indivíduos com essas condições colestáticas.

6.3 Classificação dos três diferentes tipos de Doenças Colestáticas (CBP, CEP e PFIC3)

Nessa parte do trabalho, foram conduzidos experimentos para identificar alterações metabólicas que permitissem classificar os três diferentes tipos de doenças colestáticas, no entanto, analisar as diferenças metabólicas entre os diferentes tipos de colestase é desafiador devido à sobreposição de metabólitos nessas condições clínicas.

Com isso, foram comparados os perfis metabólicos obtidos pela metabolômica *untargeted* por LC-HRMS no sentido de elucidar as alterações características de vias metabólicas distintas. Essas descobertas podem ter implicações significativas na melhoria do diagnóstico, incluindo a identificação de alterações patológicas específicas e o perfil de resposta ao tratamento para cada subtipo da doença.

6.3.1 Identificação Putativa de Metabólitos Discriminantes para a CBP em Amostras de Plasma

Um total de 06 metabólitos foram encontrados como discriminantes entre os grupos CBP e PFIC3 e 04 metabólitos foram classificados como discriminantes entre os grupos CBP e CEP, conforme mostrado na TABELA 6.2.

Os pacientes com CBP exibem uma redução modesta nos níveis de aminoácidos, carnitinas, lisofosfatidilcolinas (LPCs) e ácidos graxos quando comparados aos grupos PFIC3 e CEP.

Para esta análise, a resposta analítica dos metabólitos foi normalizada em relação ao grupo CBP, permitindo a observação de alterações sutis nos níveis desses metabólitos. Nos pacientes com CBP, foi observada uma diminuição nos níveis de LPCs em comparação aos grupos PFIC3 e CEP. O metabólito LPC (16:0) (CBP vs. CEP: FC = 0,69 e $p \leq 0,004$), e LPC (18:1) (CBP vs. PFIC3: FC = 0,67 e $p \leq 0,009$; e CBP vs. CEP: FC = 0,60 e $p \leq 0,0004$).

Níveis reduzidos também foram encontrados para ácidos graxos, como o DG(2:0/0:0/PGJ2) (CBP vs. PFIC3: FC = 0,36 e $p \leq 0,00005$; CBP vs. CEP: FC = 0,29 e $p < 0,0001$).

O grupo CBP também apresentou desregulação nos níveis de acilcarnitinas de cadeia curta em comparação com o grupo CS, bem como em comparação com os grupos PFIC3 e CEP. Isso é evidenciado pelos níveis aumentados de acetilcarnitina (CBP vs. CS: FC = 1,91 e $p < 0,0001$, CBP vs. PFIC3: FC = 1,37 e $p = 0,004$; CBP vs. CEP: FC = 1,31 e $p = 0,005$) e propionilcarnitina (CBP vs. PFIC3: FC = 1,38 e $p = 0,00096$ e CBP vs. CEP: FC = 1,51 e $p = 0,0004$).

Os níveis de cistina exibiram um aumento estatisticamente significativo em pacientes com CBP em comparação com o grupo CS (CBP vs. CS: FC = 1,78 e $p < 0,00001$; e CBP vs. PFIC3: FC = 1,31 e $p = 0,0002$). Este metabólito também é significativo para a idade ($p \leq 0,003$). A cisteína e a cistina, constituem o par redox predominante no plasma, e são fundamentais para manter a homeostase redox. No entanto, neste estudo, a cisteína não foi identificada como um metabólito significativo. Variações nas concentrações desses aminoácidos indicam alterações no comportamento redox, que são pertinentes ao processo de envelhecimento. Por exemplo, um aumento no estado oxidativo, caracterizado por uma proporção aumentada de cistina para cisteína, pode sinalizar uma intensificação do estresse oxidativo, uma condição frequentemente associada ao envelhecimento (WATSON et al., 2020).

6.3.2 Identificação Putativa de Metabólitos Discriminatórios para a CBP em Amostras de Urina

Os resultados da análise metabolômica comparando os três grupos de colestase (CBP, PFIC e CEP) são representados na TABELA 6.1 e uma lista detalhada de todos os metabólitos identificados, categorizados por classificação e subvias metabólicas, juntamente com suas alterações nas comparações intergrupais, é fornecida no Apêndice II.

Ao comparar o grupo CBP com os grupos CEP e PFIC3, foram identificados 06 metabólitos na urina que demonstraram uma discriminação significativa, exibindo níveis reduzidos no grupo CBP.

Os níveis de DG(2:0/0:0/PGJ2) (CBP vs. CEP: FC = 0,16 e $p \leq 0,0004$; CBP vs. PFIC3: FC = 0,17 e $p \leq 0,0007$) mostraram-se reduzidos tanto para as amostras de plasma quanto para as amostras de urina (TABELA 6.1, TABELA 6.2 e FIGURA 6.8). Os metabólitos 2,3-dipalmitoil-glicerilcisteína e

ácido 2-octenodioico, são estatisticamente significativos, no entanto, o valor de FC não apresentou relevância estatística.

O citraconato (CBP vs. CEP: FC = 0,58 e $p \leq 0,004$; CBP vs. PFIC3: FC = 0,50 e $p \leq 0,00005$), conforme mostrado na FIGURA 6.8E, está relacionado ao ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) e sua alteração tem classificado esse metabólito como um possível biomarcador para CBP de acordo com Hao et al., (2017). O citraconato está envolvido no ciclo do TCA ou ciclo de Krebs e desempenha um papel crucial na modulação da resposta imunológica atuando como um sinalizador metabólico e regulador de processos inflamatórios (YANG et al., 2023). A diminuição nos níveis desse metabólito pode indicar disfunção metabólica ou alterações nos processos fisiológicos associados ao ciclo do TCA.

Além disso, foi identificado um leve aumento no 3-hidroximetilglutarato no grupo CBP em comparação ao PFIC3 nas amostras de urina, embora o FC calculado não tenha se mostrado significativo. Estudos afirmam que alterações na excreção urinária de intermediários do ciclo do TCA estão associadas à disfunção mitocondrial, assim como níveis alterados de corpos cetônicos podem estar relacionados a doenças metabólicas, diabetes, doenças inflamatórias imunomediadas (DII), câncer, entre outros (KANG et al., 2021).

Os aminoácidos e seus derivados exibem tanto índices elevados quanto diminuídos em comparação aos grupos CBP e PFIC3 nas amostras de urina. Especificamente, a histidina demonstrou níveis reduzidos na urina (CBP vs. CEP: FC = 0.55 e $p \leq 0,0004$; CBP vs. PFIC3: FC = 0.50 e $p \leq 0,00001$). Embora a função da histidina no meio celular ainda não esteja completamente esclarecida, estudos realizados em células epiteliais de ratos sugerem que níveis reduzidos de histidina estão associados a distúrbios mitocondriais, resultando na diminuição do potencial de membrana mitocondrial e eventual apoptose celular (MATSUI et al., 2017).

Níveis diminuídos também foram identificados em amostras de urina para a fenilalanina quando comparado aos demais grupos CEP e PFIC3 (CBP vs. CEP: FC = 0,58 e $p \leq 0,0001$; CBP vs. PFIC3: FC = 0,58 e $p \leq 0,00001$) e o-sulfotirosina mostrou-se bastante diminuído quando comparado aos demais grupos (CBP vs. CEP: FC = 2.77 $p \leq 0,0094$ e CBP vs. PFIC3: FC = 4.23 e $p \leq 0,0003$).

TABELA 6.2 Tabela *heatmap* contendo os metabólitos significativos, entre os tipos de colestase (CBP, CEP ou PFIC3) por ANOVA *post-hoc* de *Tukey* ($p \leq 0.05$).

Classe	Metabólito	Matriz Biológica	[1/(CS/CBP)]	[1/(PFIC/CBP)]	[1/(CEP/CBP)]
			FC	FC	FC
Acilcarnitinas	acetilcarnitina	Plasma	1.91	1.37	1.31
	propanoilcarnitina	Plasma	1.54	1.38	1.51
Aminoácidos	histidina	Urina	0.63	0.5	0.55
	o-sulfotirosina	Urina	0.23	0.22	0.36
	fenilalanina	Urina	0.7	0.58	0.58
	4-hidroxiprolina	Plasma	0.55	0.69	1.27
	triptofano	Plasma	0.65	0.67	1.3
Ácidos Graxos	DG (2:0/PGJ2)	Plasma	0.29	0.36	0.29
	DG (2:0/PGJ2)	Urina	0.12	0.17	0.16
Ciclo do TCA	citraconato	Urina	0.44	0.50	0.58
Lisofosfolípeidos	LPC(16:0)	Plasma	0.7	0.72	0.69
	LPC (18:1)	Plasma	0.72	0.67	0.6
Xenobióticos	1,2-ciclohexanodiol	Urina	0.42	0.56	0.43

Os valores de *fold-change* (FC) indicam as variações observadas quando a comparação entre cada conjunto avaliado resultou em um p -value e q -value ≤ 0.05 , após a aplicação do teste de *Tukey* para correção *post-hoc*. Escala de cor Máx  Min.

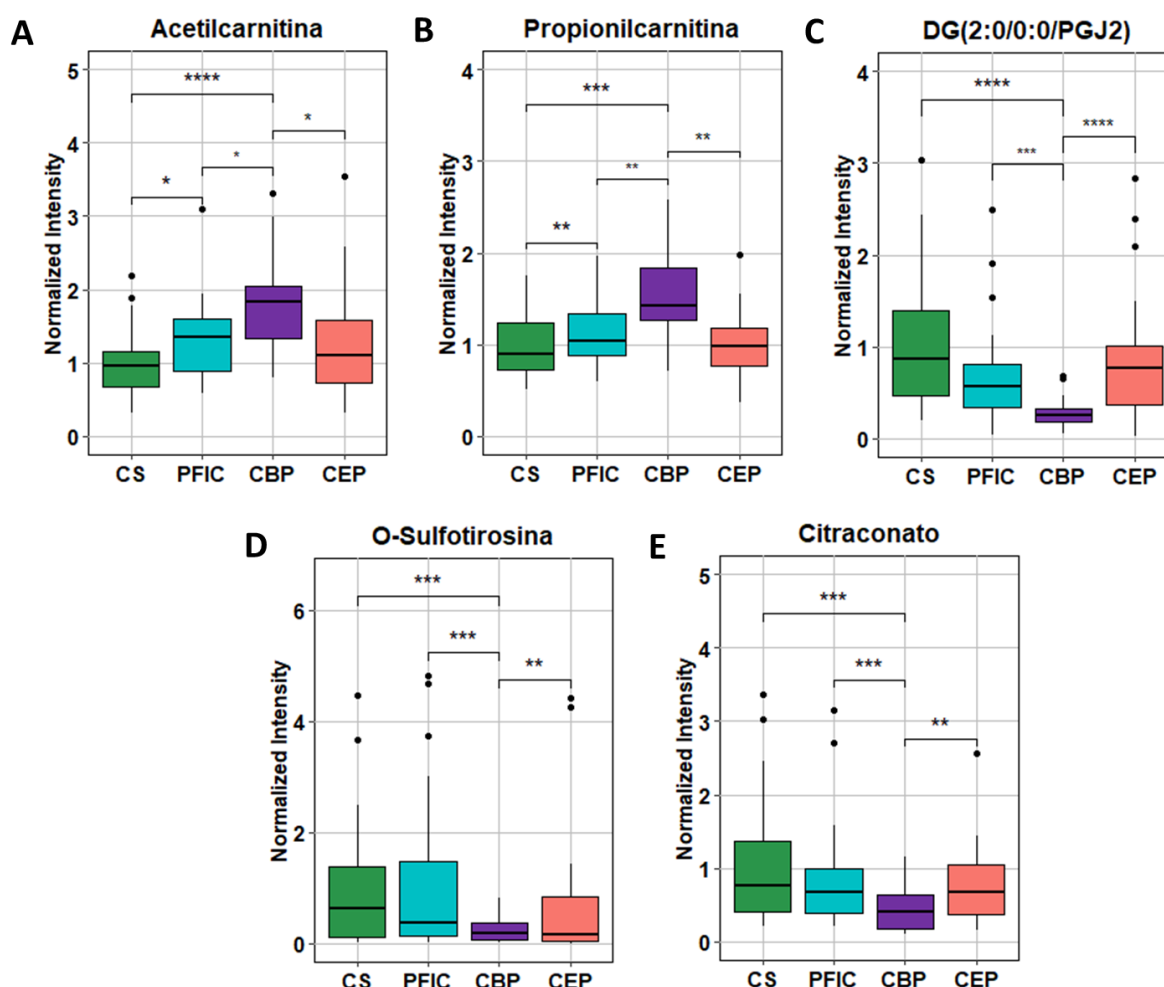


FIGURA 6.8 Boxplots (*box-and-whisker*) dos potenciais metabólitos discriminantes para CBP (■), em comparação com os grupos CEP (■), PFIC3 (■) e CS (■) em amostras de plasma e urina. O eixo y mostra as intensidades normalizadas dos metabólitos. Em destaque nas amostras de plasma (A) acetilcarnitina; (B) propionilcarnitina; (C) DG(2:0/0:0/PGJ2) e (D) o-sulfotirosina e (E) citraconato nas amostras de urina.

O boxplot representa a faixa interquartil (IQR), abrangendo a maioria dos dados, enquanto as extremidades (“whiskers”) se estendem aos valores extremos. Todos os metabólitos exibidos foram significativamente elevados (como indicado por $p \leq 0,05$ e $q \leq 0,05$) para os grupos CS, PFIC3 e CEP quando comparados a CBP.

6.4 Identificação Putativa de Metabólitos Discriminatórios para a PFIC3 em plasma

Nas análises das amostras de plasma de pacientes com PFIC3 foram identificadas alterações nos níveis de diferentes classes de metabólitos. Um total de 08 metabólitos foram encontrados como potenciais discriminantes entre os grupos PFIC3 e CEP e 9 metabólitos foram classificados com potencial poder discriminatório entre os grupos PFIC3 e CBP (TABELA 6.. Dessa forma, nessa seção, destacaremos de maneira mais específica os metabólitos relacionados à diferenciação de PFIC3.

Durante a análise, os metabólitos com alterações significativas foram normalizados em relação ao grupo PFIC3, possibilitando o cálculo do *fold-change* (FC) e a identificação de variações nos níveis de cada metabólito específico dentro deste grupo.

Particularmente diferenças estatisticamente significativas foram detectadas com níveis reduzidos de ácidos biliares glicoconjugados no grupo PFIC3 em comparação aos grupos CBP e CEP, como exemplo o GCA 3-glicuronídeo (PFIC3 vs. CBP, FC = 0,47 e $p \leq 0,002$; PFIC3 vs. CEP, FC = 0,57 e $p \leq 0,001$). Regulação negativa também foi encontrada para o GCDCA 3-glicuronídeo (PFIC3 vs. CBP, FC = 0,46 e $p \leq 0,01$; PFIC3 vs. CEP, FC = 0,40 e $p \leq 0,004$) e o GDCA (PFIC3 vs. CEP, FC = 0,36 e $p \leq 0,005$). Esses resultados sugerem uma resposta favorável ao tratamento com UDCA, o que pode ser indicativo da eficácia terapêutica para pacientes com PFIC3.

Níveis elevados de glicilprolina foram identificados em pacientes com PFIC3 (PFIC3 vs. CEP, FC = 1,66 e $p \leq 0,003$; PFIC3 vs. CBP: FC = 1.47 e $p \leq 0.013$). Notavelmente, níveis elevados de ácido urocânico (PFIC3 vs. CBP, FC = 1,76 e $p \leq 0,0005$; PFIC3 vs. CEP, FC = 1,76 e $p \leq 0,0001$), um metabólito relacionado ao metabolismo da histidina, o qual apresentou alterações quando comparado entre grupos, mesmo que não tenham sido identificadas mudanças nos níveis de histidina no plasma de pacientes com PFIC3.

O ácido subérico, derivado do ácido oleico, é um metabólito ligado à deficiência de carnitina-acilcarnitina translocase e também encontrado em pacientes com distúrbios da oxidação de ácidos graxos, incluindo deficiência de carnitina palmitoiltransferase (CPT) (VITORIA et al., 2015). Níveis elevados desse metabólito foram identificados no grupo PFIC3 em comparação com CBP em plasma (PFIC3 vs. CBP: FC = 1,58 e $p \leq 0,0006$). O acúmulo desse metabólito já foi relatado em estudos envolvendo PFIC tipo 2, nos quais pacientes apresentam mutação do gene ABCB11 (ZHANG et al., 2012). No entanto, os demais ácidos

graxos identificados no estudo de Zhang et al. (2012) não foram identificados nesse trabalho.

Foi identificado esfingomielinas, a SM(d16:1/17:0), com níveis elevados em indivíduos com PFIC3 em relação ao grupo CBP e CS (PFIC3 vs. CS: FC = 1,62 e $p < 0,0001$) e a esfingosina 1-fosfato (d16:1-P) - (S1P) (PFIC3 vs. CS: FC = 1,32 e $p \leq 0,017$; PFIC3 vs. CBP: FC = 1,54 e $p \leq 0,0008$), conforme TABELA 4.3. Os esfingolipídios estão relacionadas a sinalização celular, apoptose e regulação da função de proteínas de membrana, conforme reportado por (ALJOHANI et al., 2013). A classe dos esfingolipídios vem sendo reportado na literatura como potenciais biomarcadores para colestase intra-hepática na gravidez (MIKUCKA-NICZYPORUK et al., 2020). De acordo com (JACKSON; WAY; ZHOU, 2022), a identificação da interação entre o metabolismo dos ácidos biliares e esfingolipídios direcionou novos estudos envolvidos no metabolismo lipídico hepático. Doenças como esteatose hepática não alcoólica (NAFLD), obesidade que pode levar a diabetes tipo 2 (GREEN et al., 2021), doenças inflamatórias, bem como doenças cardiovasculares como a aterosclerose (IQBAL et al., 2017), estão relacionadas a esses distúrbios metabólicos. Nesse contexto, os esfingolipídios emergem como possíveis biomarcadores para PFIC3, embora, seja importante estudos adicionais para validar essa associação.

6.4.1 Identificação Putativa de Metabólitos Discriminatórios para PFIC3 em Amostras de Urina

Em concordância com os resultados das amostras de plasma, o ácido urocânico também foi detectado em níveis elevados na urina de pacientes com PFIC3. Em comparação com o CBP, a presença do ácido urocânico em amostras de plasma e urina dos pacientes pode ser considerada um metabólito útil na distinção e classificação entre esses dois grupos (PFIC3 vs. CBP: FC = 1,71 e $p \leq 0,0004$).

Pacientes com PFIC3 apresentam níveis mais baixos de ácidos biliares glicoconjugados em comparação ao observado para os grupos CEP e CBP, conforme demonstrado previamente nas análises de plasma. Esse dado foi corroborado nos resultados da urina para o metabólito GCDCA (PFIC3 vs. CEP: FC = 0,35 e $p \leq 0,001$), conforme apresentado na TABELA 6.3 e FIGURA 6.9. Assim, os ácidos biliares podem servir como potenciais biomarcadores para distinguir pacientes com PFIC3 e CEP que não têm doença inflamatória intestinal (DII), bem como para diferenciá-los do grupo CBP.

Além disso, observou-se níveis reduzidos de acilcarnitinas, como a hepta-2,4-dienoilcarnitina, quando comparados as análises provenientes dos pacientes com CEP (CEP vs. PFIC: FC = 0.65 e $p < 0,00001$).

A acilcarnitina 2,6-dimetil-heptanoilcarnitina, um éster de carnitina, desempenha um papel crucial no transporte de ácidos graxos de cadeia média através da membrana mitocondrial interna para o metabolismo energético. Essa molécula é essencial para a oxidação e produção de energia dos ácidos graxos nas mitocôndrias. Os níveis desse metabólito aumentaram significativamente para o grupo PFIC3 (PFIC3 vs. CBP: FC = 4,95 e $p \leq 0,0006$; PFIC3 vs. CEP: FC = 2,24 e $p \leq 0,002$). Conforme relatado por Zhao et al. (2017), a exposição de camundongos a isotiocianato de α -naftil (ANIT) induziu nos animais a PFIC3, o que culminou no aumento dos níveis de acilcarnitinas e triglicerídeos de cadeia longa. Além disso, observou-se uma redução na expressão de genes associados à β -oxidação de ácidos graxos em amostras de soro.

TABELA 6.3 Tabela *heatmap* contendo os metabólitos significativos, comparando-se a PFIC3 com CBP e CEP por ANOVA *post-hoc* de Tukey ($p \leq 0.05$).

Classes	Metabólito	Matriz Biológica	[1/(CS/PFIC3)]	[1/(CBP/PFIC3)]	[1/(CEP/PFIC3)]
			<i>Fold-change</i>	<i>Fold-change</i>	<i>Fold-change</i>
Aminoácidos	urocanato	Plasma	1.54	1.76	1.76
Aminoácidos	urocanato	Urina	1.73	1.71	0.93
Ácidos Biliares	GCA 3-glicuronideo	Plasma	13.27	0.47	0.57
Ácidos Biliares	GCDCA 3-glicuronideo	Plasma	6.89	0.46	0.4
Ácidos Biliares	GCDCA 3-sulfato	Urina	12.6	0.77	0.35
Ácidos Biliares	GDCA	Plasma	56.06	0.63	0.36
Acilcarnitinas	2,6-dimetil-heptanoilcarnitina	Urina	2.48	4.95	2.24
	hepta-2,4-dienoilcarnitina	Urina	1.12	0.72	0.65
Dipeptídeos	glicilprolina	Plasma	1.77	1.47	1.66
Acil graxos	ácido subérico (suberato)	Plasma	1.6	1.58	1.13
Esfoliolipídios	SM(d16:1/17:0)	Plasma	1.62	1.23	1.2
	ssfingosina 1-fosfato	Plasma	1.32	1.54	1.01

Os valores de *fold-change* (FC) indicam as variações observadas quando a comparação entre cada par de grupos resultou em um p -value e q -value ≤ 0.05 , após a aplicação do teste de Tukey para correção *post-hoc*. Escala de cor Máx  Min.

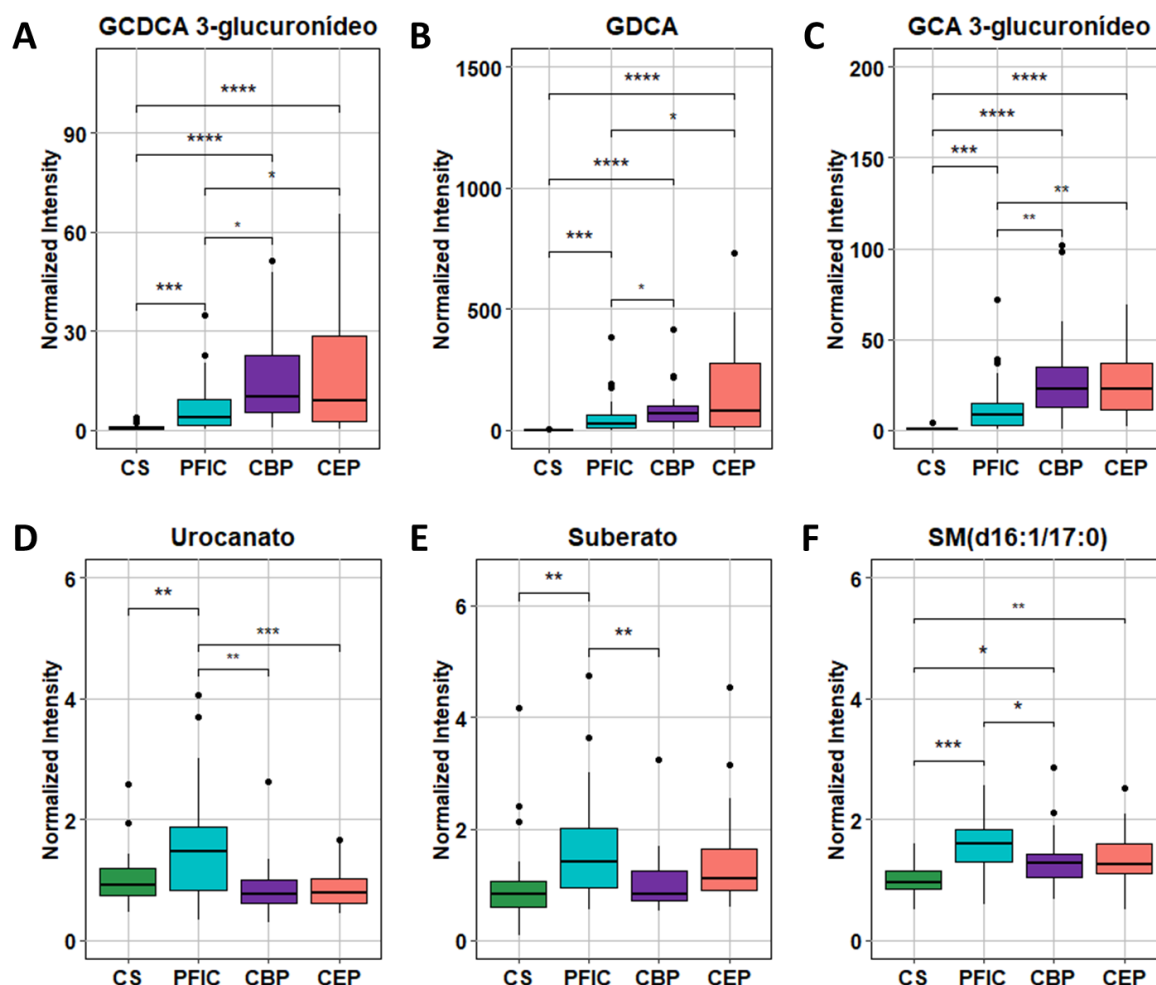


FIGURA 6.9 Boxplots (*box-and-whisker*) dos potenciais metabólitos discriminantes para PFIC3 (■), em comparação com os grupos CEP (■), CBP (■) e CS (■) em amostras de plasma e urina. O eixo y mostra as intensidades normalizadas dos metabólitos. Destaque para as amostras de plasma (A) GCDCA 3-glicuronídeo; (B) GDCA; (C) GCA 3-glicuronídeo e para as amostras de urina (D) urocanato; (E) suberato e (F) SM(d16:1/17:0).

O boxplot representa a faixa interquartil (IQR), abrangendo a maioria dos dados, enquanto as extremidades (“whiskers”) se estendem aos valores extremos. Todos os metabólitos exibidos foram significativamente elevados (como indicado por $p \leq 0,05$ e $q \leq 0,05$) para os grupos CS, PFIC3 e CEP quando comparados a CBP.

6.4.2 Identificação Putativa de Metabólitos Discriminatórios para a CEP em plasma

Para as análises das amostras de plasma de pacientes com CEP foram encontradas alterações nos níveis de 02 metabólitos como potenciais discriminantes entre os grupos PFIC3 e CEP e de 06 metabólitos entre os grupos PFIC3 e CBP.

Em comparação com o grupo CEP, foram observados níveis significativamente elevados de ácidos biliares em relação ao grupo PFIC3 (GDCA, GCA, GLCA e GCDCA; $p \leq 0,05$), conforme descrito nas seções anteriores. Adicionalmente, houve aumento nos níveis de bilirrubina (CEP vs. CBP; FC = 1,81 e $p \leq 0,00004$; CEP vs. PFIC3: FC = 2,25 e $p \leq 0,0004$). Houve também aumento nos níveis de acilcarnitinas, em comparação a CBP, destacando-se o aumento significativo em tridec-6-enodioilcarnitina (CEP vs. CBP, FC = 2,08 e $p = 0,0004$).

Um distúrbio comum do metabolismo lipídico em adultos é a deficiência da carnitina palmitoiltransferase II mitocondrial (CPT II), caracterizada pelo acúmulo de carnitina linoleila, um éster de carnitina e ácido graxo acil de cadeia longa, geralmente detectado em indivíduos diagnosticados. Defeitos no transporte de carnitina para as mitocôndrias estão associados à incapacidade de produzir energia a partir de ácidos graxos de cadeia longa, o que pode resultar em disfunção hepática, cardiomiopatia, encefalopatia e NASH (BEYOĞLU; IDLE, 2020).

Foi ainda observado uma redução nos níveis de ácido hipúrico para o grupo CEP (CEP vs. CBP: FC = 0,42 e $p = 0,0003$; CEP vs. PFIC3: FC = 0,46 e $p = 0,0004$). De acordo com trabalho publicado por Kündiger et al. (KÜNDIGER et al., 1979) foram examinados os efeitos da administração de tioacetamida em ratas fêmeas para avaliação de efeitos toxicológicos, resultando em uma redução na excreção de ácido hipúrico na urina. Este efeito é atribuído à interferência na síntese mitocondrial do ácido hipúrico. O ácido 2,4-diaminobutírico (CEP vs. CBP: FC = 1,72 e $p \leq 0,0001$; CEP vs. PFIC3: FC = 1,46 e $p \leq 0,005$) mostrou-se alterado em comparação aos grupos PFIC3 e CBP (TABELA 4.4).

Os níveis de sulfato de *p*-cresol foram encontrados diminuídos no grupo CEP (CEP vs. PFIC3: FC = 0,53 e $p = 0,00006$; CEP vs. CBP: FC = 0,46 e $p = 0,00001$).

Sulfato de *p*-cresol é um metabólito tóxico urêmico, derivado do metabolismo da tirosina produzido por bactérias intestinais em indivíduos com

função renal prejudicada, seu processo de formação implica na conversão de aminoácidos aromáticos pela microbiota, seguida pela sulfatação no fígado. Conforme trabalho publicado por Ketteler (KETTELER, 2006) o *p*-cresol possivelmente exerce um efeito direto sobre a síntese de proteínas hepáticas. Isso se baseia em evidências anteriores de estudos *in vitro*, os quais sugerem que o composto apresenta uma notável capacidade de inibir a respiração mitocondrial dos hepatócitos, levando a uma potencial hepatotoxicidade funcional (KITAGAWA, 2001). Assim, a diminuição desses metabólitos em pacientes com cirrose, os quais têm maior propensão ao desenvolvimento de insuficiência hepática crônica, pode indicar uma interação complexa entre a redução da capacidade de sulfatação hepática e disbiose microbiana (LIN et al., 2015).

6.4.3 Identificação de Metabólitos Discriminatórios para CEP em Amostras de Urina

Consistente com as descobertas em amostras de plasma, pacientes com CBP e CEP apresentaram elevações significativamente maiores em ácidos biliares glicoconjugados identificados em amostras de urina em comparação com o grupo PFIC. Ao comparar o grupo CEP com os grupos PFIC e CBP, observam-se níveis mais elevados de ácidos biliares em amostras tanto de plasma quanto de urina, exemplificado por glicocenodeoxicólico-3-sulfato (GCDCA) (CEP vs. PFIC: FC = 2,82 e $p = 0,001$; CBP vs. CEP: FC = 2,18 e $p = 0,006$).

Outros metabólitos que estão em concordância com os resultados obtidos no plasma para as análises de CEP são: sulfato de *p*-cresol (CEP vs. PFIC: FC = 0,67 e $p = 0,005$; CBP vs. CEP: FC = 0,67 e $p = 0,004$) e ácido hipúrico (CEP vs. PFIC: FC = 0,51 e $p = 0,000386$; CBP vs. CEP: FC = 0,55 e $p = 0,003$).

Também há uma tendência para níveis mais altos de outros metabólitos, tais como: 1,7-dimetilguanosina (CEP vs. PFIC: FC = 1,43 e $p = 0,01$; CBP vs. CEP: FC = 1,63 e $p = 0,001$); 2,3-dimetil-3-hidroxiglutarato (2,3-DMHG) (CEP vs. PFIC: FC = 1,90 e $p = 0,006$; CBP vs. CEP: FC = 2,06 e $p = 0,000887$); e ácido glucurônico sulfatado (CEP vs. PFIC: FC = 1,60 e $p \leq 0,005$; CBP vs. CEP: FC = 1,56 e $p = 0,005$), conforme mostrado na TABELA 6.4 e FIGURA 6.10.

TABELA 6.4 Tabela *heatmap* contendo os metabólitos significativos, comparando CEP com CBP e PFIC3 por ANOVA *post-hoc* de Tukey ($p \leq 0.05$).

Classe	Metabólitos	Matriz Biológica	[1/(CS/CEP)]	[1/(PFIC/CEP)]	[1/(CBP/CEP)]
			<i>Fold-change</i>	<i>Fold-change</i>	<i>Fold-change</i>
Amino acids	p-Cresol sulfate	Plasma	0.49	0.53	0.46
	p-Cresol sulfate	Urina	1.08	0.67	0.67
	Triptofano	Urina	1.62	1.41	1.22
Ácido biliar	GCDCA 3-sulfato	Urina	16.32	2.82	2.18
Acilcarnitina	Tridec-6-enodioilcarnitina	Plasma	1.67	1.17	2.08
Cofactores	Bilirrubina	Plasma	1.85	2.25	1.81
Ácidos Graxos	2,3-Dimetil-3-hidroxiglutarato	Urina	1.81	1.9	2.06
Nucleotídeo	1,7-Dimetilguanosine,	Urina	1.59	1.43	1.63
Pirimidine	2,4-Diaminobutírico	Plasma	1.37	1.46	1.72
Xenobioticos	Ácido hipúrico	Plasma	0.43	0.46	0.42
	Ácido hipúrico	Urina	0.5	0.51	0.55
	Ácido glucurônico sulfatado	Urina	1.52	1.6	1.56
Carboidrato	Beta-galactosil	Plasma	0.6	0.88	0.46

Os valores de *fold-change* (FC) indicam as variações observadas quando a comparação entre cada par de grupos resultou em um *p-value* e *q-value* <0.05, após a aplicação do teste de Tukey para correção *post-hoc*. Escala de cor Máx  Min.

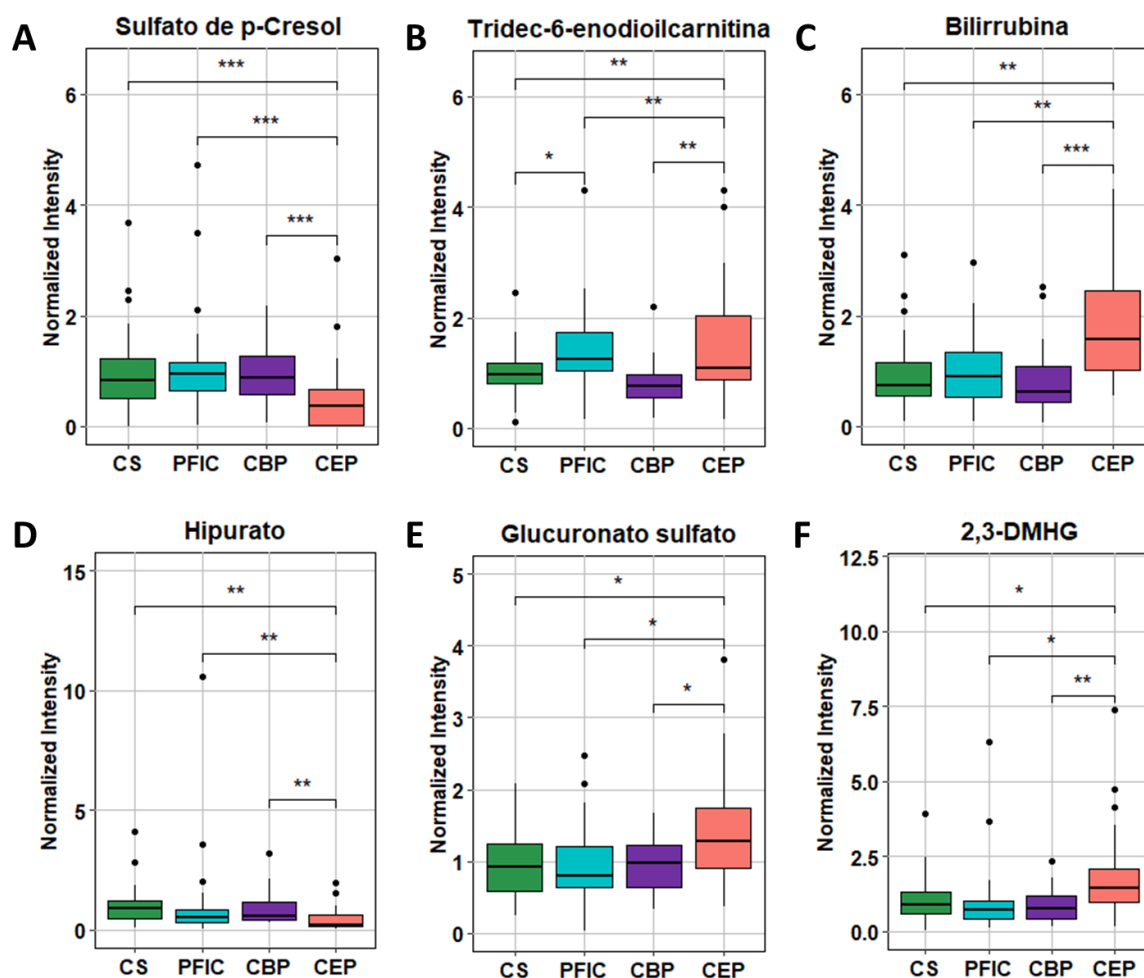


FIGURA 6.10 Boxplots (*box-and-whisker*) dos metabólitos discriminantes para CEP (representados em vermelho), em comparação com os grupos CBP (roxo), PFIC (em azul) e CS (em verde) em amostras de plasma e urina. Em destaque nas amostras de plasma (A) sulfato de p-cresol; (B) tridec-6-enodioilcarnitina; (C) bilirrubina. Em amostras de urina se destacaram os metabólitos (D) hipurato; (E) glucuronato sulfato; (F) 2,3-DMHG (2,3-Dimetil-3-hidroxiglutarato). O eixo y representa as intensidades normalizadas dos metabólitos.

A caixa no gráfico representa a faixa interquartil (IQR), abrangendo a maioria dos dados, enquanto as extremidades (“*whiskers*”) se estendem aos valores extremos. A significância estatística foi avaliada utilizando o método ANOVA seguido de teste *post-hoc*, (como indicado por $p < 0,05$ e $q \leq 0,05$) para os grupos CS, PFIC e CBP quando comparados a CEP.

Em nossas investigações, uma observação notável foi a elevação consistente dos níveis de ácidos biliares tanto na urina quanto no plasma dos indivíduos nos três grupos colestáticos, quando comparados ao grupo CS. Especificamente, os pacientes com PFIC apresentaram a menor elevação, enquanto o grupo CEP e CBP mostraram alterações mais pronunciadas. Além disso, níveis alterados de carnitinas e ácidos graxos foram identificados tanto em amostras de plasma quanto de urina para esses indivíduos.

No geral, essas descobertas destacam a presença de interrupções metabólicas envolvendo diversas vias, incluindo o metabolismo de aminoácidos, o metabolismo de ácidos graxos, carnitinas e glicerofosfolipídios. Essas observações sugerem alterações no metabolismo mitocondrial, processo de inflamação recorrente e possível progressão para fibrose hepática em indivíduos com essas condições colestáticas.

6.5 Alterações de Ácidos Biliares em Amostras de Plasma e Urina

O fígado humano sintetiza de maneira intrincada dois ácidos biliares-chave, ácido cólico (CA) e ácido quenodeoxicólico (CDCA), por meio do metabolismo do colesterol. Diariamente, o fígado produz 200 a 600 mg de ácidos biliares por meio de duas vias principais envolvendo 17 enzimas distintas [86]. A via clássica inicia-se com a CYP7A1 gerando CDCA, sendo esse convertido em CA pelo CYP8B1. Em contraste, a via alternativa, catalisada pela CYP27A1, inicia com o metabolismo da cadeia lateral do colesterol, desempenhando um papel crucial em neonatos e fígados comprometidos quando a via clássica é subdesenvolvida [86]. Os ácidos biliares primários (CA e CDCA) são transformados em ácido desoxicólico (DCA) e ácido litocólico (LCA), sendo que o CDCA também pode ser transformado em ácido ursodesoxicólico (UDCA) (JACKSON; WAY; ZHOU, 2022). A conjugação de ácidos biliares com taurina e glicina aumenta a solubilidade desses nos hepatócitos. Após a secreção na bile, eles passam por reabsorção no íleo terminal, retornando ao fígado através da circulação portal (DAWSON; KARPEN, 2015). Os ácidos biliares estimulam o fluxo biliar e a secreção de fosfolipídios biliares. Além disso, promovem a transferência de fosfolipídios das membranas canaliculares para a bile, aumentando assim a formação de micelas mistas e reduzindo a concentração de ácidos biliares livres para prevenir danos aos ductos biliares (HOFMANN, 1999). A bile é composta por ácidos biliares complexados com bilirrubina, lecitina e colesterol e incorporados em micelas de fosfolipídios (THOMAS; JOH; BENOIT, 1991), afetando a digestão e absorção de lipídios e vitaminas lipossolúveis (GONZÁLEZ-REGUEIRO et al., 2017).

A colestase ocorre quando o fluxo da bile do fígado para o intestino é obstruído, levando ao acúmulo de ácidos biliares tóxicos e outros produtos metabólicos no fígado. Isso resulta na diminuição dos ácidos biliares no intestino e níveis elevados na circulação sistêmica. Notavelmente, nos resultados desse trabalho, os níveis plasmáticos de GCA, GCDCA, GDCA, GLCA, TCA e TDCA

mostraram-se elevados em indivíduos colestáticos quando comparados ao grupo controle. A elevação dos níveis séricos de ácidos biliares livres induz a vasodilatação quando introduzidos no lúmen ileal, sendo os principais contribuintes para a hiperemia ileal por meio da liberação de hormônios gastrointestinais vasoativos e estimulação do receptor de ácidos biliares acoplado à proteína G. Esses processos podem contribuir para o desenvolvimento de hipertensão portal (DYSON et al., 2018; PABLO ARAB; BARRERA; ARRESE, 2017; THOMAS; JOH; BENOIT, 1991). A hipertensão portal é uma característica típica da CBP e da CEP. Nestes casos, a hipertensão portal pré-cirrótica pode ser induzida por cicatrizes biliares (DYSON et al., 2018). O aumento dos ácidos biliares pode estar associado à ativação das células estreladas hepáticas, que desempenham um papel crucial na produção de colágeno e na formação de cicatrizes hepáticas. O processo de cicatrização progressiva contribui para o desenvolvimento da hipertensão portal (ROCKEY, 2006). Embora a CEP e a CBP, em seus estágios iniciais, sejam consideradas doenças autoimunes, principalmente envolvendo células T desencadeando a liberação de citocinas pró-fibróticas como o fator de crescimento transformador- β . Os ácidos biliares desempenham um papel específico na hipertensão portal. Condições de estresse oxidativo e apoptose são desencadeadas em colangiócitos, células do trato biliar, expostas a concentrações muito mais altas de sais biliares do que outras células no corpo. Esses processos de inflamação, lesão hepática e fibrose desempenham um papel cíclico na patogênese. Nesse contexto, a colestase pode se tornar “auto-sustentável”, com o efeito tóxico do ambiente biliar, levando a um ciclo de lesão progressiva.

Os pacientes deste estudo receberam uma dose de 12-16 mg/kg/dia de ácido ursodesoxicólico (UDCA) para PFIC3, CBP e CEP. Em casos de doença hepática colestática, a administração de UDCA reduz a lesão dos hepatócitos causada pelo acúmulo de ácidos biliares e melhora a função hepática (ALT, AST e FA) retardando a progressão da doença (OVADIA et al., 2021). Em resumo, o UDCA possui múltiplos mecanismos de ação que o tornam eficaz no tratamento de distúrbios hepáticos colestáticos.

A análise estatística revelou perfis metabólicos distintos, pacientes com PFIC3 apresentaram níveis baixos de ácidos biliares no plasma e na urina quando comparados aos grupos CBP e CEP. Neste caso, os níveis de BAs podem auxiliar na discriminação entre PFIC3 e CBP/CEP que não possuem diagnóstico para DII. Monitorar os níveis séricos de ácidos biliares e considerar fatores além dos testes tradicionais de função hepática é aconselhável para uma avaliação abrangente da resposta ao tratamento (LINDOR et al., 2009).

Essas descobertas enfatizam a necessidade de reavaliar os critérios empregados para avaliar a resposta ao tratamento, indo além da dependência exclusiva de fosfatase alcalina (ALP), aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT). Também é recomendável frequentemente monitorar os níveis séricos de ácidos biliares nesses pacientes. Além disso, pesquisas sugerem que indivíduos diagnosticados com cirrose no momento do diagnóstico e com níveis elevados de gama-glutamil transferase (GGT) e ácidos graxos podem ter uma resposta menos favorável ao tratamento com UDCA. Em resumo, estudos clínicos relacionados ao tratamento da CBP com UDCA destacam a complexidade da avaliação da resposta ao tratamento e a identificação de fatores que podem influenciar essa resposta. (CORTEZ-PINTO et al., 2021; LI; APTE, 2015; PAUMGARTNER; BEUERS, 2002).

O tratamento da colestase extra-hepática ou obstrutiva (CEP) resulta no acúmulo de ácidos biliares potencialmente tóxicos no fígado devido a obstruções do sistema biliar, potencialmente levando à necrose hepatocelular, apoptose e, conseqüentemente, ao desenvolvimento de fibrose biliar e cirrose. O estudo conduzido por Fickert et al. (FICKERT et al., 2002) foi realizado em camundongos com ductos biliares ligados e em camundongos deficientes em flipase de fosfolípido canalicular (Mdr2^{-/-}), que se assemelham à CEP humana e à PFIC3/LPAC. Nesse caso, embora o UDCA estimule a expressão de transportadores hepatocelulares e possua propriedades anti-colestáticas, coleréticas, antiapoptóticas, antifibróticas e citoprotetoras, foi notado a ocorrência de infartos biliares (morte do tecido hepático devido à falta de suprimento sanguíneo) e necrose hepatocelular (FICKERT et al., 2002).

No nível celular, a colestase prolongada instiga a toxicidade mitocondrial, uma condição gerada por concentrações elevadas de ácidos biliares. Isso, por sua vez, desencadeia a disfunção mitocondrial, prejudicando a β -oxidação de ácidos graxos e contribuindo para a interrupção global dos processos metabólicos celulares (OLIVEIRA, 2018).

6.6 Alterações de Carnitinas e Ácidos Graxos nas Amostras de Plasma e Urina

A β -oxidação mitocondrial é um processo crucial no metabolismo energético das células. Esse processo é responsável pela oxidação da maioria dos ácidos graxos (AGs), que são divididos em ácidos graxos de cadeia curta e média (2-12 carbonos) e ácidos graxos de cadeia longa (12-20 carbonos). Na etapa inicial, os ácidos graxos de cadeia curta e média podem difundir livremente para

dentro das mitocôndrias. Em contraste, os ácidos graxos de cadeia longa necessitam da assistência da carnitina para seu transporte eficiente para dentro das mitocôndrias. Esse processo é essencial para garantir a continuidade e eficácia da β -oxidação, permitindo que os ácidos graxos sejam metabolizados adequadamente para a produção de energia.

Para ácidos graxos muito longos, com mais de 20 carbonos, a oxidação ocorre em um compartimento celular diferente, nos peroxissomos. Esse compartimento celular especializado contribui para a geração de energia por meio da produção de trifosfato de adenosina (ATP) via fosforilação oxidativa.

Na β -oxidação de ácidos graxos, enzimas específicas são essenciais para metabolizar ácidos graxos saturados como o palmitato (16:0) e o esteárico (18:0). Inicialmente, os ácidos graxos passam por ativação, ligando-se à coenzima A, formando acil-CoA, um processo que consome ATP, gerando AMP e dois íons fosfato (Pi). Os ácidos graxos de cadeia longa são então transportados para a matriz mitocondrial, auxiliados pela carnitina. O acil-CoA é transferido para a carnitina pela carnitina palmitoil transferase 1 (CPT 1), resultando em acilcarnitina, que atravessa a membrana mitocondrial. Na matriz, a acilcarnitina é reconvertida em acil-CoA pela carnitina palmitoil transferase 2 (CPT 2), aprisionando a molécula dentro das mitocôndrias. A disponibilidade de carnitina para esse transporte depende da CPT 2, conforme mostrado na FIGURA 6.11.

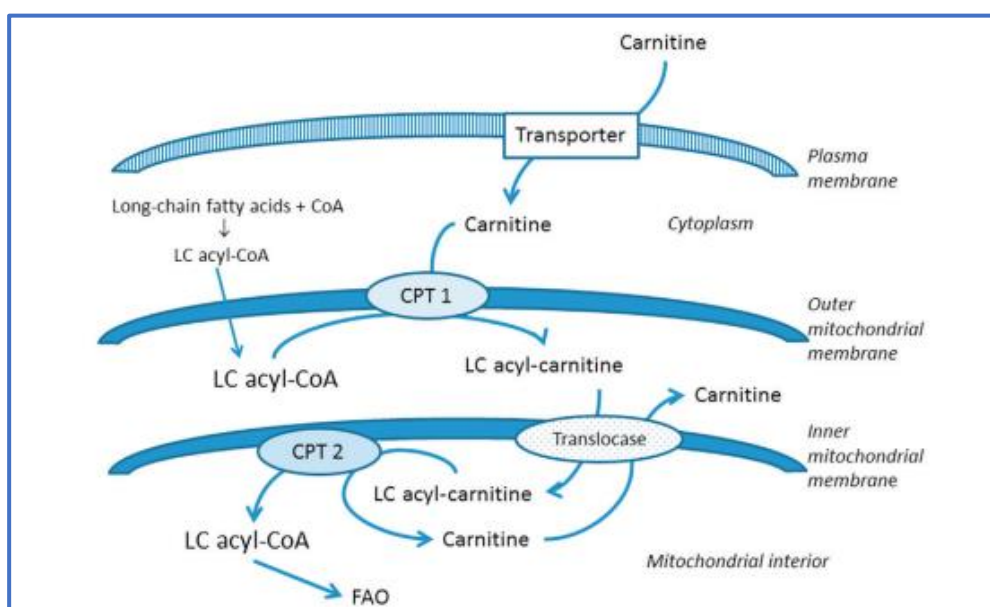


FIGURA 6.11 Representação esquemática do transporte de carnitina no processo de β -oxidação (JONES; BENNETT, 2017).

A sintetase de acil-CoA de cadeia longa, localizada nas membranas mitocondriais externas, membranas peroxissômicas e membrana do retículo

endoplasmático, demonstra atividade em relação a ácidos graxos variando de 12 a 20 carbonos (TALLEY; MOHIUDDIN, 2024). A regulação da β -oxidação também envolve o suprimento suficiente de oxigênio para a aceitação contínua de elétrons de transportadores como FADH₂ e NADH, garantindo um meio aceitador de elétrons. Os ácidos graxos aumentam a expressão de enzimas envolvidas na oxidação de ácidos graxos agindo como ligantes que interagem com os receptores ativados por proliferadores de peroxissomos (PPARs). Esses fatores de transcrição formam homodímeros/heterodímeros e migram para o núcleo, influenciando a expressão gênica relacionada às proteínas necessárias para a β -oxidação e biogênese mitocondrial (TALLEY; MOHIUDDIN, 2024).

Esse processo de β -oxidação é vital para as células, fornecendo uma fonte significativa de energia durante o metabolismo de ácidos graxos. Além disso, a regulação cuidadosa da β -oxidação é crucial para manter o equilíbrio energético celular e prevenir disfunções metabólicas. Uma compreensão aprofundada desse processo é fundamental para explorar suas implicações em condições fisiológicas e patológicas, como distúrbios hepáticos colestatos, onde a β -oxidação pode ser afetada, contribuindo para a progressão dessas condições (REDDY, 2001).

O defeito transitório no transporte de carnitina, embora raro, é uma condição tratável. Para recém-nascidos que apresentam icterícia colestatos inexplicada, ganho de peso inadequado ou anemia profunda, testes de triagem neonatal, especialmente para essa condição específica, devem ser realizados. A detecção precoce e a intervenção podem contribuir significativamente para o bem-estar e a recuperação de bebês diagnosticados, como demonstrado pela gestão bem-sucedida do defeito transitório no transporte de carnitina mencionado na literatura (CHO et al., 2012).

A elevação observada nos níveis de carnitina no plasma nos grupos CBP e PFIC3, em comparação com o grupo CS, juntamente com o aumento notável de acetilcarnitina e propionilcarnitina, especificamente no grupo CBP, em contraste com os grupos PFIC3 e CEP, sugere uma perturbação potencial na β -oxidação ligada à colestase. Os grupos CBP e CEP exibem modificações nos perfis de acilcarnitinas de cadeia média e longa, incluindo 5-hidroxidec-3-enoilcarnitina (C10), 10-hidroxidodecanoilcarnitina (C12) e 9-hexadecenoilcarnitina (C16). Além disso, para CEP e PFIC3, há um aumento nos níveis de acilcarnitina de cadeia longa, como tridec-6-enodionilcarnitina (C13). Também foram identificadas alterações específicas, como o aumento dos níveis de *O*-adipoilcarnitina (C6) no grupo CEP em comparação com o grupo CS, e um aumento nos níveis urinários de carnitina 2,6-dimetilheptanoil (C7) no grupo

PFIC3 em comparação com os grupos CBP, CEP e CS. Esses resultados destacam a complexidade dessas alterações metabólicas das acilcarnitinas.

As amostras de urina, por outro lado, apresentaram uma redução nos níveis de 3-hidroxideca-6,8-dienoilcarnitina (C10) e 4-octenoilcarnitina (C8) nos grupos de colestase em comparação com o grupo controle ($p \leq 0,05$).

De acordo com Jones e Bennett (2017) a CPT1, localizada na membrana mitocondrial externa, converte espécies de acil-CoA de cadeia longa em acilcarnitinas de cadeia longa. Esta enzima possui a isoforma CPT1A, expressa no fígado e nos rins. A deficiência dessa isoforma resulta na incapacidade da enzima de transferir ácidos graxos de cadeia longa de suas espécies de CoA para acilcarnitinas, levando ao aumento nos níveis de carnitina livre e a baixos níveis de acilcarnitinas de cadeia longa. Essas alterações podem causar distúrbios na oxidação de ácidos graxos, doenças gastrointestinais, acidose tubular renal e doença hepática. No entanto, o diagnóstico geralmente requer testes genéticos, os quais podem ser desafiadores devido à falta de uma mutação predominante (JONES; BENNETT, 2017).

A análise estatística das amostras de plasma demonstrou uma diferenciação significativa entre os três grupos de colestase, com o grupo CBP exibindo a distinção mais pronunciada. Esse perfil discriminante destaca a importância da avaliação metabólica para compreender as alterações relacionadas à colestase. Considerando o ácido 2-octenedioico, seus derivados podem passar por processos de conjugação no fígado, como a conjugação com glicina ou taurina, formando metabólitos solúveis em água. Esses metabólitos conjugados geralmente são mais facilmente excretados pelos rins, enfatizando a importância dos processos de conjugação e excreção no equilíbrio metabólico. Essas descobertas sugerem uma possível associação entre disfunção na β -oxidação, alterações nos níveis de carnitina e o metabolismo do ácido 2-octenedioico em indivíduos com colestase e oferece valiosas perspectivas para investigações futuras sobre o impacto dessas alterações metabólicas em condições hepáticas colestáticas.

Outros resultados sugerem uma correlação positiva entre LPC (16:0) e LPC (18:1) com algumas acilcarnitinas como a dodecenoilcarnitina (C12:1-DCAR) - ($r = 0,79$ e $0,77$, $p < 0,01$, respectivamente), assim como com hexa-2,4-dienodioilcarnitina (hexa-2,4-DCAR) - ($r = 0,57$ e $0,75$; $p < 0,01$, respectivamente) e nona-2,4,6-trienodioilcarnitina (nona-2,4,6-DCAR) - ($r = 0,62$ e $0,70$; $p < 0,01$, respectivamente), conforme mostrado na FIGURA 6.4. Essas descobertas sugerem uma associação entre carnitinas e LPCs. Essa correlação

positiva entre LPCs e carnitinas já foi relatada anteriormente por Klouwer et al. (2017).

7 Conclusões e Limitações do Capítulo II

O emprego da análise metabolômica *untargeted* na análise de amostras clínicas de indivíduos diagnosticados com diferentes tipos de colestase (CBP, CEP e PFIC3), possibilitou uma cobertura abrangente de metabólitos com diferentes polaridades, decorrentes da cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-HRMS) nos modos de ionização positivo e negativo, associados aos modos de separação ortogonais RPLC e HILIC.

No geral, foi possível identificar um perfil metabólico distinto ao comparar indivíduos de cada subtipo de colestase com o grupo controle. Observamos consistentemente níveis elevados de ácidos biliares, aminoácidos e ácidos graxos no plasma e na urina, bem como concentrações alteradas de acilcarnitinas, sugerindo uma tendência de aumento no plasma e uma diminuição na urina.

Quanto à diferenciação entre os três tipos de colestase, enfrentamos desafios significativos nas correlações devido à similaridade das patologias. Notavelmente, pacientes com PFIC3 demonstraram níveis menos elevados de ácidos biliares em comparação com os grupos CEP e CBP, o que pode ser uma informação valiosa para distinguir pacientes com PFIC3 daqueles com CEP, que não apresentam doença inflamatória intestinal associada, bem como pacientes com CBP.

A PFIC3 está associada à diminuição dos níveis de fosfolipídios na bile devido a mutações no gene *ABCB4*, que codifica a proteína MDR3 responsável pela secreção de fosfolipídios para a formação das micelas da bile. No entanto, nesse trabalho, não observamos alterações significativas nos fosfolipídios nas amostras dos indivíduos diagnosticados com PFIC3. Esse resultado pode ser decorrente da administração de UDCA.

Para o grupo CBP, observamos níveis diminuídos de lisofosfolipídios no plasma e do ácido graxo diacilglicerol, além de níveis reduzidos de citraconato e itaconato, metabólitos relacionados ao ciclo do TCA, que podem ajudar a diferenciar o CBP das outras doenças colestáticas.

No caso do grupo CEP, encontramos níveis elevados de bilirrubina, indicativa de disfunção hepática e das vias biliares. Além disso, observamos níveis diminuídos de *p*-cresol sulfato, relacionado a toxinas urêmicas, e níveis elevados de tirosina, sugerindo uma desregulação em metabólitos tóxicos

urêmicos. O hipurato, associado à função renal e hepática, foi encontrado em níveis reduzidos no plasma e na urina.

8 Referências Bibliográficas

ACHUFUSI, T. G. O.; SAFADI, A. O.; MAHABADI, N. Ursodeoxycholic Acid. Em: **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023.

ALARCON-BARRERA, J. C.; KOSTIDIS, S.; ONDO-MENDEZ, A.; GIERA, M. Recent advances in metabolomics analysis for early drug development. **Drug Discovery Today**, v. 27, n. 6, p. 1763–1773, 2022.

ALASMARI, B. G.; RAYEES, S.; ALOMARI, M.; ELZUBAIR, L.; HAMID, Y. Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis Type 3 Homozygous Pathogenic Variant c.2906G>A in the ATP Binding Cassette Subfamily B Member 4 (ABCB4) Gene: A Case Report of an Unusual Presentation. **Cureus**, v. 14, n. 12, p. e32455, 2023.

GONZÁLEZ-REGUEIRO, J. A.; MORENO-CASTAÑEDA, L.; URIBE, M.; CARLOS CHÁVEZ-TAPIA, N. The Role of Bile Acids in Glucose Metabolism and Their Relation with Diabetes. **Annals of Hepatology**, v. 16, p. S15–S20, 2017.

ALI, A. H.; CAREY, E. J.; LINDOR, K. D. An overview of current and future therapeutic strategies for the treatment of primary sclerosing cholangitis. **Expert Opinion on Orphan Drugs**, v. 2, n. 6, p. 545–556, 2014.

ALJOHANI, A. J.; MUNGUBA, G. C.; GUERRA, Y.; LEE, R. K.; BHATTACHARYA, S. K. Sphingolipids and ceramides in human aqueous humor. **Molecular Vision**, v. 19, p. 1966–1984, 2013.

ALLEN, D. R.; MCWHINNEY, B. C. Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry: A Paradigm Shift in Toxicology Screening Applications. **The Clinical Biochemist Reviews**, v. 40, n. 3, p. 135–146, 2019.

ALTAMIRANO-BARRERA, A.; URIBE, M.; LAMMERT, F.; MÉNDEZ-SÁNCHEZ, N. Bile acids and the Risk for Hepatocellular Carcinoma in Primary Biliary Cholangitis. **Annals of Hepatology**, v. 15, n. 3, p. 453–454, 2016.

ALVARO, D.; MANCINO, M. G.; ONORI, P.; FRANCHITTO, A.; ALPINI, G.; FRANCIS, H.; GLASER, S.; GAUDIO, E. Estrogens and the pathophysiology of the biliary tree. **World Journal of Gastroenterology : WJG**, v. 12, n. 22, p. 3537–3545, 2006.

AMIRNENI, S.; HAEP, N.; GAD, M. A.; SOTO-GUTIERREZ, A.; SQUIRES, J. E.; FLORENTINO, R. M. Molecular overview of progressive familial intrahepatic cholestasis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 26, n. 47, p. 7470–7484, 2020.

PORTINCASA, P.; MOSCHETTA, A.; PALASCIANO, G. From lipid secretion to cholesterol crystallization in bile. Relevance in cholesterol gallstone disease. v. 1, n. 3, p. 121–128, 2002.

ARMITAGE, E. G.; BARBAS, C. Metabolomics in cancer biomarker discovery: Current trends and future perspectives. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Review Papers on Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2013. v. 87, Review Papers on Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2013, p. 1–11, 2014.

ARTATI, A.; PREHN, C.; ADAMSKI, J. LC-MS/MS-Based Metabolomics for Cell Cultures. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 1994, p. 119–130, 2019.

AZEVEDO, A. M.; ANDRADE JÚNIOR, V. C.; FERNANDES, J. S. Transformação Box-Cox na homocedasticidade e normalidade uni e multivariada em experimentos de batata-doce. **Horticultura Brasileira**, v. 34, p. 93–101, 2016.

BAR, N. et al. A reference map of potential determinants for the human serum metabolome. **Nature**, v. 588, n. 7836, p. 135–140, 2020.

BARKAL, L. J.; THEBERGE, A. B.; GUO, C.-J.; SPRAKER, J.; RAPPERT, L.; BERTHIER, J.; BRAKKE, K. A.; WANG, C. C. C.; BEEBE, D. J.; KELLER, N. P.; BERTHIER, E. Microbial metabolomics in open microscale platforms. **Nature Communications**, v. 7, n. 1, p. 10610, 2016.

BARR, D. B.; WILDER, L. C.; CAUDILL, S. P.; GONZALEZ, A. J.; NEEDHAM, L. L.; PIRKLE, J. L. Urinary Creatinine Concentrations in the U.S. Population: Implications for Urinary Biologic Monitoring Measurements. **Environmental Health Perspectives**, v. 113, n. 2, p. 192–200, 2005.

BATURYNSKA, I.; MARTINSEN, K. Prediction of geometry deviations in additive manufactured parts: comparison of linear regression with machine learning algorithms. **Journal of Intelligent Manufacturing**, v. 32, 2021.

BEGER, R. D. A Review of Applications of Metabolomics in Cancer. **Metabolites**, v. 3, n. 3, p. 552–574, 2013.

BELL, L. N.; WULFF, J.; COMERFORD, M.; VUPPALANCHI, R.; CHALASANI, N. Serum metabolic signatures of primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis. **Liver International: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver**, v. 35, n. 1, p. 263–274, 2015.

BENEDETTI, E.; LIU, E. M.; TANG, C.; KUO, F.; BUYUKOZKAN, M.; PARK, T.; PARK, J.; CORREA, F.; HAKIMI, A. A.; INTLEKOFER, A. M.; KRUMSIEK, J.; REZNIK, E. A multimodal atlas of tumour metabolism reveals the architecture of gene–metabolite covariation. **Nature Metabolism**, v. 5, n. 6, p. 1029–1044, 2023.

BERK, P. D.; JAVITT, N. B. Hyperbilirubinemia and cholestasis. **The American Journal of Medicine**, v. 64, n. 2, p. 311–326, 1978.

BEUERS, U.; KREMER, A. E.; BOLIER, R.; ELFERINK, R. P. J. O. Pruritus in cholestasis: facts and fiction. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 60, n. 1, p. 399–407, 2014.

BEUERS, U.; WOLTERS, F.; OUDE ELFERINK, R. P. J. Mechanisms of pruritus in cholestasis: understanding and treating the itch. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 20, n. 1, p. 26–36, 2023.

BEYOĞLU, D.; IDLE, J. R. Metabolomic and Lipidomic Biomarkers for Premalignant Liver Disease Diagnosis and Therapy. **Metabolites**, v. 10, n. 2, p. 50, 2020.

BITTENCOURT, P. L.; COUTO, C. A. MANUAL DE CONDUTAS EM DOENÇAS COLESTÁTICAS E AUTOIMUNES DO FÍGADO. [s.d.].

BLANE, G. F. Comparative toxicity and safety profile of fenofibrate and other fibric acid derivatives. **The American Journal of Medicine**, v. 83, n. 5B, p. 26–36, 1987.

BLATKIEWICZ, M.; SIELATYCKA, K.; PIOTROWSKA, K.; KILAŃCZYK, E. DHEA and Its Metabolites Reduce the Cytokines Involved in the Inflammatory Response and Fibrosis in Primary Biliary Cholangitis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 6, p. 5301, 2023.

BLUM, L.; ELGENDI, M.; MENON, C. Impact of Box-Cox Transformation on Machine-Learning Algorithms. **Frontiers in Artificial Intelligence**, v. 5, 2022. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/frai.2022.877569>>. Acesso em: 24 jan. 2024.

BOUGNÈRES, P. F.; SAUDUBRAY, J. M.; MARSAC, C.; BERNARD, O.; ODIÈVRE, M.; GIRARD, J. Fasting hypoglycemia resulting from hepatic carnitine palmitoyl transferase deficiency. **The Journal of Pediatrics**, v. 98, n. 5, p. 742–746, 1981.

BOWLUS, C. L.; ARRIVÉ, L.; BERGQUIST, A.; DENEAU, M.; FORMAN, L.; ILYAS, S. I.; LUNSFORD, K. E.; MARTINEZ, M.; SAPISOCHIN, G.;

SHROFF, R.; TABIBIAN, J. H.; ASSIS, D. N. AASLD practice guidance on primary sclerosing cholangitis and cholangiocarcinoma. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 77, n. 2, p. 659–702, 2023.

BOWLUS, C. L.; GERSHWIN, M. E. The diagnosis of primary biliary cirrhosis. **Autoimmunity Reviews**, v. 13, n. 4–5, p. 441–444, 2014.

BOYER, J. L. Bile formation and secretion. **Comprehensive Physiology**, v. 3, n. 3, p. 1035–1078, 2013.

BROADHURST, D.; GOODACRE, R.; REINKE, S. N.; KULIGOWSKI, J.; WILSON, I. D.; LEWIS, M. R.; DUNN, W. B. Guidelines and considerations for the use of system suitability and quality control samples in mass spectrometry assays applied in untargeted clinical metabolomic studies. **Metabolomics**, v. 14, n. 6, p. 72, 2018.

BRUCE, S. J.; TAVAZZI, I.; PARISOD, V.; REZZI, S.; KOCHHAR, S.; GUY, P. A. Investigation of human blood plasma sample preparation for performing metabolomics using ultrahigh performance liquid chromatography/mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 9, p. 3285–3296, 2009.

BUNDY, J. G.; DAVEY, M. P.; VIANT, M. R. Environmental metabolomics: a critical review and future perspectives. **Metabolomics**, v. 5, n. 1, p. 3–21, 2009.

BURGESS, K.; RANKIN, N.; WEIDT, S. Chapter 10 - Metabolomics. Em: PADMANABHAN, S. (Ed.). **Handbook of Pharmacogenomics and Stratified Medicine**. San Diego: Academic Press, 2014. p. 181–205.

BUSZEWSKI, B.; NOGA, S. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)—a powerful separation technique. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 402, n. 1, p. 231–247, 2012.

CANUTO, G. A. B.; COSTA, J. L. Da; CRUZ, P. L. R. Da; SOUZA, A. R. L. De; FACCIO, A. T.; KLASSEN, A.; RODRIGUES, K. T.; TAVARES, M. F. M. METABOLÔMICA: DEFINIÇÕES, ESTADO-DA-ARTE E APLICAÇÕES REPRESENTATIVAS. **Química Nova**, v. 41, p. 75–91, 2018.

CASS, Q. Q. **Cromatografia Líquida - Novas Tendências e Aplicações**. 1ª edição ed. GEN LTC, 2015.

CAVAZZINI, A.; FELINGER, A. Chapter 5 - Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography. Em: FANALI, S.; HADDAD, P. R.; POOLE, C. F.; SCHOENMAKERS, P.; LLOYD, D. (Eds.). **Liquid Chromatography**. Amsterdam: Elsevier, 2013. p. 105–119.

CHAPMAN, R.; FEVERY, J.; KALLOO, A.; NAGORNEY, D. M.; BOBERG, K. M.; SHNEIDER, B.; GORES, G. J. Diagnosis and management of primary sclerosing cholangitis. **Hepatology**, v. 51, n. 2, p. 660–678, 2010.

CHAPMAN, R. W.; ARBORGH, B. A.; RHODES, J. M.; SUMMERFIELD, J. A.; DICK, R.; SCHEUER, P. J.; SHERLOCK, S. Primary sclerosing cholangitis: a review of its clinical features, cholangiography, and hepatic histology. **Gut**, v. 21, n. 10, p. 870–877, 1980.

CHEN, Y.; WANG, Z.-L.; YEO, M.; ZHANG, Q.-J.; LÓPEZ-ROMERO, A. E.; DING, H.-P.; ZHANG, X.; ZENG, Q.; MORALES-LÁZARO, S. L.; MOORE, C.; JIN, Y.-A.; YANG, H.-H.; MORSTEIN, J.; BORTSOV, A.; KRAWCZYK, M.; LAMMERT, F.; ABDELMALEK, M.; DIEHL, A. M.; MILKIEWICZ, P.; KREMER, A. E.; ZHANG, J. Y.; NACKLEY, A.; REEVES, T. E.; KO, M.-C.; JI, R.-R.; ROSENBAUM, T.; LIEDTKE, W. Epithelia-Sensory Neuron Cross Talk Underlies Cholestatic Itch Induced by Lysophosphatidylcholine. **Gastroenterology**, v. 161, n. 1, p. 301- 317.e16, 2021.

CHO, H.-S.; CHOO, Y. K.; LEE, H. J.; LEE, H.-S. Transient carnitine transport defect with cholestatic jaundice: report of one case in a premature baby. **Korean Journal of Pediatrics**, v. 55, n. 2, p. 58–62, 2012.

CHOI, S.-N.; ULLAH, H. M. A.; HONG, I.-H.; PARK, J.-K.; PARK, S.; CHUNG, M.-J.; SON, J.-Y.; YUN, H.-H.; YIM, J.-H.; JUNG, S.-J.; CHUNG, H.-Y.; JEONG, K.-S. Hepatic Protective Effects of S-Allyl-L-Cysteine (SAC) in Rats with Carbon Tetrachloride (CCl₄) Induced Liver Injury. **Food and Nutrition Sciences**, v. 11, n. 12, p. 1053–1069, 2020.

COLBURN, W. A. Biomarkers in drug discovery and development: from target identification through drug marketing. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 43, n. 4, p. 329–341, 2003.

COMBES, B.; CARITHERS JR., R. L.; MADDREY, W. C.; MUNOZ, S.; GARCIA-TSAO, G.; BONNER, G. F.; BOYER, J. L.; LUKETIC, V. A.; SHIFFMAN, M. L.; PETERS, M. G.; WHITE, H.; ZETTERMAN, R. K.; RISSER, R.; ROSSI, S. S.; HOFMANN, A. F. Biliary bile acids in primary biliary cirrhosis: Effect of ursodeoxycholic acid. **Hepatology**, v. 29, n. 6, p. 1649–1654, 1999.

CONTREPOIS, K.; JIANG, L.; SNYDER, M. Optimized Analytical Procedures for the Untargeted Metabolomic Profiling of Human Urine and Plasma by Combining Hydrophilic Interaction (HILIC) and Reverse-Phase Liquid Chromatography (RPLC)-Mass Spectrometry. **Molecular & cellular proteomics: MCP**, v. 14, n. 6, p. 1684–1695, 2015.

CONTRERAS-OMAHNA, R.; VELARDE-RUIZ VELASCO, J. A.; CASTRO-NARRO, G. E.; TRUJILLO- BENAVIDES, O.; ZAMARRIPA-DORSEY, F.; REYES-DORANTES, A. A.; MUÑOZ-ESPINOSA, L.; AIZA-HADDAD, I.; CASTILLO-BARRADAS, M.; CERDA-REYES, E.; CISNEROS-GARZA, L. E.; FLORES-CALDERÓN, J.; GARCÍA-JIMÉNEZ, E. S.; HIGUERA-DE-LA-TIJERA, M. F.; LIRA-PEDRÍN, M. A.; MARQUEZ-GUILLÉN, E.; MOCTEZUMA-VELÁZQUEZ, C.; MORENO-ALCÁNTAR, R.; NOYOLA-CEDILLO, S. G.; PÉREZ-HERNÁNDEZ, J. L.; RAMOS-GÓMEZ, M. V.; REMES-TROCHE, J. M.; RIZO-ROBLES, M. T.; RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, H. Approach to the patient with cholestasis and jaundice syndrome. Joint AMH, AMG, and AMEG scientific position statement. **Revista de Gastroenterología de México**, v. 87, n. 1, p. 80–88, 2022.

CORRIGAN, M.; HIRSCHFIELD, G. M. Aspects of the Pathophysiology of Primary Biliary Cirrhosis. **Digestive Diseases**, v. 33, n. Suppl. 2, p. 102–108, 2015.

CORTEZ-PINTO, H.; LIBERAL, R.; LOPES, S.; MACHADO, M. V.; CARVALHO, J.; DIAS, T.; SANTOS, A.; AGOSTINHO, C.; FIGUEIREDO, P.; LOUREIRO, R.; MARTINS, A.; ALEXANDRINO, G.; COTRIM, I.; LEAL, C.; PRESA, J.; MESQUITA, M.; NUNES, J.; GOUVEIA, C.; VALE, A. H. E.; ALVES, A. L.; COELHO, M.; MAIA, L.; PEDROTO, I.; BANHUDO, A.; PINTO, J. S.; GOMES, M. V.; OLIVEIRA, J.; ANDREOZZI, V.; CALINAS, F. Predictors for incomplete response to ursodeoxycholic acid in primary biliary cholangitis. Data from a national registry of liver disease. **United European Gastroenterology Journal**, v. 9, n. 6, p. 699–706, 2021.

CRUICKSHANK-QUINN, C.; QUINN, K. D.; POWELL, R.; YANG, Y.; ARMSTRONG, M.; MAHAFFEY, S.; REISDORPH, R.; REISDORPH, N. Multi-step Preparation Technique to Recover Multiple Metabolite Compound Classes for In-depth and Informative Metabolomic Analysis. **Journal of Visualized Experiments: JoVE**, n. 89, p. 51670, 2014.

ČUPERLOVIĆ-CULF, M.; BARNETT, D. A.; CULF, A. S.; CHUTE, I. Cell culture metabolomics: applications and future directions. **Drug Discovery Today**, v. 15, n. 15, p. 610–621, 2010.

DAHABIYEH, L. A.; NIMER, R. M.; RASHED, M.; WELLS, J. D.; FIEHN, O. Serum-Based Lipid Panels for Diagnosis of Idiopathic Parkinson's Disease. **Metabolites**, v. 13, n. 9, p. 990, 2023.

DE VINCENTIS, A.; D'AMATO, D.; CRISTOFERI, L.; GERUSSI, A.; MALINVERNO, F.; LLEO, A.; COLAPIETRO, F.; MARRA, F.; GALLI, A.; FIORINI, C.; COCO, B.; BRUNETTO, M.; NIRO, G. A.; COTUGNO, R.; SAITTA, C.; COZZOLONGO, R.; LOSITO, F.; GIANNINI, E. G.; LABANCA,

S.; MARZIONI, M.; MARCONI, G.; MORGANDO, A.; PELLICANO, R.; VANNI, E.; CAZZAGON, N.; FLOREANI, A.; CHESSA, L.; MORELLI, O.; MURATORI, L.; PELLICELLI, A.; POMPILI, M.; PONZIANI, F.; TORTORA, A.; ROSINA, F.; RUSSELLO, M.; CANNAVÒ, M.; SIMONE, L.; STORATO, S.; VIGANÒ, M.; ABENAVOLI, L.; D'ANTÒ, M.; DE GASPERI, E.; DISTEFANO, M.; SCIFO, G.; ZOLFINO, T.; CALVARUSO, V.; CUCCORESE, G.; PACE PALITTI, V.; SACCO, R.; BERTINO, G.; FRAZZETTO, E.; ALVARO, D.; MULINACCI, G.; PALERMO, A.; SCARAVAGLIO, M.; TERRACCIANI, F.; GALATI, G.; RONCA, V.; ZUIN, M.; CLAAR, E.; IZZI, A.; PICARDI, A.; INVERNIZZI, P.; VESPASIANI-GENTILUCCI, U.; CARBONE, M.. Real-world experience with obeticholic acid in patients with primary biliary cholangitis. **JHEP reports: innovation in hepatology**, v. 3, n. 2, p. 100248, 2021.

DAVIT-SPRAUL, A.; GONZALES, E.; BAUSSAN, C.; JACQUEMIN, E. Progressive familial intrahepatic cholestasis. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 4, n. 1, p. 1, 2009.

DAWSON, P. A.; KARPEN, S. J. Intestinal transport and metabolism of bile acids. **Journal of Lipid Research**, v. 56, n. 6, p. 1085–1099, 2015.

DEGRASSI, I.; LEONARDI, I.; DI PROFIO, E.; MONTANARI, C.; ZUCCOTTI, G.; VERDUCI, E. Fat-Soluble Vitamins Deficiency in Pediatric Cholestasis: A Scoping Review. **Nutrients**, v. 15, n. 11, p. 2491, 2023.

DI CIAULA, A.; GARRUTI, G.; LUNARDI BACCETTO, R.; MOLINA-MOLINA, E.; BONFRATE, L.; WANG, D. Q.-H.; PORTINCASA, P. Bile Acid Physiology. **Annals of Hepatology**, v. 16, n. Suppl. 1: s3-105., p. s4–s14, 2017.

DI GUIDA, R.; ENGEL, J.; ALLWOOD, J. W.; WEBER, R. J. M.; JONES, M. R.; SOMMER, U.; VIANI, M. R.; DUNN, W. B. Non-targeted UHPLC-MS metabolomic data processing methods: a comparative investigation of normalisation, missing value imputation, transformation and scaling. **Metabolomics: Official Journal of the Metabolomic Society**, v. 12, p. 93, 2016.

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. **Analytical Chemistry**, v. 78, n. 13, p. 4281–4290, 2006.

DUNN, W. B.; BROADHURST, D.; BEGLEY, P.; ZELENA, E.; FRANCIS-MCINTYRE, S.; ANDERSON, N.; BROWN, M.; KNOWLES, J. D.; HALSALL, A.; HASELDEN, J. N.; NICHOLLS, A. W.; WILSON, I. D.; KELL, D. B.; GOODACRE, R. Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry. **Nature Protocols**, v. 6, n. 7, p. 1060–1083, 2011.

DUNN, W. B.; WILSON, I. D.; NICHOLLS, A. W.; BROADHURST, D. The importance of experimental design and QC samples in large-scale and MS-driven untargeted metabolomic studies of humans. **Bioanalysis**, v. 4, n. 18, p. 2249–2264, 2012.

DYSON, J. K.; BEUERS, U.; JONES, D. E. J.; LOHSE, A. W.; HUDSON, M. Primary sclerosing cholangitis. **The Lancet**, v. 391, n. 10139, p. 2547–2559, 2018.

EMWAS, A.-H.; SACCENTI, E.; GAO, X.; MCKAY, R. T.; DOS SANTOS, V. A. P. M.; ROY, R.; WISHART, D. S. Recommended strategies for spectral processing and post-processing of 1D 1H-NMR data of biofluids with a particular focus on urine. **Metabolomics**, v. 14, n. 3, p. 31, 2018.

ENOOKU, K.; NAKAGAWA, H.; FUJIWARA, N.; KONDO, M.; MINAMI, T.; HOSHIDA, Y.; SHIBAHARA, J.; TATEISHI, R.; KOIKE, K. Altered serum acylcarnitine profile is associated with the status of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and NAFLD-related hepatocellular carcinoma. **Scientific Reports**, v. 9, p. 10663, 2019.

ERIKSSON, L.; ANTTI, H.; GOTTFRIES, J.; HOLMES, E.; JOHANSSON, E.; LINDGREN, F.; LONG, I.; LUNDSTEDT, T.; TRYGG, J.; WOLD, S. Using chemometrics for navigating in the large data sets of genomics, proteomics, and metabolomics (gpm). **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 380, n. 3, p. 419–429, 2004.

EASL. EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF THE LIVER. Clinical Practice Guidelines: Management of cholestatic liver diseases. **Journal of Hepatology**, v. 51, n. 2, p. 237–267, 2009.

FAN, S.; KIND, T.; CAJKA, T.; HAZEN, S. L.; TANG, W. H. W.; KADDURAH-DAOUK, R.; IRVIN, M. R.; ARNETT, D. K.; BARUPAL, D. K.; FIEHN, O. Systematic Error Removal Using Random Forest for Normalizing Large-Scale Untargeted Lipidomics Data. **Analytical chemistry**, v. 91, n. 5, p. 3590–3596, 2019.

FENN, J. B.; MANN, M.; MENG, C. K.; WONG, S. F.; WHITEHOUSE, C. M. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. **Science (New York, N.Y.)**, v. 246, n. 4926, p. 64–71, 1989.

FICKERT, P.; ZOLLNER, G.; FUCHSBICHLER, A.; STUMPTNER, C.; WEIGLEIN, A. H.; LAMMERT, F.; MARSCHALL, H.-U.; TSYBROVSKYY, O.; ZATLOUKAL, K.; DENK, H.; TRAUNER, M. Ursodeoxycholic acid aggravates bile infarcts in bile duct-ligated and Mdr2 knockout mice via disruption of cholangioles. **Gastroenterology**, v. 123, n. 4, p. 1238–1251, 2002.

FIEHN, O. Metabolomics by Gas Chromatography-Mass Spectrometry: the combination of targeted and untargeted profiling. **Current protocols in molecular biology** / edited by Frederick M. Ausubel ... [et al.], v. 114, p. 30.4.1, 2016.

FIORUCCI, S.; DI GIORGIO, C.; DISTRUTTI, E. Obeticholic Acid: An Update of Its Pharmacological Activities in Liver Disorders. Em: FIORUCCI, S.; DISTRUTTI, E. (Eds.). **Bile Acids and Their Receptors**. Handbook of Experimental Pharmacology Cham: Springer International Publishing, 2019. p. 283–295.

FLOREANI, A.; FRANCESCHET, I.; CAZZAGON, N.; SPINAZZÈ, A.; BUJA, A.; FURLAN, P.; BALDO, V.; GERSHWIN, M. E. Extrahepatic autoimmune conditions associated with primary biliary cirrhosis. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, v. 48, n. 2–3, p. 192–197, 2015.

GAGNEBIN, Y.; TONOLI, D.; LESCUYER, P.; PONTE, B.; DE SEIGNEUX, S.; MARTIN, P.-Y.; SCHAPPLER, J.; BOCCARD, J.; RUDAZ, S. Metabolomic analysis of urine samples by UHPLC-QTOF-MS: Impact of normalization strategies. **Analytica Chimica Acta**, v. 955, p. 27–35, 2017.

GALOOSIAN, A.; HANLON, C.; ZHANG, J.; HOLT, E. W.; YIMAM, K. K. Clinical Updates in Primary Biliary Cholangitis: Trends, Epidemiology, Diagnostics, and New Therapeutic Approaches. **Journal of Clinical and Translational Hepatology**, v. 8, n. 1, p. 49–60, 2020.

GAUGLITZ, J. M. et al. Enhancing untargeted metabolomics using metadata-based source annotation. **Nature Biotechnology**, v. 40, n. 12, p. 1774–1779, 2022.

GENTILUOMO, L.; SCHNEIDER, V.; ROESSNER, D.; FRIESS, W. Coupling Multi-Angle Light Scattering to Reverse-Phase Ultra-High-Pressure Chromatography (RP-UPLC-MALS) for the characterization monoclonal antibodies. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 14965, 2019.

GHONEM, N. S.; ASSIS, D. N.; BOYER, J. L. On Fibrates and Cholestasis: A review. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 62, n. 2, p. 635–643, 2015.

GLISH, G. L.; VACHET, R. W. The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 2, p. 140–150, 2003.

GONG, Z.; YE, H.; HUO, Y.; WANG, L.; HUANG, Y.; HUANG, M.; YUAN, X. S-allyl-cysteine attenuates carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats by targeting STAT3/SMAD3 pathway. **American Journal of Translational Research**, v. 10, n. 5, p. 1337–1346, 2018.

GOWDA, H.; IVANISEVIC, J.; JOHNSON, C. H.; KURCZY, M. E.; BENTON, H. P.; RINEHART, D.; NGUYEN, T.; RAY, J.; KUEHL, J.; AREVALO, B.; WESTENSKOW, P. D.; WANG, J.; ARKIN, A. P.; DEUTSCHBAUER, A. M.; PATTI, G. J.; SIUZDAK, G. Interactive XCMS Online: Simplifying Advanced Metabolomic Data Processing and Subsequent Statistical Analyses. **Analytical Chemistry**, v. 86, n. 14, p. 6931–6939, 2014.

GRANITO, A.; MURATORI, P.; QUARNETI, C.; PAPPAS, G.; CICOLA, R.; MURATORI, L. Antinuclear antibodies as ancillary markers in primary biliary cirrhosis. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 12, n. 1, p. 65–74, 2012.

GRANT, A. J.; LALOR, P. F.; SALMI, M.; JALKANEN, S.; ADAMS, D. H. Homing of mucosal lymphocytes to the liver in the pathogenesis of hepatic complications of inflammatory bowel disease. **Lancet (London, England)**, v. 359, n. 9301, p. 150–157, 2002.

GREEN, C. D.; MACEYKA, M.; COWART, L. A.; SPIEGEL, S. Sphingolipids in metabolic disease: The good, the bad, and the unknown. **Cell Metabolism**, v. 33, n. 7, p. 1293–1306, 2021.

GULAMHUSEIN, A. F.; HIRSCHFIELD, G. M. Primary biliary cholangitis: pathogenesis and therapeutic opportunities. **Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology**, v. 17, n. 2, p. 93–110, 2020.

HAO, J.; YANG, T.; ZHOU, Y.; GAO, G.-Y.; XING, F.; PENG, Y.; TAO, Y.-Y.; LIU, C.-H. Serum Metabolomics Analysis Reveals a Distinct Metabolic Profile of Patients with Primary Biliary Cholangitis. **Scientific Reports**, v. 7, p. 784, 2017.

HARVEY, D. J. Collision-induced fragmentation of underivatized N-linked carbohydrates ionized by electrospray. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 35, n. 10, p. 1178–1190, 2000.

HAUTON, J. C. Bile Phospholipids : Origin and Function. Em: TAYLOR, W. (Ed.). **The Hepatobiliary System: Fundamental and Pathological Mechanisms**. NATO Advanced Study Institutes Series Boston, MA: Springer US, 1976. p. 529–553.

HAYS, S. M.; AYLWARD, L. L.; BLOUNT, B. C. Variation in urinary flow rates according to demographic characteristics and body mass index in NHANES: potential confounding of associations between health outcomes and urinary biomarker concentrations. **Environmental Health Perspectives**, v. 123, n. 4, p. 293–300, 2015.

HEGADE, V. S.; KENDRICK, S. F.; JONES, D. E. Drug treatment of pruritus in liver diseases. **Clinical Medicine**, v. 15, n. 4, p. 351–357, 2015.

HO, C.; LAM, C.; CHAN, M.; CHEUNG, R.; LAW, L.; LIT, L.; NG, K.; SUEN, M.; TAI, H. Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications. **The Clinical Biochemist Reviews**, v. 24, n. 1, p. 3–12, 2003.

HOFMANN, A. F. The continuing importance of bile acids in liver and intestinal disease. **Archives of Internal Medicine**, v. 159, n. 22, p. 2647–2658, 1999.

HOLMES, E.; WILSON, I. D.; NICHOLSON, J. K. Metabolic Phenotyping in Health and Disease. **Cell**, v. 134, n. 5, p. 714–717, 2008.

HOPPEL, C. The role of carnitine in normal and altered fatty acid metabolism. **American Journal of Kidney Diseases: The Official Journal of the National Kidney Foundation**, v. 41, n. 4 Suppl 4, p. S4-12, 2003.

HU, J.; ZHANG, X.; GU, J.; YANG, M.; ZHANG, X.; ZHAO, H.; LI, L. Serum alkaline phosphatase levels as a simple and useful test in screening for significant fibrosis in treatment-naïve patients with hepatitis B e-antigen negative chronic hepatitis B. **European Journal of Gastroenterology & Hepatology**, v. 31, n. 7, p. 817–823, 2019.

HUNDT, M.; BASIT, H.; JOHN, S. Physiology, Bile Secretion. Em: **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2024.

IKEDA, Y.; MORITA, S.; TERADA, T. Cholesterol attenuates cytoprotective effects of phosphatidylcholine against bile salts. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 306, 2017.

IQBAL, J.; WALSH, M. T.; HAMMAD, S. M.; HUSSAIN, M. M. Sphingolipids and Lipoproteins in Health and Metabolic Disorders. **Trends in endocrinology and metabolism: TEM**, v. 28, n. 7, p. 506–518, 2017.

IVANISEVIC, J.; WANT, E. J. From Samples to Insights into Metabolism: Uncovering Biologically Relevant Information in LC-HRMS Metabolomics Data. **Metabolites**, v. 9, n. 12, p. 308, 2019.

JACKSON, K. G.; WAY, G. W.; ZHOU, H. Bile acids and sphingolipids in non-alcoholic fatty liver disease. **Chinese Medical Journal**, v. 135, n. 10, p. 1163, 2022.

JACOB, C. C.; DERVILLY-PINEL, G.; BIANCOTTO, G.; LE BIZEC, B. Evaluation of specific gravity as normalization strategy for cattle urinary metabolome analysis. **Metabolomics**, v. 10, n. 4, p. 627–637, 2014.

JAISWAL, G.; DEO, V.; BHONGADE, M.; JAISWAL, S. Serum alkaline phosphatase: a potential marker in the progression of periodontal disease in cirrhosis patients. **Quintessence International (Berlin, Germany: 1985)**, v. 42, n. 4, p. 345–348, 2011.

JANMOHAMED, A.; TRIVEDI, P. J. Patterns of disease progression and incidence of complications in primary biliary cholangitis (PBC). **Best Practice & Research. Clinical Gastroenterology**, v. 34–35, p. 71–83, 2018.

JENSEN, P.; MYSLING, S.; HØJRUP, P.; JENSEN, O. Glycopeptide enrichment for MALDI-TOF mass spectrometry analysis by Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography Solid Phase Extraction (HILIC SPE). **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 951, p. 131–44, 2013.

JOLLIFFE, I. T.; CADIMA, J. Principal component analysis: a review and recent developments. **Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 374, n. 2065, p. 20150202, 2016.

JONES, P. M.; BENNETT, M. J. Chapter 4 - Disorders of mitochondrial fatty acid β -oxidation. Em: GARG, U.; SMITH, L. D. (Eds.). **Biomarkers in Inborn Errors of Metabolism**. Clinical Aspects and Laboratory Determination San Diego: Elsevier, 2017. p. 87–101.

JOSHITA, S.; UMEMURA, T.; TANAKA, E.; OTA, M. Genetic Contribution to the Pathogenesis of Primary Biliary Cholangitis. **Journal of Immunology Research**, v. 2017, p. 3073504, 2017.

KADDURAH-DAOUK, R.; KRISHNAN, K. R. R. Metabolomics: A Global Biochemical Approach to the Study of Central Nervous System Diseases. **Neuropsychopharmacology**, v. 34, n. 1, p. 173–186, 2009.

KANG, W.; SUZUKI, M.; SAITO, T.; MIYADO, K. Emerging Role of TCA Cycle-Related Enzymes in Human Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 23, p. 13057, 2021.

KETTELER, M. Insuficiência renal e intestino: *p* -cresol e os perigos internos. **Kidney International**, v. 69, n. 6, p. 952–953, 2006.

KHAMMAR, A.; YARAHMADI, M.; MADADIZADEH, F. What Is Analysis of Covariance (ANCOVA) and How to Correctly Report Its Results in Medical Research? **Iranian Journal of Public Health**, v. 49, n. 5, p. 1016–1017, 2020.

KILANCZYK, E.; RUMINKIEWICZ, D.; BANALES, J. M.; MILKIEWICZ, P.; MILKIEWICZ, M. DHEA Protects Human Cholangiocytes and Hepatocytes against Apoptosis and Oxidative Stress. **Cells**, v. 11, n. 6, p. 1038, 2022.

KIM, D. J.; YOON, S.; JI, S. C.; YANG, J.; KIM, Y.-K.; LEE, S.; YU, K.-S.; JANG, I.-J.; CHUNG, J.-Y.; CHO, J.-Y. Ursodeoxycholic acid improves liver function via phenylalanine/tyrosine pathway and microbiome remodelling in patients with liver dysfunction. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 11874, 2018.

KITAGAWA, A. Effects of cresols (o-, m-, and p-isomers) on the bioenergetic system in isolated rat liver mitochondria. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 24, n. 1, p. 39–47, 2001.

KOAL, T.; DEIGNER, P. Challenges in Mass Spectrometry Based Targeted Metabolomics. **Current molecular medicine**, v. 10, p. 216–26, 2010.

KODAI, S.; TAKEMURA, S.; MINAMIYAMA, Y.; HAI, S.; YAMAMOTO, S.; KUBO, S.; YOSHIDA, Y.; NIKI, E.; OKADA, S.; HIROHASHI, K.; SUEHIRO, S. S-allyl cysteine prevents CCl₄-induced acute liver injury in rats. **Free Radical Research**, v. 41, n. 4, p. 489–497, 2007.

KORNFELD, D.; EKBOM, A.; IHRE, T. Is there an excess risk for colorectal cancer in patients with ulcerative colitis and concomitant primary sclerosing cholangitis? A population based study. **Gut**, v. 41, n. 4, p. 522–525, 1997.

KREMER, A. E.; MARTENS, J. J. W. W.; KULIK, W.; RUËFF, F.; KUIPER, E. M. M.; VAN BUUREN, H. R.; VAN ERPECUM, K. J.; KONDRACKIENE, J.; PRIETO, J.; RUST, C.; GEENES, V. L.; WILLIAMSON, C.; MOOLENAAR, W. H.; BEUERS, U.; OUDE ELFERINK, R. P. J. Lysophosphatidic acid is a potential mediator of cholestatic pruritus. **Gastroenterology**, v. 139, n. 3, p. 1008–1018, 2010.

KRIGE, J. E. J.; BORNMAN, P. C.; TERBLANCHE, J. Primary sclerosing cholangitis. Em: **Surgical Treatment: Evidence-Based and Problem-Oriented**. Zuckschwerdt, 2001.

KRUPA, K.; HAPSHY, V.; NGUYEN, H.; PARMAR, M. Obeticholic Acid. Em: **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2024.

KUMAR, D.; TANDON, R. Fatigue in cholestatic liver disease—a perplexing symptom. **Postgraduate Medical Journal**, v. 78, n. 921, p. 404–407, 2002.

KÜNDIGER, R.; MÜLLER, R.; BIEN, E.; SKORKA, G. The excretion of hippuric acid and ascorbic acid in the urine of liver-damaged rats. **Die Pharmazie**, v. 34, n. 11, p. 736–739, 1979.

LABINE, L. M.; PEREIRA, E. A. O.; KLEYWEGT, S.; JOBST, K. J.; SIMPSON, A. J.; SIMPSON, M. J. Environmental metabolomics uncovers oxidative stress, amino acid dysregulation, and energy impairment in *Daphnia magna* with exposure to industrial effluents. **Environmental Research**, v. 234, p. 116512, 2023.

LAKE, A. D.; NOVAK, P.; SHIPKOVA, P.; ARANIBAR, N.; ROBERTSON, D. G.; REILY, M. D.; LEHMAN-MCKEEMAN, L. D.; VAILLANCOURT, R. R.; CHERRINGTON, N. J. Branched chain amino acid metabolism profiles in

progressive human nonalcoholic fatty liver disease. **Amino Acids**, v. 47, n. 3, p. 603–615, 2015.

LANZMASTER, D.; VEYRAT-DUREBEX, C.; VOUREC'H, P.; ANDRES, C. R.; BLASCO, H.; CORCIA, P. Metabolomics: A Tool to Understand the Impact of Genetic Mutations in Amyotrophic Lateral Sclerosis. **Genes**, v. 11, n. 5, p. 537, 2020.

LAZAR, G.; FLORINA, R.; SOCACIU, M.; SOCACIU, C. Bioinformatics Tools for Metabolomic Data Processing and Analysis Using Untargeted Liquid Chromatography Coupled With Mass Spectrometry. **Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Animal Science and Biotechnologies**, v. 72, 2015.

LAZARIDIS, K. N.; LARUSSO, N. F. The Cholangiopathies. **Mayo Clinic proceedings**, v. 90, n. 6, p. 791–800, 2015.

LEHMANN, R.; ZHAO, X.; WEIGERT, C.; SIMON, P.; FEHRENBACH, E.; FRITSCH, J.; MACHANN, J.; SCHICK, F.; WANG, J.; HOENE, M.; SCHLEICHER, E. D.; HÄRING, H.-U.; XU, G.; NIESS, A. M. Medium Chain Acylcarnitines Dominate the Metabolite Pattern in Humans under Moderate Intensity Exercise and Support Lipid Oxidation. **PLOS ONE**, v. 5, n. 7, p. e11519, 2010.

LEUNG, K. K.; DEEB, M.; HIRSCHFIELD, G. M. Review article: pathophysiology and management of primary biliary cholangitis. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 52, n. 7, p. 1150–1164, 2020.

LI, M.; CAI, S.-Y.; BOYER, J. L. Mechanisms of bile acid mediated Inflammation in the Liver. **Molecular aspects of medicine**, v. 56, p. 45–53, 2017.

LI, T.; APTE, U. Bile acid metabolism and signaling in cholestasis, inflammation and cancer. **Advances in pharmacology (San Diego, Calif.)**, v. 74, p. 263–302, 2015.

LI, T.; CHIANG, J. Y. L. Bile acid signaling in metabolic disease and drug therapy. **Pharmacological Reviews**, v. 66, n. 4, p. 948–983, 2014.

LI, T.; TYNKKYNEN, T.; IHANUS, A.; ZHAO, S.; MÄKINEN, V.-P.; ALA-KORPELA, M. Characteristics of Normalization Methods in Quantitative Urinary Metabolomics—Implications for Epidemiological Applications and Interpretations. **Biomolecules**, v. 12, n. 7, p. 903, 2022.

LIN, C.-J.; LIOU, T.-C.; PAN, C.-F.; WU, P.-C.; SUN, F.-J.; LIU, H.-L.; CHEN, H.-H.; WU, C.-J. The Role of Liver in Determining Serum Colon-Derived Uremic Solutes. **PLOS ONE**, v. 10, n. 8, p. e0134590, 2015.

LINDOR, K. D.; BOWLUS, C. L.; BOYER, J.; LEVY, C.; MAYO, M. Primary Biliary Cholangitis: 2018 Practice Guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 69, n. 1, p. 394–419, 2019.

LINDOR, K. D.; KOWDLEY, K. V.; LUKETIC, V. A. C.; HARRISON, M. E.; MCCASHLAND, T.; BEFELER, A. S.; HARNOIS, D.; JORGENSEN, R.; PETZ, J.; KEACH, J.; MOONEY, J.; SARGEANT, C.; BRAATEN, J.; BERNARD, T.; KING, D.; MICELI, E.; SCHMOLL, J.; HOSKIN, T.; THAPA, P.; ENDERS, F. High Dose Ursodeoxycholic Acid for the Treatment of Primary Sclerosing Cholangitis. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 50, n. 3, p. 808–814, 2009.

LIU, P.; ZHU, W.; CHEN, C.; YAN, B.; ZHU, L.; CHEN, X.; PENG, C. The mechanisms of lysophosphatidylcholine in the development of diseases. **Life Sciences**, v. 247, p. 117443, 2020.

LLEO, A.; WANG, G.-Q.; GERSHWIN, M. E.; HIRSCHFIELD, G. M. Primary biliary cholangitis. **Lancet (London, England)**, v. 396, n. 10266, p. 1915–1926, 2020.

LU, L. Guidelines for the Management of Cholestatic Liver Diseases (2021). **Journal of Clinical and Translational Hepatology**, v. 10, n. 4, p. 757–769, 2022.

LV, H.; JIANG, F.; GUAN, D.; LU, C.; GUO, B.; CHAN, C.; PENG, S.; LIU, B.; GUO, W.; ZHU, H.; XU, X.; LU, A.; ZHANG, G. Metabolomics and Its Application in the Development of Discovering Biomarkers for Osteoporosis Research. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 12, p. 2018, 2016.

MARCHIONI BEERY, R. M.; VAZIRI, H.; FOROUHAR, F. Primary Biliary Cirrhosis and Primary Sclerosing Cholangitis: a Review Featuring a Women's Health Perspective. **Journal of Clinical and Translational Hepatology**, v. 2, n. 4, p. 266–284, 2014.

MARSCHALL, H.-U.; HENRIKSSON, I.; LINDBERG, S.; SÖDERDAHL, F.; THURESSON, M.; WAHLIN, S.; LUDVIGSSON, J. F. Incidence, prevalence, and outcome of primary biliary cholangitis in a nationwide Swedish population-based cohort. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 11525, 2019.

MATSUI, T.; ICHIKAWA, H.; FUJITA, T.; TAKAGI, T.; OSADA-OKA, M.; MINAMIYAMA, Y. Histidine deficiency attenuates cell viability in rat intestinal epithelial cells by apoptosis via mitochondrial dysfunction. **Journal of Nutrition & Intermediary Metabolism**, v. 8, p. 21–28, 2017.

MATTHEWS, H.; HANISON, J.; NIRMALAN, N. “Omics”-Informed Drug and Biomarker Discovery: Opportunities, Challenges and Future Perspectives. **Proteomes**, v. 4, n. 3, p. 28, 2016.

MCCALLEY, D. Hydrophilic Interaction Chromatography. Special Issues-04-01-2008. v. 0, Special Issues-04-01-2008, 2008. Disponível em: <<https://www.chromatographyonline.com/view/hydrophilic-interaction-chromatography-0>>. Acesso em: 25 mar. 2024.

MCCANN, M. R.; GEORGE DE LA ROSA, M. V.; ROSANIA, G. R.; STRINGER, K. A. L-Carnitine and Acylcarnitines: Mitochondrial Biomarkers for Precision Medicine. **Metabolites**, v. 11, n. 1, p. 51, 2021.

MEADOWS, V.; KENNEDY, L.; KUNDU, D.; ALPINI, G.; FRANCIS, H. Bile Acid Receptor Therapeutics Effects on Chronic Liver Diseases. **Frontiers in Medicine**, v. 7, p. 15, 2020.

MERVANT, L.; TREMBLAY-FRANCO, M.; JAMIN, E. L.; KESSE-GUYOT, E.; GALAN, P.; MARTIN, J.-F.; GUÉRAUD, F.; DEBRAUWER, L. Osmolality-based normalization enhances statistical discrimination of untargeted metabolomic urine analysis: results from a comparative study. **Metabolomics**, v. 17, n. 1, p. 2, 2021.

MIKUCKA-NICZYPORUK, A.; PIERZYNSKI, P.; LEMANCEWICZ, A.; KOSINSKI, P.; CHARKIEWICZ, K.; KNAS, M.; KACEROVSKY, M.; BLACHNIO-ZABIELSKA, A.; LAUDANSKI, P. Role of sphingolipids in the pathogenesis of intrahepatic cholestasis. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, v. 147, p. 106399, 2020.

MILKIEWICZ, P.; HEATHCOTE, E. J. Fatigue in chronic cholestasis. **Gut**, v. 53, n. 4, p. 475–477, 2004.

MINDIKOGLU, A. L.; COARFA, C.; OPEKUN, A. R.; SHAH, V. H.; ARAB, J. P.; LAZARIDIS, K. N.; PUTLURI, N.; AMBATI, C. R.; ROBERTSON, M. J.; DEVARAJ, S.; JALAL, P. K.; RANA, A.; GOSS, J. A.; DOWLING, T. C.; WEIR, M. R.; SELIGER, S. L.; RAUFMAN, J.-P.; BERNARD, D. W.; VIERLING, J. M. Metabolomic biomarkers are associated with mortality in patients with cirrhosis caused by primary biliary cholangitis or primary sclerosing cholangitis. **Future science OA**, v. 6, n. 2, p. FSO441, 2019.

MØLLER, N. Ketone Body, 3-Hydroxybutyrate: Minor Metabolite - Major Medical Manifestations. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 105, n. 9, p. 2884–2892, 2020.

MORITA, S.; TERADA, T. Molecular Mechanisms for Biliary Phospholipid and Drug Efflux Mediated by ABCB4 and Bile Salts. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 954781, 2014.

MORRIS, A. a. M.; OLPIN, S. E.; BENNETT, M. J.; SANTANI, A.; STAHLSCHMIDT, J.; MCCLEAN, P. Cholestatic Jaundice Associated with Carnitine Palmitoyltransferase IA Deficiency. **JIMD reports**, v. 7, p. 27–29, 2013.

NAM, S. L.; DE LA MATA, A. P.; DIAS, R. P.; HARYNUK, J. J. Towards Standardization of Data Normalization Strategies to Improve Urinary Metabolomics Studies by GC×GC-TOFMS. **Metabolites**, v. 10, n. 9, p. 376, 2020.

NEUE, U. D. CHROMATOGRAPHY: LIQUID | Mechanisms: Reversed Phases. Em: WILSON, I. D. (Ed.). **Encyclopedia of Separation Science**. Oxford: Academic Press, 2007. p. 1–7.

NGUYEN, K. D.; SUNDARAM, V.; AYOUB, W. S. Atypical causes of cholestasis. **World Journal of Gastroenterology : WJG**, v. 20, n. 28, p. 9418–9426, 2014.

OLIVEIRA, P. J. **Mitochondrial Biology and Experimental Therapeutics**. Springer, 2018. Google-Books-ID: Sq9SDwAAQBAJ.

OSMAN, C.; VOELKER, D. R.; LANGER, T. Making heads or tails of phospholipids in mitochondria. **The Journal of Cell Biology**, v. 192, n. 1, p. 7–16, 2011.

OVADIA, C. et al. Ursodeoxycholic acid in intrahepatic cholestasis of pregnancy: a systematic review and individual participant data meta-analysis. **The Lancet Gastroenterology & Hepatology**, v. 6, n. 7, p. 547–558, 2021.

PABLO ARAB, J.; BARRERA, F.; ARRESE, M. Bile Acids and Portal Hypertension. **Annals of Hepatology**, v. 16, p. S83–S86, 2017.

PALMELA, C.; PEERANI, F.; CASTANEDA, D.; TORRES, J.; ITZKOWITZ, S. H. Inflammatory Bowel Disease and Primary Sclerosing Cholangitis: A Review of the Phenotype and Associated Specific Features. **Gut and Liver**, v. 12, n. 1, p. 17–29, 2018.

PANDIT, S.; SAMANT, H. Primary Biliary Cholangitis. Em: **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023.

PANG, H.; HU, Z. Metabolomics in drug research and development: The recent advances in technologies and applications. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 13, n. 8, p. 3238–3251, 2023.

PAUMGARTNER, G.; BEUERS, U. Ursodeoxycholic acid in cholestatic liver disease: mechanisms of action and therapeutic use revisited. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 36, n. 3, p. 525–531, 2002.

PERINO, A.; DEMAGNY, H.; VELAZQUEZ-VILLEGAS, L.; SCHOONJANS, K. Molecular physiology of bile acid signaling in health, disease, and aging. **Physiological Reviews**, v. 101, n. 2, p. 683–731, 2021.

PINU, F. R.; VILLAS-BOAS, S. G. Extracellular Microbial Metabolomics: The State of the Art. **Metabolites**, v. 7, n. 3, p. 43, 2017.

PITT, J. J. Principles and Applications of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in Clinical Biochemistry. **The Clinical Biochemist Reviews**, v. 30, n. 1, p. 19–34, 2009.

POLLHEIMER, M. J.; HALILBASIC, E.; FICKERT, P.; TRAUNER, M. Pathogenesis of primary sclerosing cholangitis. **Best Practice & Research. Clinical Gastroenterology**, v. 25, n. 6, p. 727–739, 2011.

POUPON, R. E.; OUGUERRAM, K.; CHRÉTIEN, Y.; VERNEAU, C.; ESCHWÈGE, E.; MAGOT, T.; POUPON, R. Cholesterol-lowering effect of ursodeoxycholic acid in patients with primary biliary cirrhosis. **Hepatology**, v. 17, n. 4, p. 577–582, 1993.

PU, J.; LIU, Y.; GUI, S.; TIAN, L.; YU, Y.; WANG, D.; ZHONG, X.; CHEN, W.; CHEN, X.; CHEN, Y.; CHEN, X.; GONG, X.; LIU, L.; LI, W.; WANG, H.; XIE, P. Effects of pharmacological treatment on metabolomic alterations in animal models of depression. **Translational Psychiatry**, v. 12, p. 175, 2022.

QIU, S.; CAI, Y.; YAO, H.; LIN, C.; XIE, Y.; TANG, S.; ZHANG, A. Small molecule metabolites: discovery of biomarkers and therapeutic targets. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 8, n. 1, p. 1–37, 2023.

RAZZAQ, A.; SADIA, B.; RAZA, A.; KHALID HAMEED, M.; SALEEM, F. Metabolomics: A Way Forward for Crop Improvement. **Metabolites**, v. 9, n. 12, p. 303, 2019.

REDDY, J. K. III. Peroxisomal β -oxidation, PPAR α , and steatohepatitis. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 281, n. 6, p. G1333–G1339, 2001.

RESHETNYAK, V. I.; MAEV, I. V. Features of Lipid Metabolism Disorders in Primary Biliary Cholangitis. **Biomedicines**, v. 10, n. 12, p. 3046, 2022.

ROBERTS, L. D.; SOUZA, A. L.; GERSZTEN, R. E.; CLISH, C. B. Targeted Metabolomics. **Current Protocols in Molecular Biology**, v. CHAPTER, p. Unit30.2, 2012.

ROCKEY, D. C. Hepatic Fibrosis, Stellate Cells, and Portal Hypertension. **Clinics in Liver Disease**, Portal Hypertension. v. 10, n. 3, Portal Hypertension, p. 459–479, 2006.

ROMA, M. G.; TOLEDO, F. D.; BOAGLIO, A. C.; BASIGLIO, C. L.; CROCENZI, F. A.; SÁNCHEZ POZZI, E. J. Ursodeoxycholic acid in cholestasis: linking action mechanisms to therapeutic applications. **Clinical Science (London, England: 1979)**, v. 121, n. 12, p. 523–544, 2011.

ROSEN VOLLMAR, A. K.; RATTRAY, N. J. W.; CAI, Y.; SANTOS-NETO, Á. J.; DEZIEL, N. C.; JUKIC, A. M. Z.; JOHNSON, C. H. Normalizing Untargeted Periconceptional Urinary Metabolomics Data: A Comparison of Approaches. **Metabolites**, v. 9, n. 10, p. 198, 2019.

SAEED, A.; HOEKSTRA, M.; HOEKE, M. O.; HEEGSMA, J.; FABER, K. N. The interrelationship between bile acid and vitamin A homeostasis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1862, n. 5, p. 496–512, 2017.

SAIF, M. W.; ALEXANDER, D.; WICOX, C. M. Serum Alkaline Phosphatase Level as a Prognostic Tool in Colorectal Cancer: A Study of 105 patients. **The journal of applied research**, v. 5, n. 1, p. 88–95, 2005.

SAINI, R. K.; PRASAD, P.; SHANG, X.; KEUM, Y.-S. Advances in Lipid Extraction Methods—A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 24, p. 13643, 2021.

SALAS-SILVA, S.; SIMONI-NIEVES, A.; CHÁVEZ-RODRÍGUEZ, L.; GUTIÉRREZ-RUIZ, M. C.; BUCIO, L.; QUIROZ, L. E. G. Mechanism of cholangiocellular damage and repair during cholestasis. **Annals of Hepatology**, v. 26, 2021. Disponível em: <<https://www.elsevier.es/en-revista-annals-hepatology-16-articulo-mechanism-cholangiocellular-damage-repair-during-S1665268121002295>>. Acesso em: 3 out. 2023.

SANCHES, P.; DE OLIVEIRA, D.; DOS REIS, I.; FERNANDES, A.; SILVA, A.; EBERLIN, M.; CARVALHO, P.; DUARTE, G.; PORCARI, A. Fitting Structure-Data Files (.SDF) Libraries to Progenesis QI Identification Searches. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2023. Disponível em: <https://jbcs.sbq.org.br/audiencia_pdf.asp?aid2=11443&nomeArquivo=2022-0269AR.pdf>. Acesso em: 2 out. 2023.

SARIC, J.; WANT, E. J.; DUTHALER, U.; LEWIS, M.; KEISER, J.; SHOCKCOR, J. P.; ROSS, G. A.; NICHOLSON, J. K.; HOLMES, E.; TAVARES, M. F. M. Systematic Evaluation of Extraction Methods for Multiplatform-Based Metabotyping: Application to the *Fasciola hepatica* Metabolome. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 16, p. 6963–6972, 2012.

SCHMIDT, D. R.; HOLMSTROM, S. R.; FON TACER, K.; BOOKOUT, A. L.; KLIEWER, S. A.; MANGELSDORF, D. J. Regulation of Bile Acid Synthesis by Fat-soluble Vitamins A and D. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 19, p. 14486–14494, 2010.

SCHWAIGER, M.; SCHOENY, H.; ABIEAD, Y. E.; HERMANN, G.; RAMPLER, E.; KOELLENSPERGER, G. Merging metabolomics and lipidomics into one analytical run. **Analyst**, v. 144, n. 1, p. 220–229, 2018.

SEKULA, P.; DETTMER, K.; VOGL, F. C.; GRONWALD, W.; ELLMANN, L.; MOHNEY, R. P.; ECKARDT, K.-U.; SUHRE, K.; KASTENMÜLLER, G.; OEFNER, P. J.; KÖTTGEN, A. From Discovery to Translation: Characterization of C-Mannosyltryptophan and Pseudouridine as Markers of Kidney Function. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 17400, 2017.

SELMİ, C.; BOWLUS, C. L.; GERSHWIN, M. E.; COPPEL, R. L. Primary biliary cirrhosis. **Lancet (London, England)**, v. 377, n. 9777, p. 1600–1609, 2011.

SEND, S. R. Nutritional Management of Cholestasis. **Clinical Liver Disease**, v. 15, n. 1, p. 9–12, 2020.

SHAH, R.; JOHN, S. Cholestatic Jaundice. Em: **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023.

SHEN, N.; PAN, J.; MIAO, H.; ZHANG, H.; XING, L.; YU, X. Fibrates for the treatment of pruritus in primary biliary cholangitis: a systematic review and meta-analysis. **Annals of Palliative Medicine**, v. 10, n. 7, p. 7697705–7697705, 2021.

SIDDIQA, A.; WANG, Y.; THAPA, M.; MARTIN, D. E.; CADAR, A. N.; BARTLEY, J. M.; LI, S. A pilot metabolomic study of drug interaction with the immune response to seasonal influenza vaccination. **npj Vaccines**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2023.

SIDDIQI, I. A.; TADI, P. Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis. Em: **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2024.

SONG, J.; LI, Y.; BOWLUS, C. L.; YANG, G.; LEUNG, P. S. C.; GERSHWIN, M. E. Cholangiocarcinoma in Patients with Primary Sclerosing Cholangitis (PSC): a Comprehensive Review. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, v. 58, n. 1, p. 134–149, 2020.

SOUSA, T.; CASTRO, R. E.; COUTINHO, A.; RODRIGUES, C. M. P.; PRIETO, M.; FERNANDES, F. Measuring the Impact of Bile Acids on the Membrane Order of Primary Hepatocytes and Isolated Mitochondria by Fluorescence Imaging and Spectroscopy. Em: VINKEN, M. (Ed.). **Experimental**

Cholestasis Research. Methods in Molecular Biology New York, NY: Springer, 2019. p. 99–115.

SRIVASTAVA, A. Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis. **Journal of Clinical and Experimental Hepatology**, v. 4, n. 1, p. 25–36, 2014.

STEVENS, V. L.; HOOVER, E.; WANG, Y.; ZANETTI, K. A. Pre-Analytical Factors that Affect Metabolite Stability in Human Urine, Plasma, and Serum: A Review. **Metabolites**, v. 9, n. 8, p. 156, 2019.

STICOVA, E.; JIRSA, M. ABCB4 disease: Many faces of one gene deficiency. **Annals of Hepatology**, v. 19, n. 2, p. 126–133, 2020.

STRASSER, L.; FÜSSL, F.; MORGAN, T. E.; CARILLO, S.; BONES, J. Exploring Charge-Detection Mass Spectrometry on Chromatographic Time Scales. **Analytical Chemistry**, v. 95, n. 40, p. 15118–15124, 2023.

TAJIRI, K.; SHIMIZU, Y. Branched-chain amino acids in liver diseases. **Translational Gastroenterology and Hepatology**, v. 3, 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6088198/>>. Acesso em: 11 jan. 2024.

TALLEY, J. T.; MOHIUDDIN, S. S. Biochemistry, Fatty Acid Oxidation. Em: **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2024.

TANAKA, A. Current understanding of primary biliary cholangitis. **Clinical and Molecular Hepatology**, v. 27, n. 1, p. 1–21, 2021.

TANG, J. Microbial Metabolomics. **Current Genomics**, v. 12, n. 6, p. 391–403, 2011.

TANG, Y.-M.; WANG, J.-P.; BAO, W.-M.; YANG, J.-H.; MA, L.-K.; YANG, J.; CHEN, H.; XU, Y.; YANG, L.-H.; LI, W.; ZHU, Y.-P.; CHENG, J.-B. Urine and serum metabolomic profiling reveals that bile acids and carnitine may be potential biomarkers of primary biliary cirrhosis. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 36, n. 2, p. 377–385, 2015.

BERETTA-PICCOLI, B. T.; MIELI-VERGANI, G.; VERGANI, D.; VIERLING, J. M.; ADAMS, D.; ALPINI, G.; BANALES, J. M.; BEUERS, U.; BJÖRNSSON, E.; BOWLUS, C.; CARBONE, M.; CHAZOUILLÈRES, O.; DALEKOS, G.; DE GOTTARDI, A.; HARADA, K.; HIRSCHFIELD, G.; INVERNIZZI, P.; JONES, D.; KRAWITT, E.; LANZAVECCHIA, A.; LIAN, Z.-X.; MA, X.; MANNS, M.; MAVILIO, D.; QUIGLEY, E. MM.; SALLUSTO, F.; SHIMODA, S.; STRAZZABOSCO, M.; SWAIN, M.; TANAKA, A.; TRAUNER, M.; TSUNEYAMA, K.; ZIGMOND, E.; GERSHWIN, M. E. The

challenges of primary biliary cholangitis: What is new and what needs to be done. **Journal of Autoimmunity**, v. 105, p. 102328, 2019.

THOMAS, S. H.; JOH, T.; BENOIT, J. N. Role of bile acids in splanchnic hemodynamic response to chronic portal hypertension. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 36, n. 9, p. 1243–1248, 1991.

THOMPSON, R. J.; ARNELL, H.; ARTAN, R.; BAUMANN, U.; CALVO, P. L.; CZUBKOWSKI, P.; DALGIC, B.; D'ANTIGA, L.; DURMAZ, Ö.; FISCHLER, B.; GONZALÈS, E.; GRAMMATIKOPOULOS, T.; GUPTE, G.; HARDIKAR, W.; HOUWEN, R. H. J.; KAMATH, B. M.; KARPEN, S. J.; KJEMS, L.; LACAILE, F.; LACHAUX, A.; LAINKA, E.; MACK, C. L.; MATTSSON, J. P.; MCKIERNAN, P.; ÖZEN, H.; RAJWAL, S. R.; ROQUELAURE, B.; SHAGRANI, M.; SHTEYER, E.; SOUFI, N.; STURM, E.; TESSIER, M. E.; VERKADE, H. J.; HORN, P. Odevixibat treatment in progressive familial intrahepatic cholestasis: a randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. **The Lancet Gastroenterology & Hepatology**, v. 7, n. 9, p. 830–842, 2022.

TORRES, M.; PARETS, S.; FERNÁNDEZ-DÍAZ, J.; BETETA-GÖBEL, R.; RODRÍGUEZ-LORCA, R.; ROMÁN, R.; LLADÓ, V.; ROSSELLÓ, C. A.; FERNÁNDEZ-GARCÍA, P.; ESCRIBÁ, P. V. Lipids in Pathophysiology and Development of the Membrane Lipid Therapy: New Bioactive Lipids. **Membranes**, v. 11, n. 12, p. 919, 2021.

TRAUNER, M.; FICKERT, P.; HALILBASIC, E.; MOUSTAFA, T. Lessons from the toxic bile concept for the pathogenesis and treatment of cholestatic liver diseases. **Wiener Medizinische Wochenschrift (1946)**, v. 158, n. 19–20, p. 542–548, 2008.

TRIVEDI, D. K.; GOODACRE, R. Chapter 11 - The role of metabolomics in personalized medicine. Em: ADAMSKI, J. (Ed.). **Metabolomics for Biomedical Research**. Academic Press, 2020. p. 227–244.

TSAITAS, C.; SEMERTZIDOU, A.; SINAKOS, E. Update on inflammatory bowel disease in patients with primary sclerosing cholangitis. **World Journal of Hepatology**, v. 6, n. 4, p. 178–187, 2014.

VALLE, M. B.; BJÖRNSSON, E.; LINDKVIST, B. Mortality and cancer risk related to primary sclerosing cholangitis in a Swedish population-based cohort. **Liver International**, 2011.

VAN DEN BERG, R. A.; HOEFSLOOT, H. C.; WESTERHUIS, J. A.; SMILDE, A. K.; VAN DER WERF, M. J. Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. **BMC Genomics**, v. 7, p. 142, 2006.

VIGNOLI, A.; ORLANDINI, B.; TENORI, L.; BIAGINI, M. R.; MILANI, S.; RENZI, D.; LUCHINAT, C.; CALABRÒ, A. S. Metabolic Signature of Primary Biliary Cholangitis and Its Comparison with Celiac Disease. **Journal of Proteome Research**, v. 18, n. 3, p. 1228–1236, 2019.

VIRMANI, M. A.; CIRULLI, M. The Role of l-Carnitine in Mitochondria, Prevention of Metabolic Inflexibility and Disease Initiation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 5, p. 2717, 2022.

VISWANATHAN, C. T.; BANSAL, S.; BOOTH, B.; DESTEFANO, A. J.; ROSE, M. J.; SAILSTAD, J.; SHAH, V. P.; SKELLY, J. P.; SWANN, P. G.; WEINER, R. Workshop/conference report—Quantitative bioanalytical methods validation and implementation: Best practices for chromatographic and ligand binding assays. **The AAPS Journal**, v. 9, n. 1, p. E30–E42, 2007.

VITORIA, I.; MARTÍN-HERNÁNDEZ, E.; PEÑA-QUINTANA, L.; BUENO, M.; QUIJADA-FRAILE, P.; DALMAU, J.; MOLINA-MARRERO, S.; PÉREZ, B.; MERINERO, B. Carnitine-Acylcarnitine Translocase Deficiency: Experience with Four Cases in Spain and Review of the Literature. **JIMD Reports**, v. 20, p. 11–20, 2015.

VLĂDUȚ, C.; CIOCÎRLAN, M.; BILOUS, D.; ȘANDRU, V.; STAN-ILIE, M.; PANIC, N.; BECHEANU, G.; JINGA, M.; COSTACHE, R. S.; COSTACHE, D. O.; DICULESCU, M. An Overview on Primary Sclerosing Cholangitis. **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, n. 3, p. 754, 2020.

WANG, B.-L.; ZHANG, C.-W.; WANG, L.; TANG, K.-L.; TANAKA, N.; GONZALEZ, F. J.; XU, Y.; FANG, Z.-Z. Lipidomics reveal aryl hydrocarbon receptor (Ahr)-regulated lipid metabolic pathway in alpha-naphthyl isothiocyanate (ANIT)-induced intrahepatic cholestasis. **Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems**, v. 49, n. 5, p. 591–601, 2019.

WANG, J.; YANG, G.; DUBROVSKY, A. M.; CHOI, J.; LEUNG, P. S. C. Xenobiotics and loss of tolerance in primary biliary cholangitis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 22, n. 1, p. 338–348, 2016.

WARRACK, B. M.; HNATYSHYN, S.; OTT, K.-H.; REILY, M. D.; SANDERS, M.; ZHANG, H.; DREXLER, D. M. Normalization strategies for metabonomic analysis of urine samples. **Journal of Chromatography B**, v. 877, n. 5, p. 547–552, 2009.

WATSON, W. H.; GREENWELL, J. C.; ZHENG, Y.; FURMANEK, S.; TORRES-GONZALEZ, E.; RITZENTHALER, J. D.; ROMAN, J. Impact of sex, age and diet on the cysteine/cystine and glutathione/glutathione disulfide plasma redox couples in mice. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 84, p. 108431, 2020.

WAWRZYNIAK, R.; KOSNOWSKA, A.; MACIOSZEK, S.; BARTOSZEWSKI, R.; JAN MARKUSZEWSKI, M. New plasma preparation approach to enrich metabolome coverage in untargeted metabolomics: plasma protein bound hydrophobic metabolite release with proteinase K. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 9541, 2018.

WEI, G.; CAO, J.; HUANG, P.; AN, P.; BADLANI, D.; VAID, K. A.; ZHAO, S.; WANG, D. Q.-H.; ZHUO, J.; YIN, L.; FRASSETTO, A.; MARKEL, A.; PRESNYAK, V.; GANDHAM, S.; HUA, S.; LUKACS, C.; FINN, P. F.; GIANGRANDE, P. H.; MARTINI, P. G. V.; POPOV, Y. V. Synthetic human ABCB4 mRNA therapy rescues severe liver disease phenotype in a BALB/c.Abc4^{-/-} mouse model of PFIC3. **Journal of Hepatology**, v. 74, n. 6, p. 1416–1428, 2021.

WEISKIRCHEN, R. Hepatoprotective and Anti-fibrotic Agents: It's Time to Take the Next Step. **Frontiers in Pharmacology**, v. 6, p. 303, 2015.

WISHART, D. S. Emerging applications of metabolomics in drug discovery and precision medicine. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 15, n. 7, p. 473–484, 2016.

XIAO, J. F.; ZHOU, B.; RESSOM, H. W. Metabolite identification and quantitation in LC-MS/MS-based metabolomics. **Trends in analytical chemistry: TRAC**, v. 32, p. 1–14, 2012.

YABRÉ, M.; FERREY, L.; SOMÉ, I. T.; GAUDIN, K. Greening Reversed-Phase Liquid Chromatography Methods Using Alternative Solvents for Pharmaceutical Analysis. **Molecules: A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry**, v. 23, n. 5, p. 1065, 2018.

YAMAMOTO, Y.; SAKURAI, T.; CHEN, Z.; INOUE, N.; CHIBA, H.; HUI, S.-P. Lysophosphatidylethanolamine Affects Lipid Accumulation and Metabolism in a Human Liver-Derived Cell Line. **Nutrients**, v. 14, n. 3, p. 579, 2022.

YANG, H.; DUAN, Z. Bile Acids and the Potential Role in Primary Biliary Cirrhosis. **Digestion**, v. 94, n. 3, p. 145–153, 2016.

YANG, W.; WANG, Y.; TAO, K.; LI, R. Metabolite itaconate in host immunoregulation and defense. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v. 28, n. 1, p. 100, 2023.

YANG, Y.; CRUICKSHANK, C.; ARMSTRONG, M.; MAHAFFEY, S.; REISDORPH, R.; REISDORPH, N. New sample preparation approach for mass spectrometry-based profiling of plasma results in improved coverage of metabolome. **Journal of Chromatography A**, Extraction and Sample Preparation. v. 1300, Extraction and Sample Preparation, p. 217–226, 2013.

YEUNG, P. K. Metabolomics and Biomarkers for Drug Discovery. **Metabolites**, v. 8, n. 1, p. 11, 2018.

YOUNOSSI, Z. M.; BERNSTEIN, D.; SHIFFMAN, M. L.; KWO, P.; KIM, W. R.; KOWDLEY, K. V.; JACOBSON, I. M. Diagnosis and Management of Primary Biliary Cholangitis. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 114, n. 1, p. 48–63, 2019.

YU, X.-H.; CAO, R.-R.; YANG, Y.-Q.; LEI, S.-F. Identification of causal metabolites related to multiple autoimmune diseases. **Human Molecular Genetics**, v. 31, n. 4, p. 604–613, 2022a.

YU, X.-H.; CAO, R.-R.; YANG, Y.-Q.; LEI, S.-F. Identification of causal metabolites related to multiple autoimmune diseases. **Human Molecular Genetics**, v. 31, n. 4, p. 604–613, 2022b.

ZAPPATERRA, F.; COSTA, S.; SUMMA, D.; SEMERARO, B.; CRISTOFORI, V.; TRAPPELLA, C.; TAMBURINI, E. Glyceric Prodrug of Ursodeoxycholic Acid (UDCA): Novozym 435-Catalyzed Synthesis of UDCA-Monoglyceride. **Molecules**, v. 26, n. 19, p. 5966, 2021.

ZEMAN, M. V.; HIRSCHFIELD, G. M. Autoantibodies and liver disease: Uses and abuses. **Canadian Journal of Gastroenterology**, v. 24, n. 4, p. 225–231, 2010.

ZENG, J.; FAN, J.; ZHOU, H. Bile acid-mediated signaling in cholestatic liver diseases. **Cell & Bioscience**, v. 13, n. 1, p. 77, 2023.

ZHANG, Y.; LI, F.; PATTERSON, A. D.; WANG, Y.; KRAUSZ, K. W.; NEALE, G.; THOMAS, S.; NACHAGARI, D.; VOGEL, P.; VORE, M.; GONZALEZ, F. J.; SCHUETZ, J. D. Abcb11 Deficiency Induces Cholestasis Coupled to Impaired β -Fatty Acid Oxidation in Mice. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 29, p. 24784–24794, 2012.

ZUBAREV, R. A.; MAKAROV, A. Orbitrap Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 85, n. 11, p. 5288–5296, 2013.

APÊNDICE I

TABELA I. Relação de todos os metabólitos putativamente identificados nas análises de plasma de indivíduos com CBP vs. CS, apresentadas no Capítulo I, adquiridas por análises de LC-HRMS nos modos RPLC e HILIC (ESI +/-) (continuação).

massa teórica (Da)	composto	ID	m/z_{exp}	íon	erro (ppm)	eluição
312,2301	(E)-13-Hydroxy-10-oxo-11-octadecenoic acid	HMDB0040900	311,2224	[M-H]	1	HILIC (-)
481,3532	1-O-Hexadecyl-sn-glycero-3-phosphocholine	HMDB0243890	482,3595	[M+H]	2	HILIC (+)
426,3709	1-O-Isopentyl-3-O-octadec-2-enoyl glycerol	HMDB0302897	425,3641	[M-H]	1	RPLC (-)
154,0266	2,6-Dihydroxybenzoic acid	HMDB0013676	153,0196	[M-H]	2	HILIC (-)
214,0300	4-Allylphenol sulfate	HMDB0170765	213,0232	[M-H]	2	RPLC (-)
203,1158	Acetylcarnitine	HMDB0240771	204,1223	[M+H]	4	RPLC (+)
161,0510	Allyl cysteine	HMDB0248164	162,0581	[M+H]	2	HILIC (+)
246,0852	Aspartylhydroxyproline	HMDB0011160	247,0949	[M+H]	6	RPLC (+)
584,2635	Bilirubin	HMDB0000054	585,2677	[M+H]	5	HILIC (+)
392,2926	Chenodeoxycholic acid	HMDB0000518	391,2852	[M-H]	1	RPLC (-)
466,3116	Cholesterol sulfate	HMDB0000653	465,3033	[M-H]	2	RPLC (-)
408,2875	Cholic acid	LMST04010001	373,2713	[M+H-2H ₂ O]	10	RPLC (+)
240,0238	Cystine	HMDB0000192	241,0309	[M+H]	1	HILIC (+)
240,0238	Cystine	HMDB0000192	239,0168	[M+FA-H]	1	HILIC (-)
368,1657	DHEA -S	HMDB0001032	367,1578	[M-H]	2	RPLC (-)
292,0906	Edetic acid	HMDB0015109	583,1742	[M-H]		RPLC (-)
529,2709	GCDCA 3-sulfate	HMDB0341325	528,2633	[M-H]	1	RPLC (-)
625,3462	GCDCA 3-glucuronide	HMDB0002579	626,3527	[M+H]	1	RPLC (+)
449,3141	GDCA	HMDB0000631	448,3063	[M-H]	1	RPLC (-)
449,3141	GDCA	HMDB0000631	432,3098	[M+H-H ₂ O]	3	RPLC (+)
513,2760	GLCA 3-sulfate	HMDB0062801	512,2677	[M-H]	2	RPLC (+/-)
234,0852	Glutamylserine	HMDB0028828	217,0820	[M+H-H ₂ O]	2	HILIC (+)
155,0695	Histidine	HMDB0034267	156,0766	[M+H]	1	HILIC (+)
90,0317	Lactic acid	HMDB0000190	89,0244	[M-H]	0	HILIC (-)
519,3325	LPC(18:2)	HMDB0010386	520,3399	[M+H]	0	HILIC (+)
495,3324	LPC(16:0)	HMDB0256091	496,3408	[M+H]	2	HILIC (+)
521,3481	LPC(18:1)	HMDB0002815	520,3466	[M+H]	3	RPLC (+)
519,3324	LPC(18:2)	HMDB0010386	564,3311	[M+FA-H]	1	RPLC (-)
549,3794	LPC(20:1)	HMDB0010391	594,3777	[M+FA-H]	0	RPLC (-)
543,3325	LPC(20:4)	HMDB0010395	588,3307	[M+FA-H]	0	RPLC (-)
541,3168	LPC(20:5)	HMDB0010397	586,3145	[M+FA-H]	7	RPLC (-)
567,3325	LPC(22:6)	HMDB0010404	602,3016	[M-Cl]	0	RPLC (-)
479,3376	LPC(P-16:0) or LPC(O-16:1)	HMDB0010407	524,3359	[M+FA-H]	0	RPLC (-)
507,3689	LPC(P-18:0) or LPC(O-18:1)	HMDB0013122	552,3662	[M+FA-H]	2	RPLC (-)
451,2699	LPE(16:1)	HMDB0011504	450,2612	[M-H]	3	RPLC (-)
147,0532	N-acetylserine	HMDB0002931	189,0866	[M+H-ACN]	2	RPLC (+)
415,3086	N-Eicosapentaenoyl Isoleucine	HMDB0242073	416,3123	[M+H]	8	RPLC (+)
282,2558	Oleic acid	HMDB0000207	281,2488	[M-H]	1	RPLC (-)
256,2402	Palmitic acid	HMDB0000220	323,2197	[M-H-HCOONa]	2	RPLC (-)
733,5622	PC(16:0/16:0)	HMDB0245715	778,5599	[M+FA-H]	1	HILIC (-)
783,5778	PC(20:3/16:0)	HMDB0008364	828,5747	[M+FA-H]	1	RPLC (-)
779,5465	PC(20:5/16:0)	HMDB0008495	824,5455	[M+FA-H]	3	RPLC (-)

TABELA I. Relação de todos os metabólitos identificados nas amostras de plasma de CBP vs. CS, apresentadas no Capítulo I, adquiridas por análises de LC-HRMS nos modos RPLC e HILIC (ESI +/-).

massa teórica (Da)	composto	ID	m/z_{exp}	íon	erro (ppm)	eluição
567,3324	PC(22:0/6 ceto-PGF1alpha)	HMDB0287791	568,3393	[M+H]	1	RPLC (+)
284,0896	p-cresol glucuronide	HMDB0011686	283,0816	[M-H]	3	HILIC (-)
264,1110	Phenylacetylglutamine	HMDB0006344	263,1026	[M-H]	4	RPLC (-)
217,1314	Propionylcarnitine	HMDB0000824	218,1383	[M+H]	2	RPLC (+)
244,0695	Pseudouridine	HMDB0000767	243,0624	[M-H]	1	HILIC (-)
730,5988	SM(d18:1/18:0)	HMDB0001348	731,6058	[M+H]	0	HILIC (+)
341,2566	trans-2-Dodecenoylcarnitine	HMDB0013326	342,2639	[M+H]	0	RPLC (+)
244,0695	Uridine	HMDB0000296	279,0394	[M+Cl]	0	HILIC (-)
392,2926	Ursodeoxycholic acid	HMDB0246080	437,2901	[M+FA-H]	2	RPLC (-)

TABELA II. Análises estatísticas comparando-se amostras de plasma dos grupos CBP e CS ($p \leq 0,05$ e $q \leq 0,05$) e a análise do efeito da idade sobre cada metabólito analisado ($p \leq 0,05$) (continuação).

Biochemical Name	Test of Normality (CS) ($p > 0,05$)	Test of Normality (CBP) ($p > 0,05$)	Homog, of Variance Levene test ($p > 0,05$)	Non parametric test Mann Whitney ($p < 0,05$)	p-Value ($p < 0,05$)	q-Value ($p < 0,05$)	Age Effects $p < 0,05$
Cystine	0,3492	0,9486	0,8460		0,0000	0,0000	0,3580
Allyl cysteine	0,0697	0,0726	0,2916		0,0000	0,0000	0,9660
Aspartylhydroxy proline	0,3523	0,0790	0,9593		0,0000	0,0000	0,6660
Glutamylserine	0,9528	0,6802	0,9035		0,0000	0,0000	0,1340
N-acetylserine	0,9561	0,9839	0,5362		0,0014	0,0020	0,8200
Histidine	0,2344	0,2623	0,5460		0,0000	0,0000	0,9110
p-cresol glucuronide	0,7006	0,8076	0,5994		0,0064	0,0084	0,6970
Phenylacetyl glutamine	0,3235	0,7386	0,8298		0,0140	0,0160	0,6170
Pseudouridine	0,5179	0,0668	0,4115		0,0000	0,0000	0,1530
Uridine	0,0497	0,4601	0,2997		0,0000	0,0000	0,4870
Bilirubin	0,4036	0,1705	0,4821		0,0068	0,0086	0,2850
Lactic acid	0,6979	0,7405	0,7051		0,0002	0,0003	0,1910
4-allylphenol sulfate	0,5682	0,2769	0,3352		0,0012	0,0019	0,5670
2,6-Dihydroxybenzoic acid	0,9846	0,9748	0,0529		0,0000	0,0000	0,5920
trans-2-Dodecenoylcarnitine	0,1412	0,1402	0,2963		0,0125	0,0147	0,6620
Propionylcarnitine	0,5173	0,6680	0,1440		0,0009	0,0013	0,4840
Acetylcarnitine	0,9983	0,1866	0,6147		0,0000	0,0000	0,7960
Oleic acid	0,4970	0,4573	0,6359		0,0000	0,0000	0,5180
Palmitic acid	0,2430	0,4447	0,4775		0,0000	0,0000	0,3720
(E)-13-Hydroxy-10-oxo-11-octadecenoic acid	0,8193	0,8137	0,6205		0,0000	0,0000	0,4080
N-Eicosapentaenoyl Isoleucine	0,0001	0,0120	0,0425	0,0000	0,0000	0,0000	0,6610
1-O-Isopentyl-3-O-octadec-2-enoyl glycerol	0,7708	0,5369	0,6265		0,0363	0,0388	0,4590
Cholesterol sulfate	0,1426	0,3112	0,1615		0,0001	0,0003	0,5460
PC(16:0/16:0)	0,3488	0,0768	0,0870		0,0000	0,0000	0,5340
PC(20:3/16:0)	0,5187	0,2707	0,2328		0,0002	0,0003	0,8800
PC(20:5/16:0)	0,5272	0,6623	0,7562		0,0031	0,0045	0,7420
PC(22:0/6 keto-PGF1alpha)	0,4975	0,5066	0,8807		0,0079	0,0100	0,6340
LPC(16:0)	0,1434	0,5583	0,1969		0,0000	0,0000	0,5160
LPC(18:1)	0,5269	0,7467	0,1656		0,0000	0,0000	0,1330
LPC(18:2)	0,2496	0,4408	0,2006		0,0000	0,0000	0,9170

TABELA II. Análises estatísticas comparando-se amostras de plasma dos grupos CBP e CS ($p \leq 0,05$ e $q \leq 0,05$) e a análise do efeito da idade sobre cada metabólito analisado ($p \leq 0,05$).

Biochemical Name	Test of Normality (CS) ($p > 0,05$)	Test of Normality (CBP) ($p > 0,05$)	Homogeneity of Variance Levene test ($p > 0,05$)	Non parametric test Mann Whitney ($p < 0,05$)	p-Value ($p < 0,05$)	q-Value ($p < 0,05$)	Age Effects $p \leq 0,05$
LPC (20:1)	0,0249	0,1188	0,4518		0,0001	0,0001	0,8840
LPC(20:4)	0,6111	0,4589	0,1574		0,0240	0,0273	0,7990
LPC(20:5)	0,8835	0,8586	0,1073		0,0023	0,0034	0,1810
LPC(22:6)	0,7373	0,6537	0,2651		0,0002	0,0004	0,8700
LPC(P-16:0) or LPC(O-16:1)	0,6841	0,2816	0,1341		0,0023	0,0068	0,4670
LPC(P-18:0) or LPC(O-18:1)	0,1378	0,1179	0,0830		0,0060	0,0090	0,2590
1-O-Hexadecyl-sn-glycero-3-phosphocholine	0,1423	0,0704	0,0002	0,0120	0,0120	0,0340	0,8990
LPE(16:1)	0,0004	0,5618	0,1047		0,0000	0,0000	0,1780
Cholic acid (CA)	0,3315	0,1848	0,9819		0,006	0,0098	0,1630
CDCA	0,2725	0,6396	0,0176	0,0005	0,0005	0,0008	0,6310
UDCA	0,6173	0,2114	0,1128		0,0000	0,0000	0,3620
GDCA	0,7481	0,8112	0,2365		0,0000	0,0000	0,3350
GCDCA 3-glucuronide	0,6992	0,4370	0,0354	0,0000	0,0000	0,0000	0,7490
GUDCA 3-sulfate	0,1154	0,8145	0,4003		0,0000	0,0000	0,2480
GLCA 3-sulfate	0,3518	0,0002	0,0160	0,0000	0,0000	0,0000	0,5820
SM(d18:1/18:0)	0,1426	0,0238	0,7995		0,0004	0,0007	0,9960
DHEA-S	0,4191	0,8111	0,0877		0,0000	0,0000	0,0420

TABELA III. Relação de todos os metabólitos putativamente identificados nas amostras de urina, adquiridas por análises de LC-HRMS nos modos RPLC e HILIC (ESI +/-) (*continuação*).

massa teórica (Da)	composto	ID	m/z_{exp}	íon	erro (ppm)	eluição
281,1124	1-methyladenosine	HMDB0003331	282,1198	[M+H]	0	HILIC (+)
282,0964	1-methylinosine	HMDB0002721	283,1036	[M+H]	0	HILIC (+)
118,063	2-ethylhydracrylate	HMDB0000396	117,0555	[M-H]	4	RPLC (-)
132,0786	2-hydroxy-3-methylvalerate	HMDB00317	131,071	[M-H]	3	RPLC (-)
118,0629	2-hydroxyvalerate	HMDB0001863	117,0553	[M-H]	2	HILIC (-)
297,1073	2-methylguanosine	HMDB0005862	298,1136	[M+H]	3	HILIC (+)
285,194	2-Octenoylcarnitine	HMDB0013324	286,201	[M+H]	1	HILIC (+)
99,0684	2-Piperidinone	HMDB0011749	100,0755	[M+H]	6	RPLC (+)
168,0534	2-Pyrrolylglycine	HMDB0059778	169,0602	[M+H]	1	RPLC (+)
268,1311	3-CMPFP	HMDB0061643	267,1237	[M-H]	1	RPLC (-)
303,2046	3-Hydroxyoctanoyl carnitine	HMDB0061634	304,2113	[M+H]	2	RPLC (+)
169,0851	3-Methylhistidine	HMDB0000479	170,0925	[M+H]	1	HILIC (+)
166,0491	3-methylxanthine	HMDB0001886	167,0563	[M+H]	0	HILIC (+)
591,225	4-Hydroxyestrone-2-S-glutathione	HMDB0012780	220,0632	[M+3Na]	5	RPLC (+)
183,0531	4-Pyridoxate	HMDB000017	182,0452	[M-H]	4	RPLC (-)
246,0851	5,6-dihydrouridine	HMDB0000497	247,0924	[M+H]	0	HILIC (+)
532,3069	5beta-Cyprinolsulfate	HMDB0006888	265,1471	[M-2H]	3	RPLC (-)
329,2202	6-Keto-decanoylcarnitine	HMDB0013202	330,2272	[M+H]	1	RPLC (+)
313,2253	9-Decenoylcarnitine	HMDB0013205	314,2319	[M+H]	2	RPLC (+)
161,0688	Acetylhomoserine	HMDB0029423	162,0756	[M+H]	3	RPLC (+)
158,044	Allantoin	HMDB0000462	157,0365	[M-H]	1	HILIC (-)
195,0532	alpha-Hydroxyhippurate	HMDB0002404	194,0457	[M-H]	1	RPLC (-)
466,2566	Androsterone glucuronide	HMDB0002829	467,2615	[M+H]	5	RPLC (+)
174,1116	Arginine	HMDB0000517	175,1188	[M+H]	1	HILIC (+)
155,0695	beta-(Pyrazole-1-yl)-alanine	HMDB0034267	156,0767	[M+H]	0	HILIC (+)
161,1051	Carnitine	HMDB0000062	162,1124	[M+H]	0	RPLC (+)
189,9936	catechol sulfate	HMDB0059724	188,9859	[M-H]	1	RPLC (-)
584,3197	Cholic acid glucuronide	HMDB0002577	583,3117	[M-H]	1	RPLC (-)
130,0266	Citraconate	HMDB0000634	129,0193	[M-H]	0	HILIC (-)
113,0589	Creatinine	HMDB0000562	114,0665	[M+H]	3	HILIC (+)
449,3141	DCA 3-glucuronide	HMDB0000631	569,3312	[M+H-H ₂ O]	1	RPLC (+)
202,1429	dimethylarginine	HMDB0001539	203,1505	[M+H]	1	HILIC (+)
334,2871	Docosatrienoate	HMDB0002823	334,309	[M+NH ₄ -H ₂ O]	6	RPLC (+)
174,1368	Ethyl lysine	HMDB0252051	175,144	[M+H]	1	HILIC (+)
246,1216	gamma-Glutamylvaline	HMDB0011172	247,1287	[M+H]	2	RPLC (+)
625,3462	GCDCA 3-glucuronide	HMDB0002579	626,3532	[M+H]	1	RPLC (+)
625,3462	GCDCA 3-glucuronide	HMDB0002497	528,2639	[M-H]	0	RPLC (-)
529,2709	GCDCA 3-sulfate	HMDB0002497	528,2639	[M-H]	0	RPLC (-)
449,3141	GDCA	LMST05030006	432,3111	[M+H-H ₂ O]	3	RPLC (+)
433,3192	GLCA	HMDB0000698	416,3162	[M+H-H ₂ O]	0	RPLC (+)
179,0582	Hippurate	HMDB0000714	178,0521	[M-H]	2	HILIC (-)
155,0694	Histidine	HMDB0000177	156,0763	[M+H]	5	RPLC (+)
262,0147	Homovanillate sulfate	HMDB0011719	261,0072	[M-H]	1	RPLC (-)
351,0954	Indole-3-acetic-acid-O-glucuronídeo	HMDB0060001	350,0872	[M-H]	3	HILIC (-)
309,0848	Indoxyl glucuronide	HMDB0010319	308,0762	[M-H]	4	RPLC (-)
131,0946	Isoleucine	HMDB0000172	132,1019	[M+H]	1	HILIC (+)

TABELA III. Relação de todos os metabólitos identificados nas amostras de urina, adquiridas por análises de LC-HRMS nos modos RPLC e HILIC (ESI +/-).

massa teórica (Da)	composto	ID	m/z_{exp}	íon	erro (ppm)	eluição
131,0946	Leucine	HMDB0013773	132,102	[M+H]	1	RPLC (+)
188,1525	N6,N6,N6-Trimethyl-L-lysine	HMDB0001325	189,1596	[M+H]	1	HILIC (+)
204,0092	O-methoxycatechol-O-sulphate	HMDB0060013	203,0012	[M-H]	4	RPLC (-)
180,0647	Paraxanthine	HMDB0001860	181,0718	[M+H]	1	RPLC (+)
173,9986	Phenol sulphate	HMDB0060015	172,9914	[M-H]	1	RPLC (-)
165,0789	Phenylalanine	HMDB0000159	166,0861	[M+H]	1	HILIC (+)
85,0891	Piperidine	HMDB0034301	86,0966	[M+H]	5	RPLC (+)
115,0633	Proline	HMDB0000162	116,0704	[M+H]	2	HILIC (+)
244,0695	Pseudouridine	HMDB0000767	279,0388	[M+Cl]	0	HILIC (-)
182,999	Saccharin	HMDB0029723	181,9911	[M-H]	3	RPLC (-)
105,0426	Serine	HMDB0003406	106,0498	[M+H]	1	HILIC (+)
513,276	Sulfoglycolithocholic acid	HMDB0062801	512,2685	[M-H]	0	RPLC (-)
180,0647	Theobromine	HMDB0002825	181,0718	[M+H]	1	HILIC (+)
136,0372	Threonate	HMDB0000943	135,0297	[M-H]	1	HILIC (-)
174,0164	trans-aconitate	HMDB0000072	173,0087	[M-H]	3	RPLC (-)
60,0324	Urea	HMDB0000294	121,0719	[2M+H]	1	RPLC (+)
138,0429	Urocanate	HMDB0000301	139,0502	[M+H]	0	HILIC (+)
117,079	Valine	HMDB0000883	118,0879	[M+H]	5	RPLC (+)
284,0757	Xanthosine	HMDB0000299	283,068	[M-H]	1	RPLC (-)

TABELA IV. Relação de todos os metabólitos identificados nas amostras de urina, adquiridas por análises de LC-HRMS nos modos RPLC e HILIC (ESI +/-). Análises estatísticas foram conduzidas comparando os grupos CBP e CS ($p < 0,05$ e $q < 0,05$) e o efeito da idade ($p < 0,05$). (continuação).

Biochemical Name	Test of Normality (CS) ($p > 0,05$)	Test of Normality (CBP) ($p > 0,05$)	Homogeneity of Variance Levene test ($p > 0,05$)	Non parametric test Mann Whitney ($p < 0,05$)	p-Value ($p < 0,05$)	q-Value ($q < 0,05$)	Effects Age ($p < 0,05$)
Carnitine	0,4789	0,3929	0,3432		2,54E-05	4,07E-04	0,4597
9-Decenoylcarnitine	0,5366	0,0968	0,2566		1,13E-03	7,63E-03	0,4302
3-Hydroxyoctanoyl carnitine	0,0243	0,0006	0,7261		1,51E-02	3,32E-02	0,4038
6-Keto-decanoylcarnitine	0,9170	0,9997	0,8485		6,53E-04	5,76E-03	0,8161
2-Octenoylcarnitine	0,1384	0,2110	0,6511		9,85E-04	6,44E-03	0,5823
Docosatrienoate	0,9934	0,2916	0,1495		2,56E-03	7,97E-03	0,5469
3-CMPFP	0,7521	0,2387	0,7616		1,49E-03	8,64E-03	0,1438
Androsterone glucuronide	0,9896	0,9854	0,8299		1,75E-05	8,56E-05	0,4610
4-Hydroxyestrone-2-S-glutathione	0,4565	0,9891	0,0941		5,27E-04	6,10E-03	0,6196
5beta-Cyprinolsulfate	0,3922	0,9748	0,4558		4,07E-05	1,69E-03	0,1026
DCA 3-glucuronide	0,9856	0,1472	0,3559		3,55E-05	6,61E-04	0,6115
GDCA	0,7969	0,1289	0,5138		3,12E-04	5,42E-03	0,7265
GCDCA	0,9200	0,9439	0,6657		3,78E-06	3,39E-05	0,1156
GCDCA 3-sulfate	0,8313	0,2894	0,3073		4,65E-17	1,36E-02	0,9685
GLCA	0,3759	0,6102	0,3258		1,10E-03	3,39E-02	0,3830
Phenylalanine	0,6764	0,3310	0,9219		1,03E-09	1,86E-08	0,2178
beta-(Pyrazole-1-yl)-alanine	0,1021	0,0991	0,0678		2,74E-09	2,03E-08	0,8374
Arginine	0,6454	0,7625	0,8502		1,79E-06	3,22E-05	0,8788
dimethylarginine	0,3382	0,2010	0,2891		1,44E-08	2,71E-07	0,7247
Histidine	0,5759	0,9837	0,7037		7,63E-04	6,78E-03	0,0419
3-Methylhistidine	0,0764	0,1633	0,5340		1,47E-11	1,69E-10	0,5724
Urocanate	0,1900	0,6186	0,8967		2,33E-03	7,80E-03	0,3597
Leucine	0,4719	0,0010	0,4901	1,5E-06	1,50E-06	4,58E-06	-
Isoleucine	0,3286	0,9252	0,8774		5,64E-09	2,54E-07	0,5469
N6,N6,N6-Trimethyl-L-lysine	0,0980	0,3292	0,5385		3,83E-09	2,37E-08	0,6765
ethyl lysine	0,9947	0,7796	0,9577		2,73E-05	3,90E-04	0,3156
Proline	0,9507	0,9407	0,3509		2,26E-05	5,08E-05	0,4205
Serine	0,1301	0,1332	0,4016		1,52E-07	2,88E-06	0,8943
Phenol sulphate	0,2494	0,7813	0,0441		2,07E-04	4,92E-04	0,0146
Valine	0,9022	0,6020	0,0429		4,54E-03	8,14E-03	0,0288
Urea	0,9553	0,9971	0,1241		3,70E-04	2,88E-03	0,1285

TABELA IV. Relação de todos os metabólitos identificados nas amostras de urina, adquiridas por análises de LC-HRMS nos modos RPLC e HILIC (ESI +/-). Análises estatísticas foram conduzidas comparando os grupos CBP e CS ($p < 0,05$ e $q < 0,05$) e o efeito da idade ($p < 0,05$).

Biochemical Name	Test of Normality (CS) ($p > 0,05$)	Test of Normality (CBP) ($p > 0,05$)	Homogeneity of Variance Levene test ($p > 0,05$)	Non parametric test Mann Whitney ($p < 0,05$)	p-Value ($p < 0,05$)	q-Value ($q < 0,05$)	Effects Age ($p < 0,05$)
1-Methyladenosine	0,0757	0,6750	0,8997		6,23E-12	1,53E-11	0,5981
2-Methylguanosine	0,7728	0,1095	0,9495		6,34E-07	3,05E-06	0,9278
Pseudouridine	0,7856	0,5286	0,1766		1,34E-02	3,83E-02	0,0580
5,6-Dihydrouridine	0,0073	0,1291	0,3358	5,9E-09	5,98E-09	6,78E-08	-
trans-aconitate	0,8920	0,9779	0,6374		2,24E-05	8,47E-04	0,1576
Indole-3-Acetic-acid-O-glucuronide	0,7942	0,7942	0,4943		4,57E-03	8,31E-03	0,8947
4-Pyridoxate	0,9461	0,9291	0,7442		1,07E-03	1,02E-02	0,3751
Piperidine	0,1761	0,8272	0,4261		1,34E-03	6,95E-03	0,7962
2-Piperidinone	0,8219	0,8916	0,8534		1,94E-04	4,75E-04	0,9172
Saccharin	0,0884	0,4081	0,1885		6,68E-04	2,71E-03	0,3291
O-methoxycatechol-O-sulfate	0,9536	0,4340	0,2571		1,29E-05	3,73E-05	0,7161
a-Hydroxyhippuric acid	0,6729	0,0923	0,3230		1,70E-04	4,58E-04	0,6521
Catechol sulfate	0,3555	0,4736	0,7732		2,89E-04	5,25E-04	0,8959
3-Methylxanthine	0,8751	0,3652	0,22885		2,24E-03	7,29E-03	0,4751
Theobromine	0,7613	0,0770	0,27168		6,42E-04	1,19E-03	0,7630

APÊNDICE II

TABELA V. Metabólitos putativamente identificados em amostras de plasma de CBP, CEP e PFIC3, discutidos no Capítulo II, obtidos das análises de LC-HRMS nos modos de separação RPLC e HILIC e nos modos de ionização (ESI +/-) (continuação).

massa teórica (Da)	composto	íon	m/z_{exp}	eluição	ID	Score	Score (Frag.)	Erro (ppm)
359,2671	10-hidroxidodecanoil carnitina	$[M+H-H_2O]^+$	342,2631	RPLC (+)	HMDB0241300	45,7	32,1	-2,30
312,23	Ácido 13-hidroperoxilinoico	$[M-H]^-$	311,2224	HILIC (-)	HMDB0003871	39	99,1	-1,14
281,1124	1-Metiladenosina	$[M+H]^+$	282,1193	HILIC (+)	HMDB0003331	47,1	37,2	-1,18
118,0742	2,4-Diaminobutirato	$[M+H-H_2O]^+$	83,0602	HILIC (+)	HMDB0002362	39,4	55,11	-1,66
155,0694	APPA	$[M-H]^-$	190,0380	HILIC (-)	HMDB0034267	37	5,4	4,98
103,0997	2-Amino-3-metil-1-butanol	$[M+H]^+$	104,1068	RPLC (+)	HMDB0244984	42,5	14,9	-1,67
172,0735	Ácido 2-Octenedióico	$[M-H]^-$	171,0664	RPLC (-)	HMDB0000341	49,2	48	0,72
148,0194	2-OMe-4-MTBA	$[M+Cl]^-$	182,9888	RPLC (-)	HMDB0001553	38,1	1,5	1,28
392,2926	DHCA	$[M+FA-H]^-$	437,2888	RPLC (-)	HMDB0246080	40,3	98,9	-4,65
162,0528	3-Hidroximetil glutarato	$[M+H-2H_2O]^+$	127,0390	HILIC (+)	HMDB0000355	44,2	25,7	-0,12
131,0582	4-Hidroxiprolina	$[M+H]^+$	132,0653	HILIC (+)	HMDB0000725	38,9	52,8	-1,65
300,0845	4-Hidroxibenzoil glicose	$[M-H_2O-H]^-$	281,0669	RPLC (-)	HMDB0303022	41,7	11,11	0,85
180,0423	Ácido 4-hidroxifenilpirúvico	$[M+H]^+$	180,0647	RPLC (+)	HMDB0000707	46,6	0,2	1,57
194,0942	4-MeO-BzPro	$[M-H]^-$	193,0870	RPLC (-)	HMDB0034990	43,9	22,2	-0,08
329,2202	5-Hidroxidec-3-enoilcarnitina	$[M+H-2H_2O]^+$	294,2059	RPLC (+)	HMDB0241075	47,2	41,4	-1,32
304,4304	THHA	$[M+H-H_2O]^+$	287,2211	RPLC (+)	CB000003	42,7	21,3	-1,88
162,0528	Ácido 3-hidroxi-2-metilglutárico	$[M+H]^+$	163,0598	HILIC (+)	HMDB0029169	41,3	9,6	-1,68
144,0422	3-HAL	$[M+H]^+$	145,0494	HILIC (+)	HMDB0029171	42,7	17,7	-1,11
132,0786	Ácido 3-Hidroxihexanoico	$[M-H]^-$	131,0715	RPLC (-)	HMDB0061652	40,7	7,5	1,25
118,0629	Ácido 3-Hidroxiisovalérico	$[M-H]^-$	117,0557	RPLC (-)	HMDB0000754	46	70,77	0,14
129,0789	Ácido Pipecólico	$[M+FA-H]^-$	174,0776	RPLC (-)	HMDB0000716	41,8	17	3,52
88,016	Ácido Pirúvico	$[M-H]^-$	87,0087	HILIC (-)	HMDB0000243	38,9	12,7	-1,19
138,0429	Urocanato	$[M+H]^+$	139,0502	HILIC (+)	HMDB0000301	39,2	42,7	-1,88
174,0164	Aconitato	$[M-H]^-$	173,0092	HILIC (-)	HMDB0000072	43,6	19,4	0,02
161,051	Alilcisteína	$[M+H]^+$	162,0579	HILIC (+)	HMDB0034323	39,5	12,4	-2,66
133,0375	Ácido Aspártico	$[M-H]^-$	132,0301	HILIC (-)	HMDB0000191	39,3	47,52	-0,86
118,0867	Betaína	$[M+H]^+$	118,0863	RPLC (+)	HILIC001794	44,2	21,9	-0,02
584,2634	Bilirrubina	$[M-H]^-$	583,2578	RPLC (-)	HMDB0000054	39,5	4,3	2,40
193,0772	Sulfóxido Butilcisteína	$[M+H-H_2O]^+$	176,0736	HILIC (+)	HMDB0302178	41,7	11,5	-1,69
161,1051	Carnitina	$[M+H]^+$	162,1123	HILIC (+)	HMDB0000062	51,9	61,3	-1,11
374,282	Ácido Colênico	$[M+ACN+N]^+$	438,2964	RPLC (+)	HMDB0000308	36,9	0,7	-3,79

TABELA V. Metabólitos putativamente identificados em amostras de plasma de CBP, CEP e PFIC3, discutidos no Capítulo II, obtidos das análises de LC-HRMS nos modos de separação RPLC e HILIC e nos modos de ionização (ESI +/-) (continuação).

massa teórica (Da)	composto	íon	m/z_{exp}	eluição	ID	Score	Score (Frag.)	Erro (ppm)
104,1075	Colina	[M+H] ⁺	104,1070	RPLC (+)	HMDB0000097	42,5	99,41	-1,67
113,0589	Creatinina	[M+H] ⁺	114,0666	RPLC (+)	HMDB0000562	41,5	13	3,96
240,0238	Cistina	[M+H] ⁺	241,0313	HILIC (+)	HMDB0250712	36,5	42,8	0,52
449,3141	GDCA	[M+H-H ₂ O] ⁺	414,2996	RPLC (+)	HMDB0000631	48	78,56	-1,52
450,2617	DG(2:0/PGJ2)	[M-H] ⁻	449,2537	RPLC (-)	HMDB0296921	40,7	95,7	-0,48
341,2566	Dodecenolcarnitina	[M+Cl] ⁻	376,2255	RPLC (-)	HMDB0251567	39,5	1,3	-1,36
301,2980	Esfinganina	[M+H] ⁺	302,3049	RPLC (+)	HMDB0000269	45,4	29,7	-1,37
351,2174	Esfingosina 1-fosfato	[M-H] ⁻	350,2099	RPLC (-)	HMDB0060061	40,3	4,47	-0,84
272,1776	Estradiol	[M+H] ⁺	273,1843	RPLC (+)	HMDB0000151	43,2	21,9	-2,10
165,0789	Fenilalanina	[M-H] ⁻	164,0716	RPLC (-)	HMDB0250791	50,8	55,1	-0,87
180,0633	Galactose	[M+Na] ⁺	203,0527	RPLC (+)	HMDB0033704	39,8	2,5	-2,00
204,0746	γ -glutamilglicina	[M+H-H ₂ O] ⁺	187,071	HILIC (+)	HMDB0011667	49,1	49,1	-1,50
294,1215	γ -Glutamilfenilalanina	[M+H] ⁺	295,1286	RPLC (+)	HMDB0000594	48,3	46,6	-1,01
179,0793	Glucosamina	[M+NH ₄] ⁺	180,0864	HILIC (+)	HMDB0001514	43,6	29,3	-1,23
180,0633	Glucose	[M-H] ⁻	179,0561	HILIC (-)	HMDB0000122	43,5	19,9	-0,12
147,0531	Ácido Glutâmico	[M+H] ⁺	148,0602	HILIC (+)	HMDB0000148	41,9	99,1	-1,42
146,0691	Glutamina	[M+H-H ₂ O] ⁺	129,0658	HILIC (+)	HMDB0000641	51,1	57,3	-0,67
625,3462	GCDCA 3-glicuronídeo	[M+H] ⁺	626,3531	RPLC (+)	HMDB0002579	51,5	60	-0,66
465,3081	Ácido Glicocólico	[M+H] ⁺	466,3159	RPLC (+)	HMDB0000138	46,8	37,1	-1,92
641,3411	GCA 3-glicuronídeo	[M+H] ⁺	642,3483	RPLC (+)	LMST05010023	33,6	45	-0,19
172,0847	Glicilprolina	[M+H-2H ₂ O] ⁺	137,0705	HILIC (+)	HMDB0000721	48,7	48	-2,57
74,0003	Ácido Glioxílico	[M-H] ⁻	72,9932	HILIC (-)	HMDB0000119	39,3	0	0,57
285,1212	Hexa-2,4-dienediolcarnitina	[M-H ₂ O-H] ⁻	266,103	RPLC (-)	HMDB0241673	42,6	17,2	-1,26
260,1861	Hexanolcarnitina	[M+Na] ⁺	283,1745	RPLC (+)	HMDB0000756	39	1,2	-3,41
179,0582	Hipurato	[M-H] ⁻	178,0503	RPLC (-)	HMDB0000714	46,6	94,69	4,32
155,0694	Histidina	[M-H] ⁻	154,0621	HILIC (-)	HMDB0000177	39,7	0	-0,74
212,0909	Histidilglicina	[M+H-H ₂ O] ⁺	195,0873	HILIC (+)	HMDB0028885	51,7	60,5	-1,45
130,0266	Itaconato	[M-H] ⁻	129,0193	HILIC (-)	HMDB0002092	39,6	9,8	0,08
90,0316	Ácido Láctico	[M-H] ⁻	89,0243	HILIC (-)	HMDB0000190	39,6	80,03	-0,86
131,0946	Leucina	[M-H] ⁻	130,0874	RPLC (-)	HMDB0000687	41,6	94,06	2,33
424,3421	Linoleil Carnitina	[M] ⁺	424,3415	RPLC (+)	HMDB0006469	38,4	99,67	-1,42
433,3192	Ácido glicolítico	[M+H-H ₂ O] ⁺	416,3151	RPLC (+)	HMDB0000698	49,3	51,4	-1,99
495,3324	LPC(16:0)	[M-H] ⁻	554,3437	RPLC (-)	HMDB0240262	38,3	84,5	-4,74
523,3637	LPC(18:0)	[M+H] ⁺	524,3707	HILIC (+)	HMDB0010384	58,3	93,9	-0,71
521,3481	LPC(18:1)	[M+H] ⁺	522,3543	RPLC (+)	HMDB0002815	35,3	93,76	-2,09
165,0459	Met-SO	[M+H-H ₂ O] ⁺	148,0424	HILIC (+)	HMDB0002005	40,1	5,88	-1,92
148,0735	Ácido Mevalônico	[M+H-H ₂ O] ⁺	113,0604	RPLC (+)	HMDB0000201	37,5	19,5	4,46

TABELA V. Metabólitos putativamente identificados em amostras de plasma de CBP, CEP e PFIC3, discutidos no Capítulo II, obtidos das análises de LC-HRMS nos modos de separação RPLC e HILIC e nos modos de ionização (ESI +/-).

massa teórica (Da)	composto	íon	m/z_{exp}	eluição	ID	Score	Score (Frag.)	Erro (ppm)
130,0629	Mevalonolactona	[M-H] ⁻	129,0559	RPLC (-)	HMDB0006024	41,5	12,8	1,29
203,1157	N-Acetilcarnitina	[M+H] ⁺	204,1231	RPLC (+)	HMDB0000201	43,6	99,95	0,47
189,0637	N-Acetil-glutamato	[M] ⁺	189,0865	RPLC (+)	HMDB0001138	49,6	51,3	-2,58
415,3086	N-Eicosapentaenoil Leucina	[M+H] ⁺	416,3154	RPLC (+)	HMDB0242074	41,5	11,8	-1,35
387,2443	N-Linoleoil Taurina	[M+H] ⁺	388,2533	RPLC (+)	LMFA08020138	37,1	0,007	4,50
101,0476	N-methyl-beta-alanina	[M+H] ⁺	102,0544	HILIC (+)	HMDB0304427	18,2	20,1	-2,94
295,1783	Nona-2,4,6-Trienoilcarnitina	[M-H ₂ O-H] ⁻	276,1604	RPLC (-)	HMDB0241779	41,6	11,9	-0,46
254,2245	Ácido Palmitoléico	[M-H] ⁻	253,2178	RPLC (-)	HMDB0003229	37,3	99,99	1,94
733,5621	PC(16:0/16:0)	[M+FA-H] ⁻	778,5617	HILIC (-)	HMDB0245715	52	91	2,00
188,0143	Sulfato de p-Cresol	[M-H] ⁻	187,0077	RPLC (-)	HMDB0011635	47,5	84,46	3,39
217,1314	Propionilcarnitina	[M+H] ⁺	218,1385	HILIC (+)	HMDB0000824	47,1	37	-0,89
290,0402	Sedoheptulose 7-fosfato	[M+K] ⁺	329,0047	RPLC (+)	HMDB0001068	38,5	2,2	4,33
689,5519	SM(d16:1/17:0)	[M+FA-H] ⁻	747,5692	HILIC (-)	HMDB0240618	56,8	94,5	4,93
174,0892	Suberato	[M-H] ⁻	173,0816	RPLC (-)	HMDB0000893	48,6	87,6	1,21
368,1657	DHEA-S	[M-H] ⁻	367,1578	RPLC (-)	HMDB0001032	38,5	97,62	2,01
513,276	GLCA 3-sulfato	[M+H-H ₂ O] ⁺	512,2681	RPLC (+)	HMDB0002639	44,4	27,8	-1,23
515,2917	TCA	[M-H] ⁻	514,2837	RPLC (-)	HMDB0000036	38,7	8,8	-1,43
499,2967	TDCA	[M-H] ⁻	498,2883	RPLC (-)	HMDB0000896	40,5	12,1	2,01
385,2464	Tridec-6-enedioilcarnitina	[M+H] ⁺	386,2520	RPLC (+)	HMDB0241322	35,6	4,32	-4,49
204,0898	Triptofano	[M+H] ⁺	188,0703	HILIC (+)	HMDB0030396	47,3	76,93	2,34
181,0738	Tirosine	[M+H-H ₂ O] ⁺	146,0609	RPLC (+)	HMDB0000158	36,8	0,5	4,85
244,0695	Uridina	[M-H] ⁻	243,0624	HILIC (-)	HMDB0000296	41,5	10,8	0,71
117,079	Valina	[M+H-H ₂ O] ⁺	100,0756	HILIC (+)	HMDB0250806	42	14	-1,19
178,0841	β-galactosil	[M+Na] ⁺	201,0730	HILIC (+)	HMDB0249118	40,1	4,8	-1,97

TABELA VI. Relação de metabólitos identificados putativamente, juntamente com as análises estatísticas ao comparar as amostras de plasma dos grupos CBP, CEP e PFIC3 com CS. Os resultados incluem os valores de significância estatística ($p < 0,05$ e $q < 0,05$), bem como a influência da idade ($p < 0,05$) (continuação).

Metabólito	Grupo1	Grupo2	p Value ($P < 0,05$)	q Value ($q < 0,05$)	p,adj,signif	Idade ($p < 0,05$)
10-hidroxiodecanoilcarnitina	Control	PBC	0,00027	0,002	**	0,014197859
10-hidroxiodecanoilcarnitina	Control	PFIC	0,765	0,765	ns	0,014197859
10-hidroxiodecanoilcarnitina	Control	PSC	0,018	0,074	ns	0,014197859
10-hidroxiodecanoilcarnitina	PBC	PFIC	0,002	0,008	**	0,014197859
10-hidroxiodecanoilcarnitina	PBC	PSC	0,214	0,428	ns	0,014197859
10-hidroxiodecanoilcarnitina	PFIC	PSC	0,059	0,178	ns	0,014197859
1-Metiladenosina	Control	PBC	6,03E-05	0,000362	***	0,555129854
1-Metiladenosina	Control	PSC	0,007	0,027	*	0,555129854
1-Metiladenosina	Control	PFIC	0,889	0,889	ns	0,555129854
1-Metiladenosina	PBC	PFIC	0,00016	8,00E-04	***	0,555129854
1-Metiladenosina	PFIC	PSC	0,012	0,036	*	0,555129854
1-Metiladenosina	PBC	PSC	0,12	0,24	ns	0,555129854
2,4-Diaminobutirato	Control	PSC	0,011	0,045	*	0,881969178
2,4-Diaminobutirato	PBC	PSC	0,000125	0,00075	***	0,881969178
2,4-Diaminobutirato	PFIC	PSC	0,005	0,024	*	0,881969178
2,4-Diaminobutirato	Control	PBC	0,042	0,124	ns	0,881969178
2,4-Diaminobutirato	Control	PFIC	0,58	0,58	ns	0,881969178
2,4-Diaminobutirato	PBC	PFIC	0,196	0,392	ns	0,881969178
2-Amino-3-metil-1-butanol	Control	PBC	0,002	0,01	**	0,210700183
2-Amino-3-metil-1-butanol	Control	PFIC	2,90E-05	0,000145	***	0,210700183
2-Amino-3-metil-1-butanol	Control	PSC	5,20E-07	3,12E-06	****	0,210700183
2-Amino-3-metil-1-butanol	PBC	PFIC	0,063	0,189	ns	0,210700183
2-Amino-3-metil-1-butanol	PBC	PSC	0,063	0,189	ns	0,210700183
2-Amino-3-metil-1-butanol	PFIC	PSC	0,674	0,674	ns	0,210700183
3-Hidroxiacetilglutarato	PBC	PFIC	0,008	0,047	*	0,056465097
3-Hidroxiacetilglutarato	Control	PBC	0,287	0,861	ns	0,056465097
3-Hidroxiacetilglutarato	Control	PFIC	0,072	0,288	ns	0,056465097
3-Hidroxiacetilglutarato	Control	PSC	0,605	1	ns	0,056465097
3-Hidroxiacetilglutarato	PBC	PSC	0,584	1	ns	0,056465097
3-Hidroxiacetilglutarato	PFIC	PSC	0,027	0,134	ns	0,056465097
4-Hidroxiacetilglicose	Control	PBC	1,29E-05	7,74E-05	****	-
4-Hidroxiacetilglicose	Control	PSC	0,002	0,009	**	-
4-Hidroxiacetilglicose	Control	PFIC	0,137	0,137	ns	-
4-Hidroxiacetilglicose	PBC	PFIC	3,04E-05	0,000152	***	-
4-Hidroxiacetilglicose	PBC	PSC	0,015	0,046	*	-
4-Hidroxiacetilglicose	PFIC	PSC	0,025	0,051	ns	-
4-Hidroxiprolina	Control	PBC	6,72E-11	4,03E-10	****	0,799765374
4-Hidroxiprolina	Control	PFIC	0,000148	0,000444	***	0,799765374
4-Hidroxiprolina	Control	PSC	5,88E-05	0,000235	***	0,799765374

TABELA VI. Relação de metabólitos identificados putativamente, juntamente com as análises estatísticas ao comparar as amostras de plasma dos grupos CBP, CEP e PFIC3 com CS. Os resultados incluem os valores de significância estatística ($p < 0,05$ e $q < 0,05$), bem como a influência da idade ($p < 0,05$) (continuação).

Metabólito	Grupo1	Grupo2	p Value ($P < 0,05$)	q Value ($q < 0,05$)	p,adj,signif	Idade ($p < 0,05$)
4-Hidroxiprolina	PBC	PFIC	2,26E-05	0,000113	***	0,799765374
4-Hidroxiprolina	PBC	PSC	0,026	0,051	ns	0,799765374
4-Hidroxiprolina	PFIC	PSC	0,157	0,157	ns	0,799765374
5-Hidroxidec-3-enoilcarnitina	PBC	PFIC	1,07E-09	6,42E-09	****	0,656018362
5-Hidroxidec-3-enoilcarnitina	PFIC	PSC	1,77E-07	8,85E-07	****	0,656018362
5-Hidroxidec-3-enoilcarnitina	Control	PBC	0,002	0,006	**	0,656018362
5-Hidroxidec-3-enoilcarnitina	Control	PFIC	0,000994	0,004	**	0,656018362
5-Hidroxidec-3-enoilcarnitina	Control	PSC	0,037	0,073	ns	0,656018362
5-Hidroxidec-3-enoilcarnitina	PBC	PSC	0,305	0,305	ns	0,656018362
Ácido 13-hidroperoxilinoico	Control	PBC	0,001	0,006	**	-
Ácido 13-hidroperoxilinoico	Control	PSC	0,003	0,014	*	-
Ácido 13-hidroperoxilinoico	Control	PFIC	0,519	1	ns	-
Ácido 13-hidroperoxilinoico	PBC	PFIC	0,006	0,025	*	-
Ácido 13-hidroperoxilinoico	PFIC	PSC	0,014	0,043	*	-
Ácido 13-hidroperoxilinoico	PBC	PSC	0,833	1	ns	-
APPA	Control	PFIC	0,001	0,006	**	0,63234037
APPA	PFIC	PSC	0,00005	0,0001	***	0,63234037
APPA	PBC	PSC	0,005	0,03	*	0,63234037
APPA	Control	PBC	0,048	0,193	ns	0,63234037
APPA	Control	PSC	0,887	0,887	ns	0,63234037
APPA	PBC	PFIC	0,196	0,392	ns	0,63234037
Ácido 2-Octenedióico	PBC	PFIC	7,43E-05	0,000446	***	0,374418723
Ácido 2-Octenedióico	Control	PBC	0,012	0,06	ns	0,374418723
Ácido 2-Octenedióico	Control	PFIC	0,529	1	ns	0,374418723
Ácido 2-Octenedióico	Control	PSC	0,869	1	ns	0,374418723
Ácido 2-Octenedióico	PBC	PSC	0,015	0,061	ns	0,374418723
Ácido 2-Octenedióico	PFIC	PSC	0,696	1	ns	0,374418723
Ácido 2-Oxo-4-metiltiobutanóico	Control	PBC	0,002	0,009	**	0,565216781
Ácido 2-Oxo-4-metiltiobutanóico	PBC	PFIC	0,000987	0,006	**	0,565216781
Ácido 2-Oxo-4-metiltiobutanóico	PBC	PSC	0,01	0,039	*	0,565216781
Ácido 2-Oxo-4-metiltiobutanóico	Control	PFIC	0,251	0,502	ns	0,565216781
Ácido 2-Oxo-4-metiltiobutanóico	Control	PSC	0,518	0,518	ns	0,565216781
Ácido 2-Oxo-4-metiltiobutanóico	PFIC	PSC	0,112	0,336	ns	0,565216781
Ácido 3,7-di-hidroxicolan-24-oico	Control	PBC	0,000874	0,005	**	-
Ácido 3,7-di-hidroxicolan-24-oico	Control	PFIC	0,005	0,025	*	-
Ácido 3,7-di-hidroxicolan-24-oico	Control	PSC	0,006	0,025	*	-
Ácido 3,7-di-hidroxicolan-24-oico	PBC	PFIC	0,239	0,522	ns	-
Ácido 3,7-di-hidroxicolan-24-oico	PBC	PSC	0,174	0,522	ns	-
Ácido 3,7-di-hidroxicolan-24-oico	PFIC	PSC	0,784	0,784	ns	-

TABELA VI. Relação de metabólitos identificados putativamente, juntamente com as análises estatísticas ao comparar as amostras de plasma dos grupos CBP, CEP e PFIC3 com CS. Os resultados incluem os valores de significância estatística ($p < 0,05$ e $q < 0,05$), bem como a influência da idade ($p < 0,05$) (continuação).

Metabólito	Grupo1	Grupo2	p Value ($P < 0,05$)	q Value ($q < 0,05$)	p,adj,signif	Idade ($p < 0,05$)
Ácido 3-hidroxi-2-metilglutárico	Control	PBC	0,000231	0,001	**	0,056465097
Ácido 3-hidroxi-2-metilglutárico	Control	PSC	0,003	0,016	*	0,056465097
Ácido 3-hidroxi-2-metilglutárico	PBC	PSC	0,56	0,56	ns	0,056465097
Ácido 3-hidroxi-2-metilglutárico	Control	PFIC	0,136	0,396	ns	0,056465097
Ácido 3-hidroxi-2-metilglutárico	PBC	PFIC	0,028	0,114	ns	0,056465097
Ácido 3-hidroxi-2-metilglutárico	PFIC	PSC	0,132	0,396	ns	0,056465097
Ácido 3-hidroxiadípico 3,6-lactona	Control	PBC	0,000219	0,001	**	0,127251961
Ácido 3-hidroxiadípico 3,6-lactona	Control	PSC	0,012	0,046	*	0,127251961
Ácido 3-hidroxiadípico 3,6-lactona	Control	PFIC	0,433	0,433	ns	0,127251961
Ácido 3-hidroxiadípico 3,6-lactona	PBC	PFIC	0,000841	0,004	**	0,127251961
Ácido 3-hidroxiadípico 3,6-lactona	PFIC	PSC	0,004	0,026	*	0,127251961
Ácido 3-hidroxiadípico 3,6-lactona	PBC	PSC	0,183	0,366	ns	0,127251961
Ácido 3-Hidroxihexanóico	Control	PBC	0,002	0,01	*	0,117845466
Ácido 3-Hidroxihexanóico	Control	PFIC	0,000932	0,006	**	0,117845466
Ácido 3-Hidroxihexanóico	Control	PSC	0,502	1	ns	0,117845466
Ácido 3-Hidroxihexanóico	PBC	PFIC	0,73	1	ns	0,117845466
Ácido 3-Hidroxihexanóico	PBC	PSC	0,025	0,092	ns	0,117845466
Ácido 3-Hidroxihexanóico	PFIC	PSC	0,023	0,092	ns	0,117845466
Ácido 3-Hidroxiisovalérico	Control	PBC	0,00048	0,003	**	0,080856504
Ácido 3-Hidroxiisovalérico	Control	PSC	0,139	0,278	ns	0,080856504
Ácido 3-Hidroxiisovalérico	PBC	PFIC	0,563	0,563	ns	0,080856504
Ácido 3-Hidroxiisovalérico	PBC	PSC	0,025	0,098	ns	0,080856504
Ácido 4-hidroxifenilpirúvico	Control	PSC	0,000878	0,005	**	0,077033789
Ácido 4-hidroxifenilpirúvico	PBC	PSC	0,002	0,008	**	0,077033789
Ácido 4-hidroxifenilpirúvico	Control	PBC	0,744	1	ns	0,077033789
Ácido 4-hidroxifenilpirúvico	Control	PFIC	0,886	1	ns	0,077033789
Ácido 4-hidroxifenilpirúvico	PBC	PFIC	0,939	1	ns	0,077033789
Ácido 4-hidroxifenilpirúvico	PFIC	PSC	0,059	0,237	ns	0,077033789
Ácido 9,10,16-triidroxihexadecanoico	Control	PFIC	0,000801	0,004	**	-
Ácido 9,10,16-triidroxihexadecanoico	PBC	PFIC	1,06E-06	6,36E-06	****	-
Ácido 9,10,16-triidroxihexadecanoico	PBC	PSC	0,009	0,035	*	-
Ácido 9,10,16-triidroxihexadecanoico	PFIC	PSC	0,009	0,035	*	-
Ácido 9,10,16-triidroxihexadecanoico	Control	PBC	0,094	0,187	ns	-
Ácido 9,10,16-triidroxihexadecanoico	Control	PSC	0,359	0,359	ns	-
Ácido Aspártico	Control	PBC	5,08E-05	0,000305	***	0,149604462
Ácido Aspártico	PBC	PSC	0,008	0,042	*	0,149604462
Ácido Aspártico	Control	PFIC	0,043	0,129	ns	0,149604462
Ácido Aspártico	Control	PSC	0,416	0,722	ns	0,149604462
Ácido Aspártico	PBC	PFIC	0,028	0,113	ns	0,149604462

TABELA VI. Relação de metabólitos identificados putativamente, juntamente com as análises estatísticas ao comparar as amostras de plasma dos grupos CBP, CEP e PFIC3 com CS. Os resultados incluem os valores de significância estatística ($p < 0,05$ e $q < 0,05$), bem como a influência da idade ($p < 0,05$) (continuação).

Metabólito	Grupo1	Grupo2	p Value ($P < 0,05$)	q Value ($q < 0,05$)	p,adj,signif	Idade ($p < 0,05$)
Ácido Aspártico	PFIC	PSC	0,361	0,722	ns	0,149604462
Ácido Colênico	Control	PBC	1,32E-05	7,92E-05	****	0,297568084
Ácido Colênico	Control	PFIC	0,002	0,011	*	0,297568084
Ácido Colênico	Control	PSC	0,087	0,25	ns	0,297568084
Ácido Colênico	PBC	PFIC	0,052	0,208	ns	0,297568084
Ácido Colênico	PBC	PSC	0,083	0,25	ns	0,297568084
Ácido Colênico	PFIC	PSC	0,57	0,57	ns	0,297568084
Ácido Glicocólico	Control	PBC	0,034	0,136	ns	0,161824359
Ácido Glicocólico	Control	PSC	0,0004	0,0026	**	0,161824359
Ácido Glicocólico	Control	PFIC	0,011	0,054	ns	0,161824359
Ácido Glicocólico	PBC	PFIC	0,637	0,637	ns	0,161824359
Ácido Glicocólico	PBC	PSC	0,049	0,147	ns	0,161824359
Ácido Glicocólico	PFIC	PSC	0,087	0,175	ns	0,161824359
Ácido Glicocólico 3-glicuronídeo	Control	PBC	1,50E-06	7,50E-06	****	0,766797136
Ácido Glicocólico 3-glicuronídeo	Control	PFIC	0,000179	0,000716	***	0,766797136
Ácido Glicocólico 3-glicuronídeo	Control	PSC	2,36E-08	1,42E-07	****	0,766797136
Ácido Glicocólico 3-glicuronídeo	PBC	PFIC	0,002	0,007	**	0,766797136
Ácido Glicocólico 3-glicuronídeo	PFIC	PSC	0,001	0,002	**	0,766797136
Ácido Glicocólico 3-glicuronídeo	PBC	PSC	0,988	0,988	ns	0,766797136
Ácido Glicodesoxicólico	Control	PBC	4,48E-09	2,69E-08	***	0,808175959
Ácido Glicodesoxicólico	Control	PFIC	3,60E-09	1,00E-08	***	0,808175959
Ácido Glicodesoxicólico	Control	PSC	2,42E-11	1,21E-10	****	0,808175959
Ácido Glicodesoxicólico	PFIC	PSC	0,005	0,014	*	0,808175959
Ácido Glicodesoxicólico	PBC	PFIC	0,0146	0,46	ns	0,808175959
Ácido Glicodesoxicólico	PBC	PSC	0,044	0,088	ns	0,808175959
Ácido Glicolitocólico	Control	PBC	9,43E-05	0,000566	***	0,589109265
Ácido Glicolitocólico	Control	PFIC	0,006	0,024	*	0,589109265
Ácido Glicolitocólico	Control	PSC	0,003	0,015	*	0,589109265
Ácido Glicolitocólico	PBC	PFIC	0,742	1	ns	0,589109265
Ácido Glicolitocólico	PBC	PSC	0,621	1	ns	0,589109265
Ácido Glicolitocólico	PFIC	PSC	0,48	1	ns	0,589109265
Ácido Glicolitocólico 3-sulfato	Control	PBC	8,15E-05	0,000408	***	0,209198245
Ácido Glicolitocólico 3-sulfato	Control	PSC	0,00002	0,00012	***	0,209198245
Ácido Glicolitocólico 3-sulfato	PBC	PFIC	0,228	0,456	ns	0,209198245
Ácido Glicolitocólico 3-sulfato	PBC	PSC	0,355	0,456	ns	0,209198245
Ácido Glicolitocólico 3-sulfato	PFIC	PSC	0,039	0,117	ns	0,209198245
Ácido Glicolitocólico a 3-sulfato	Control	PFIC	0,000243	0,000972	***	0,209198245
Ácido Glicoquenodesoxicólico	Control	PBC	8,11E-06	4,87E-05	****	-
Ácido Glicoquenodesoxicólico	Control	PFIC	5,97E-05	0,000239	***	-

TABELA VI. Relação de metabólitos identificados putativamente, juntamente com as análises estatísticas ao comparar as amostras de plasma dos grupos CBP, CEP e PFIC3 com CS. Os resultados incluem os valores de significância estatística ($p < 0,05$ e $q < 0,05$), bem como a influência da idade ($p < 0,05$) (continuação).

Metabólito	Grupo1	Grupo2	p Value ($P < 0,05$)	q Value ($q < 0,05$)	p,adj,signif	Idade ($p < 0,05$)
Ácido Glicoquenodesoxicólico	Control	PSC	1,54E-05	7,70E-05	****	-
Ácido Glicoquenodesoxicólico	PBC	PFIC	0,01	0,02	*	-
Ácido Glicoquenodesoxicólico	PFIC	PSC	0,004	0,011	*	-
Ácido Glicoquenodesoxicólico	PBC	PSC	0,446	0,6	ns	-
Ácido Glioxílico	Control	PBC	1,51E-07	7,55E-07	****	0,679118721
Ácido Glioxílico	Control	PFIC	1,62E-06	6,48E-06	****	0,679118721
Ácido Glioxílico	Control	PSC	5,04E-09	3,02E-08	****	0,679118721
Ácido Glioxílico	PBC	PFIC	0,303	0,606	ns	0,679118721
Ácido Glioxílico	PBC	PSC	0,875	0,875	ns	0,679118721
Ácido Glioxílico	PFIC	PSC	0,184	0,552	ns	0,679118721
Ácido Glutâmico	Control	PBC	1,41E-05	7,05E-05	****	0,259499778
Ácido Glutâmico	Control	PFIC	0,000155	0,00062	***	0,259499778
Ácido Glutâmico	Control	PSC	1,06E-06	6,36E-06	****	0,259499778
Ácido Glutâmico	PBC	PFIC	0,308	0,326	ns	0,259499778
Ácido Glutâmico	PBC	PSC	0,163	0,326	ns	0,259499778
Ácido Glutâmico	PFIC	PSC	0,021	0,063	ns	0,259499778
Ácido Láctico	Control	PSC	0,005	0,029	*	0,679118721
Ácido Láctico	Control	PBC	0,311	0,622	ns	0,679118721
Ácido Láctico	Control	PFIC	0,07	0,28	ns	0,679118721
Ácido Láctico	PBC	PFIC	0,423	0,622	ns	0,679118721
Ácido Láctico	PBC	PSC	0,047	0,236	ns	0,679118721
Ácido Láctico	PFIC	PSC	0,163	0,489	ns	0,679118721
Ácido Mevalônico	Control	PBC	0,0142	0,025	*	0,998974333
Ácido Mevalônico	PBC	PFIC	0,0451	0,226	ns	0,998974333
Ácido Mevalônico	Control	PFIC	0,043	0,174	ns	0,998974333
Ácido Mevalônico	Control	PSC	0,115	0,23	ns	0,998974333
Ácido Mevalônico	PBC	PSC	0,058	0,174	ns	0,998974333
Ácido Mevalônico	PFIC	PSC	0,69	0,69	ns	0,998974333
Ácido Palmitoléico	Control	PBC	2,37E-05	0,0001	***	0,29228905
Ácido Palmitoléico	Control	PFIC	0,00003	0,0013	**	0,29228905
Ácido Palmitoléico	Control	PSC	0,000015	0,00061	***	0,29228905
Ácido Palmitoléico	PBC	PFIC	0,548	1	ns	0,29228905
Ácido Palmitoléico	PBC	PSC	0,984	1	ns	0,29228905
Ácido Palmitoléico	PFIC	PSC	0,68	1	ns	0,29228905
Ácido Pipecólico	Control	PFIC	0,006	0,05	*	0,487973639
Ácido Pipecólico	Control	PSC	0,00581	0,03	*	0,487973639
Ácido Pipecólico	Control	PBC	0,04	0,16	ns	0,487973639
Ácido Pipecólico	PBC	PFIC	0,452	0,904	ns	0,487973639
Ácido Pipecólico	PBC	PSC	0,155	0,465	ns	0,487973639

TABELA VI. Relação de metabólitos identificados putativamente, juntamente com as análises estatísticas ao comparar as amostras de plasma dos grupos CBP, CEP e PFIC3 com CS. Os resultados incluem os valores de significância estatística ($p < 0,05$ e $q < 0,05$), bem como a influência da idade ($p < 0,05$) (continuação).

Metabólito	Grupo1	Grupo2	p Value ($P < 0,05$)	q Value ($q < 0,05$)	p,adj,signif	Idade ($p < 0,05$)
Ácido Pipecólico	PFIC	PSC	0,519	0,904	ns	0,487973639
Ácido Pirúvico	Control	PBC	0,000609	0,003	**	0,164432037
Ácido Pirúvico	Control	PFIC	0,000398	0,002	**	0,164432037
Ácido Pirúvico	Control	PSC	0,000659	0,003	**	0,164432037
Ácido Pirúvico	PBC	PFIC	0,728	1	ns	0,164432037
Ácido Pirúvico	PBC	PSC	0,927	1	ns	0,164432037
Ácido Pirúvico	PFIC	PSC	0,661	1	ns	0,164432037
Ácido Taurocólico	Control	PBC	0,0002	0,0009	***	-
Ácido Taurocólico	Control	PFIC	0,00001	0,000041	****	-
Ácido Taurocólico	Control	PSC	0,00006	0,00003	****	-
Ácido Taurocólico	PBC	PFIC	0,253	0,506	ns	-
Ácido Taurocólico	PBC	PSC	0,118	0,42	ns	-
Ácido Taurocólico	PFIC	PSC	0,855	0,855	ns	-
Ácido Taurodesoxicólico	Control	PBC	0,001	0,003	**	0,302569517
Ácido Taurodesoxicólico	Control	PFIC	0,00001	0,0001	***	0,302569517
Ácido Taurodesoxicólico	Control	PSC	0,000002	0,00005	****	0,302569517
Ácido Taurodesoxicólico	PBC	PFIC	0,37	0,37	ns	0,302569517
Ácido Taurodesoxicólico	PBC	PSC	0,05	0,2	ns	0,302569517
Ácido Taurodesoxicólico	PFIC	PSC	0,17	0,34	ns	0,302569517
Aconitato	Control	PBC	0,000184	0,001	**	0,270862952
Aconitato	Control	PFIC	0,01	0,05	*	0,270862952
Aconitato	Control	PSC	0,08	0,261	ns	0,270862952
Aconitato	PBC	PFIC	0,481	0,674	ns	0,270862952
Aconitato	PBC	PSC	0,065	0,261	ns	0,270862952
Aconitato	PFIC	PSC	0,337	0,674	ns	0,270862952
Alilcisteína	Control	PBC	1,67E-07	8,35E-07	****	0,656018362
Alilcisteína	Control	PFIC	8,91E-06	3,56E-05	****	0,656018362
Alilcisteína	Control	PSC	5,13E-08	3,08E-07	****	0,656018362
Alilcisteína	PBC	PFIC	0,067	0,133	ns	0,656018362
Alilcisteína	PBC	PSC	0,739	0,739	ns	0,656018362
Alilcisteína	PFIC	PSC	0,026	0,077	ns	0,656018362
Betaína	Control	PBC	0,003	0,017	*	0,443481872
Betaína	Control	PFIC	0,003	0,017	*	0,443481872
Betaína	Control	PSC	0,016	0,062	ns	0,443481872
Betaína	PBC	PFIC	0,791	1	ns	0,443481872
Betaína	PBC	PSC	0,602	1	ns	0,443481872
Betaína	PFIC	PSC	0,768	1	ns	0,443481872
β -galactosil	Control	PFIC	0,009	0,028	*	0,017301834
β -galactosil	Control	PSC	0,000861	0,003	**	0,017301834

TABELA VI, Relação de metabólitos identificados putativamente, juntamente com as análises estatísticas ao comparar as amostras de plasma dos grupos CBP, CEP e PFIC3 com CS. Os resultados incluem os valores de significância estatística ($p < 0,05$ e $q < 0,05$), bem como a influência da idade ($p < 0,05$) (continuação).

Metabólito	Grupo1	Grupo2	p Value ($P < 0,05$)	q Value ($q < 0,05$)	p,adj,signif	Idade ($p < 0,05$)
β -galactosil	PBC	PFIC	0,0312	0,051	ns	0,017301834
β -galactosil	PBC	PSC	4,94E-05	0,000296	***	0,017301834
β -galactosil	Control	PBC	0,122	0,244	ns	0,017301834
β -galactosil	PFIC	PSC	0,312	0,312	ns	0,017301834
Bilirrubina	Control	PSC	0,000683	0,003	**	0,991596335
Bilirrubina	PBC	PSC	4,24E-05	0,000254	***	0,991596335
Bilirrubina	PFIC	PSC	0,000395	0,002	**	0,991596335
Bilirrubina	Control	PBC	0,455	1	ns	0,991596335
Bilirrubina	Control	PFIC	0,926	1	ns	0,991596335
Bilirrubina	PBC	PFIC	0,347	1	ns	0,991596335
Carnitina	Control	PBC	8,08E-05	0,000485	***	0,500993014
Carnitina	Control	PFIC	8,45E-05	0,000485	***	0,500993014
Carnitina	PBC	PSC	0,009	0,037	*	0,500993014
Carnitina	Control	PSC	0,146	0,292	ns	0,500993014
Carnitina	PBC	PFIC	0,206	0,292	ns	0,500993014
Carnitina	PFIC	PSC	0,057	0,171	ns	0,500993014
Cistina	Control	PBC	5,86E-09	3,52E-08	****	0,003330661
Cistina	Control	PFIC	4,65E-06	2,33E-05	****	0,003330661
Cistina	Control	PSC	5,65E-06	2,33E-05	****	0,003330661
Cistina	PBC	PFIC	0,000207	0,000621	***	0,003330661
Cistina	PBC	PSC	0,000621	0,001	**	0,003330661
Cistina	PFIC	PSC	0,714	0,714	ns	0,003330661
Colina	Control	PBC	0,0020	0,01	**	0,293810074
Colina	Control	PFIC	0,0000	0,000145	***	0,293810074
Colina	Control	PSC	0,0000	3,12E-06	****	0,293810074
Colina	PBC	PFIC	0,0630	0,189	ns	0,293810074
Colina	PBC	PSC	0,0630	0,189	ns	0,293810074
Colina	PFIC	PSC	0,6740	0,674	ns	0,293810074
Creatinina	Control	PBC	6,14E-05	0,000368	***	0,243243854
Creatinina	Control	PFIC	0,044	0,175	ns	0,243243854
Creatinina	Control	PSC	0,105	0,315	ns	0,243243854
Creatinina	PBC	PFIC	0,735	0,735	ns	0,243243854
Creatinina	PBC	PSC	0,016	0,08	ns	0,243243854
Creatinina	PFIC	PSC	0,26	0,52	ns	0,243243854
DG(2:0/PGJ2)	Control	PBC	4,24E-06	0,00003	****	0,311258
DG(2:0/PGJ2)	PBC	PFIC	0,00005	0,00032	***	0,311258
DG(2:0/PGJ2)	PBC	PSC	0,000009	0,00002	****	0,311258
DG(2:0/PGJ2)	Control	PFIC	0,441	1	ns	0,311258
DG(2:0/PGJ2)	Control	PSC	0,794	1	ns	0,311258

TABELA VI. Relação de metabólitos identificados putativamente, juntamente com as análises estatísticas ao comparar as amostras de plasma dos grupos CBP, CEP e PFIC3 com CS. Os resultados incluem os valores de significância estatística ($p < 0,05$ e $q < 0,05$), bem como a influência da idade ($p < 0,05$) (continuação).

Metabólito	Grupo1	Grupo2	p Value ($P < 0,05$)	q Value ($q < 0,05$)	p,adj,signif	Idade ($p < 0,05$)
Dodecenoilcarnitina	Control	PBC	0,002	0,011	*	0,6791187
Dodecenoilcarnitina	PBC	PFIC	0,000299	0,002	**	0,6791187
Dodecenoilcarnitina	Control	PFIC	0,274	0,822	ns	0,6791187
Dodecenoilcarnitina	Control	PSC	0,66	1	ns	0,6791187
Dodecenoilcarnitina	PBC	PSC	0,073	0,292	ns	0,6791187
Dodecenoilcarnitina	PFIC	PSC	0,85	1	ns	0,6791187
Esfinganina	Control	PBC	0,008	0,031	*	-
Esfinganina	Control	PFIC	0,000984	0,006	**	-
Esfinganina	Control	PSC	0,001	0,007	**	-
Esfinganina	PBC	PFIC	0,584	1	ns	-
Esfinganina	PBC	PSC	0,636	1	ns	-
Esfinganina	PFIC	PSC	0,943	1	ns	-
Esfingosina 1-fosfato	PBC	PFIC	0,0008	0,0045	**	0,7201866
Esfingosina 1-fosfato	Control	PBC	0,758	1	ns	0,7201866
Esfingosina 1-fosfato	Control	PFIC	0,017	0,0487	*	0,7201866
Esfingosina 1-fosfato	Control	PSC	0,014	0,24	ns	0,7201866
Esfingosina 1-fosfato	PBC	PSC	0,106	0,424	ns	0,7201866
Esfingosina 1-fosfato	PFIC	PSC	0,958	1	ns	0,7201866
Estradiol	Control	PSC	0,006	0,038	*	0,5891093
Estradiol	Control	PBC	0,316	0,948	ns	0,5891093
Estradiol	Control	PFIC	0,839	0,948	ns	0,5891093
Estradiol	PBC	PFIC	0,371	0,948	ns	0,5891093
Estradiol	PBC	PSC	0,021	0,104	ns	0,5891093
Estradiol	PFIC	PSC	0,027	0,108	ns	0,5891093
Fenilalanina	PBC	PFIC	0,005	0,029	*	0,9759636
Fenilalanina	Control	PBC	0,055	0,277	ns	0,9759636
Fenilalanina	Control	PFIC	0,5	1	ns	0,9759636
Fenilalanina	Control	PSC	0,366	1	ns	0,9759636
Fenilalanina	PBC	PSC	0,059	0,277	ns	0,9759636
Fenilalanina	PFIC	PSC	0,598	1	ns	0,9759636
Galactose	Control	PBC	3,12E-06	1,87E-05	****	-
Galactose	Control	PFIC	1,78E-05	0,000089	****	-
Galactose	Control	PSC	0,000258	0,001	**	-
Galactose	PBC	PFIC	0,028	0,085	ns	-
Galactose	PBC	PSC	0,419	0,572	ns	-
Galactose	PFIC	PSC	0,286	0,572	ns	-
gamma-Glutamilfenilalanina	Control	PSC	0,008	0,047	*	0,111239741
gamma-Glutamilfenilalanina	PBC	PSC	0,01	0,048	*	0,111239741
gamma-Glutamilfenilalanina	Control	PBC	0,721	0,828	ns	0,111239741

TABELA VI. Relação de metabólitos identificados putativamente, juntamente com as análises estatísticas ao comparar as amostras de plasma dos grupos CBP, CEP e PFIC3 com CS. Os resultados incluem os valores de significância estatística ($p < 0,05$ e $q < 0,05$), bem como a influência da idade ($p < 0,05$) (continuação).

Metabólito	Grupo1	Grupo2	p Value ($P < 0,05$)	q Value ($q < 0,05$)	p.adj.signif	Idade ($p < 0,05$)
gamma-Glutamilfenilalanina	Control	PFIC	0,057	0,227	ns	0,111239741
gamma-Glutamilfenilalanina	PBC	PFIC	0,072	0,227	ns	0,111239741
gamma-Glutamilfenilalanina	PFIC	PSC	0,414	0,828	ns	0,111239741
Gamma-glutamilglicina	Control	PBC	0	0	****	0,032478544
Gamma-glutamilglicina	Control	PFIC	0	0	****	0,032478544
Gamma-glutamilglicina	Control	PSC	0,004	0,009	**	0,032478544
Gamma-glutamilglicina	PBC	PFIC	0,003	0,009	**	0,032478544
Gamma-glutamilglicina	PBC	PSC	0,0001	0,0003	***	0,032478544
Gamma-glutamilglicina	PFIC	PSC	0,121	0,121	ns	0,032478544
Glicilprolina	Control	PFIC	0,002	0,01	*	0,001233737
Glicilprolina	PFIC	PSC	0,003	0,014	*	0,001233737
Glicilprolina	Control	PBC	0,163	0,489	ns	0,001233737
Glicilprolina	Control	PSC	0,702	0,702	ns	0,001233737
Glicilprolina	PBC	PFIC	0,013	0,049	*	0,001233737
Glicilprolina	PBC	PSC	0,275	0,55	ns	0,001233737
Glucosamina	Control	PBC	0,000925	0,004	**	0,32998598
Glucosamina	PBC	PFIC	6,90E-06	4,14E-05	****	0,32998598
Glucosamina	PFIC	PSC	0,000431	0,002	**	0,32998598
Glucosamina	Control	PFIC	0,184	0,368	ns	0,32998598
Glucosamina	Control	PSC	0,017	0,052	ns	0,32998598
Glucosamina	PBC	PSC	0,448	0,448	ns	0,32998598
Glucose	PBC	PFIC	0,004	0,024	*	-
Glucose	Control	PBC	0,316	0,948	ns	-
Glucose	Control	PFIC	0,385	0,948	ns	-
Glucose	Control	PSC	0,665	0,948	ns	-
Glucose	PBC	PSC	0,075	0,374	ns	-
Glucose	PFIC	PSC	0,174	0,696	ns	-
Glutamina	PBC	PSC	0,002	0,011	*	0,285909035
Glutamina	Control	PBC	0,053	0,201	ns	0,285909035
Glutamina	Control	PFIC	0,291	0,582	ns	0,285909035
Glutamina	Control	PSC	0,05	0,201	ns	0,285909035
Glutamina	PBC	PFIC	0,481	0,582	ns	0,285909035
Glutamina	PFIC	PSC	0,011	0,054	ns	0,285909035
Hexa-2,4-dienedioylcarnitine	PBC	PFIC	0,009	0,045	*	0,297568084
Hexa-2,4-dienedioylcarnitine	PBC	PSC	0,000652	0,004	**	0,297568084
Hexa-2,4-dienedioylcarnitine	Control	PBC	0,112	0,448	ns	0,297568084
Hexa-2,4-dienedioylcarnitine	Control	PFIC	0,286	0,858	ns	0,297568084
Hexa-2,4-dienedioylcarnitine	Control	PSC	0,315	0,858	ns	0,297568084
Hexa-2,4-dienedioylcarnitine	PFIC	PSC	0,746	0,858	ns	0,297568084

TABELA VI. Relação de metabólitos identificados putativamente, juntamente com as análises estatísticas ao comparar as amostras de plasma dos grupos CBP, CEP e PFIC3 com CS. Os resultados incluem os valores de significância estatística ($p < 0,05$ e $q < 0,05$), bem como a influência da idade ($p < 0,05$) (continuação).

Metabólito	Grupo1	Grupo2	p Value ($P < 0,05$)	q Value ($q < 0,05$)	p.adj.signif	Idade ($p < 0,05$)
Hexanoilcarnitina	Control	PBC	0,00427	0,003	**	0,293810074
Hexanoilcarnitina	Control	PFIC	0,148	0,444	ns	0,293810074
Hexanoilcarnitina	Control	PSC	0,842	0,842	ns	0,293810074
Hexanoilcarnitina	PBC	PFIC	0,092	0,368	ns	0,293810074
Hexanoilcarnitina	PBC	PSC	0,041	0,207	ns	0,293810074
Hexanoilcarnitina	PFIC	PSC	0,387	0,774	ns	0,293810074
Hipurato	Control	PSC	0,000598	0,004	**	0,210700183
Hipurato	PBC	PSC	0,0003	0,0015	**	0,210700183
Hipurato	PFIC	PSC	0,00044	0,0062	**	0,210700183
Hipurato	Control	PBC	0,627	1	ns	0,210700183
Hipurato	Control	PFIC	0,986	1	ns	0,210700183
Hipurato	PBC	PFIC	0,78	1	ns	0,210700183
Histidilglicina	Control	PBC	0,0002	0,0004	***	0,149604462
Histidilglicina	Control	PFIC	0,323	0,646	ns	0,149604462
Histidilglicina	Control	PSC	0,00013	0,00066	***	0,149604462
Histidilglicina	PBC	PFIC	0,029	0,114	ns	0,149604462
Histidilglicina	PBC	PSC	0,956	0,956	ns	0,149604462
Histidilglicina	PFIC	PSC	0,071	0,214	ns	0,149604462
Histidina	Control	PBC	0,005	0,031	*	0,720186642
Histidina	Control	PFIC	0,245	1	ns	0,720186642
Histidina	Control	PSC	0,304	1	ns	0,720186642
Histidina	PBC	PFIC	0,419	1	ns	0,720186642
Histidina	PBC	PSC	0,621	1	ns	0,720186642
Histidina	PFIC	PSC	0,901	1	ns	0,720186642
Itaconato	Control	PBC	0,000506	0,003	*	0,284934663
Itaconato	Control	PFIC	0,027	0,134	ns	0,284934663
Itaconato	Control	PSC	0,077	0,306	ns	0,284934663
Itaconato	PBC	PFIC	0,416	0,832	ns	0,284934663
Itaconato	PBC	PSC	0,08	0,306	ns	0,284934663
Itaconato	PFIC	PSC	0,476	0,832	ns	0,284934663
Leucina	Control	PBC	8,29E-06	4,97E-05	****	0,00616953
Leucina	PBC	PFIC	0,0009	0,004	**	0,00616953
Leucina	Control	PFIC	0,294	0,882	ns	0,00616953
Leucina	Control	PSC	0,944	1	ns	0,00616953
Leucina	PBC	PSC	0,182	0,728	ns	0,00616953
Leucina	PFIC	PSC	0,692	1	ns	0,00616953
Linoleil Carnitina	Control	PSC	0,00967	0,06	*	0,243243854
Linoleil Carnitina	Control	PFIC	0,003	0,013	*	0,243243854
Linoleil Carnitina	Control	PBC	0,028	0,112	ns	0,243243854

TABELA VI. Relação de metabólitos identificados putativamente, juntamente com as análises estatísticas ao comparar as amostras de plasma dos grupos CBP, CEP e PFIC3 com CS. Os resultados incluem os valores de significância estatística ($p < 0,05$ e $q < 0,05$), bem como a influência da idade ($p < 0,05$) (continuação).

Metabólito	Grupo1	Grupo2	p Value ($P < 0,05$)	q Value ($q < 0,05$)	p.adj.signif	Idade ($p < 0,05$)
Linoleil Carnitina	PBC	PFIC	0,282	0,564	ns	0,243243854
Linoleil Carnitina	PBC	PSC	0,064	0,193	ns	0,243243854
Linoleil Carnitina	PFIC	PSC	0,0326	0,0564	ns	0,243243854
LPC(16:0)	Control	PBC	0,000254	0,02	*	0,998974333
LPC(16:0)	PBC	PSC	0,004	0,016	*	0,998974333
LPC(16:0)	Control	PFIC	0,173	0,519	ns	0,998974333
LPC(16:0)	Control	PSC	0,938	0,938	ns	0,998974333
LPC(16:0)	PBC	PFIC	0,024	0,117	ns	0,998974333
LPC(16:0)	PFIC	PSC	0,387	0,774	ns	0,998974333
LPC(18:0)	Control	PFIC	0,003	0,012	*	0,855548410
LPC(18:0)	Control	PSC	0,000459	0,003	**	0,855548410
LPC(18:0)	PBC	PFIC	0,004	0,012	*	0,855548410
LPC(18:0)	PBC	PSC	0,000672	0,003	**	0,8555484100
LPC(18:0)	Control	PBC	0,75	1	ns	0,855548410
LPC(18:0)	PFIC	PSC	0,56	1	ns	0,855548410
LPC(18:1)	Control	PBC	0,005	0,009	**	0,924291055
LPC(18:1)	PBC	PSC	0,00042	0,0007	***	0,924291055
LPC(18:1)	PBC	PFIC	0,009	0,045	*	0,924291055
LPC(18:1)	Control	PFIC	0,607	1	ns	0,924291055
LPC(18:1)	Control	PSC	0,343	1	ns	0,924291055
LPC(18:1)	PFIC	PSC	0,575	1	ns	0,924291055
Mevalonolactona	Control	PBC	9,80E-11	5,88E-10	****	0,40126354
Mevalonolactona	Control	PFIC	0,012	0,05	*	0,40126354
Mevalonolactona	PBC	PFIC	7,32E-06	3,66E-05	****	0,40126354
Mevalonolactona	Control	PSC	0,049	0,148	ns	0,40126354
Mevalonolactona	PBC	PSC	0,106	0,212	ns	0,40126354
Mevalonolactona	PFIC	PSC	0,528	0,528	ns	0,40126354
N-Acetilcarnitina	Control	PBC	2,05E-07	1,23E-06	****	0,270862952
N-Acetilcarnitina	Control	PFIC	0,004	0,015	*	0,270862952
N-Acetilcarnitina	Control	PSC	0,049	0,098	ns	0,270862952
N-Acetilcarnitina	PBC	PFIC	0,003	0,014	*	0,270862952
N-Acetilcarnitina	PBC	PSC	0,005	0,015	*	0,270862952
N-Acetilcarnitina	PFIC	PSC	0,752	0,752	ns	0,270862952
N-Acetil-glutamato	Control	PBC	1,94E-05	7,76E-05	****	0,732664398
N-Acetil-glutamato	Control	PFIC	3,49E-07	1,90E-06	****	0,732664398
N-Acetil-glutamato	Control	PSC	3,17E-07	1,90E-06	****	0,732664398
N-Acetil-glutamato	PBC	PFIC	0,817	1	ns	0,732664398
N-Acetil-glutamato	PBC	PSC	0,969	1	ns	0,732664398
N-Acetil-glutamato	PFIC	PSC	0,807	1	ns	0,732664398

TABELA VI. Relação de metabólitos identificados putativamente, juntamente com as análises estatísticas ao comparar as amostras de plasma dos grupos CBP, CEP e PFIC3 com CS. Os resultados incluem os valores de significância estatística ($p < 0,05$ e $q < 0,05$), bem como a influência da idade ($p < 0,05$) (continuação).

Metabólito	Grupo1	Grupo2	p Value ($P < 0,05$)	q Value ($q < 0,05$)	p.adj. signif	Idade ($p < 0,05$)
N-Eicosapentaenoil Leucina	Control	PBC	9,43E-05	0,000566	***	0,401263540
N-Eicosapentaenoil Leucina	Control	PFIC	0,00024	0,0006	***	0,401263540
N-Eicosapentaenoil Leucina	Control	PSC	0,00015	0,0003	***	0,401263540
N-Eicosapentaenoil Leucina	PBC	PFIC	0,742	1	ns	0,401263540
N-Eicosapentaenoil Leucina	PBC	PSC	0,621	1	ns	0,401263540
N-Eicosapentaenoil Leucina	PFIC	PSC	0,48	1	ns	0,401263540
N-Linoleoil Taurina	Control	PBC	0,00035	0,002	**	0,32998598
N-Linoleoil Taurina	Control	PSC	0,009	0,047	*	0,32998598
N-Linoleoil Taurina	Control	PSC	0,073	0,292	ns	0,32998598
N-Linoleoil Taurina	PBC	PFIC	0,246	0,738	ns	0,32998598
N-Linoleoil Taurina	PBC	PSC	0,29	0,738	ns	0,32998598
N-Linoleoil Taurina	PFIC	PSC	0,836	0,836	ns	0,32998598
N-methyl-beta-alanina	Control	PBC	2,12E-05	1,00E-04	***	-
N-methyl-beta-alanina	Control	PFIC	2,00E-05	1,00E-04	***	-
N-methyl-beta-alanina	Control	PSC	1,18E-06	7,08E-06	****	-
N-methyl-beta-alanina	PBC	PFIC	0,671	0,671	ns	-
N-methyl-beta-alanina	PBC	PSC	0,098	0,196	ns	-
N-methyl-beta-alanina	PFIC	PSC	0,039	0,118	ns	-
Nona-2,4,6-Trienoilcarnitina	Control	PFIC	0,008	0,041	*	0,359145239
Nona-2,4,6-Trienoilcarnitina	Control	PBC	0,345	0,69	ns	0,359145239
Nona-2,4,6-Trienoilcarnitina	Control	PFIC	0,037	0,146	ns	0,359145239
Nona-2,4,6-Trienoilcarnitina	Control	PSC	0,078	0,234	ns	0,359145239
Nona-2,4,6-Trienoilcarnitina	PFIC	PSC	0,827	0,827	ns	0,359145239
Nona-2,4,6-Trienoilcarnitina	PBC	PFIC	0,002	0,13	ns	0,359145239
PC(16:0/16:0)	Control	PBC	3,25E-05	0,000162	***	0,265485947
PC(16:0/16:0)	Control	PFIC	8,15E-05	0,000326	***	0,265485947
PC(16:0/16:0)	Control	PSC	2,30E-06	1,38E-05	****	0,265485947
PC(16:0/16:0)	PBC	PFIC	0,947	0,947	ns	0,265485947
PC(16:0/16:0)	PBC	PSC	0,218	0,639	ns	0,265485947
PC(16:0/16:0)	PFIC	PSC	0,213	0,639	ns	0,265485947
Palmitoleic acid	Control	PBC	2,37E-05	0,0001	***	0,29228905
Palmitoleic acid	Control	PFIC	0,00003	0,0013	**	0,29228905
Palmitoleic acid	Control	PSC	0,000015	0,00061	***	0,29228905
Palmitoleic acid	PBC	PFIC	0,548	1	ns	0,29228905
Palmitoleic acid	PBC	PSC	0,984	1	ns	0,29228905
Palmitoleic acid	PFIC	PSC	0,68	1	ns	0,29228905
Propanoato de 4-metoxibenzoíla	Control	PFIC	0,004	0,015	*	0,975963624
Propanoato de 4-metoxibenzoíla	PBC	PFIC	9,94E-05	0,000596	***	0,975963624
Propanoato de 4-metoxibenzoíla	PBC	PSC	0,001	0,006	**	0,975963624

TABELA VI. Relação de metabólitos identificados putativamente, juntamente com as análises estatísticas ao comparar as amostras de plasma dos grupos CBP, CEP e PFIC3 com CS. Os resultados incluem os valores de significância estatística ($p < 0,05$ e $q < 0,05$), bem como a influência da idade ($p < 0,05$) (continuação).

Metabólito	Grupo1	Grupo2	p Value ($P < 0,05$)	q Value ($q < 0,05$)	p.adj.signif	Idade ($p < 0,05$)
Propanoato de 4-metoxibenzoíla	Control	PBC	0,216	0,432	ns	0,975963624
Propanoato de 4-metoxibenzoíla	Control	PSC	0,043	0,129	ns	0,975963624
Propanoato de 4-metoxibenzoíla	PFIC	PSC	0,245	0,432	ns	0,975963624
Propionilcarnitina	Control	PBC	4,99E-05	0,000299	***	0,971326006
Propionilcarnitina	PBC	PFIC	0,000962	0,004	**	0,971326006
Propionilcarnitina	PBC	PSC	0,000428	0,002	**	0,971326006
Propionilcarnitina	Control	PFIC	0,192	0,576	ns	0,971326006
Propionilcarnitina	Control	PSC	0,747	0,848	ns	0,971326006
Propionilcarnitina	PFIC	PSC	0,424	0,848	ns	0,971326006
Sedoheptulose 7-fosfato	PBC	PSC	0,005	0,028	*	-
Sedoheptulose 7-fosfato	Control	PBC	0,138	0,552	ns	-
Sedoheptulose 7-fosfato	Control	PFIC	0,14	0,552	ns	-
Sedoheptulose 7-fosfato	Control	PSC	0,31	0,62	ns	-
Sedoheptulose 7-fosfato	PBC	PFIC	0,665	0,665	ns	-
Sedoheptulose 7-fosfato	PFIC	PSC	0,019	0,093	ns	-
SM(d16:1/17:0)	Control	PBC	0,005	0,019	*	0,209198245
SM(d16:1/17:0)	Control	PFIC	5,76E-06	3,46E-05	***	0,209198245
SM(d16:1/17:0)	Control	PSC	0,000507	0,00753	**	0,209198245
SM(d16:1/17:0)	PBC	PFIC	0,006	0,019	*	0,209198245
SM(d16:1/17:0)	PBC	PSC	0,414	0,414	ns	0,209198245
SM(d16:1/17:0)	PFIC	PSC	0,029	0,058	ns	0,58632992
Suberato	Control	PFIC	0,0007	0,0038	**	0,58632992
Suberato	PBC	PFIC	0,0006	0,0038	**	0,58632992
Suberato	Control	PBC	0,779	0,779	ns	0,58632992
Suberato	Control	PSC	0,068	0,273	ns	0,58632992
Suberato	PBC	PSC	0,078	0,273	ns	0,58632992
Suberato	PFIC	PSC	0,354	0,708	ns	0,58632992
Sulfato de Dehidroepiandrosterona	Control	PBC	1,98E-09	1,19E-08	****	0,03789524
Sulfato de Dehidroepiandrosterona	Control	PSC	0,001	0,005	**	0,03789524
Sulfato de Dehidroepiandrosterona	PBC	PFIC	6,73E-05	0,000336	***	0,03789524
Sulfato de Dehidroepiandrosterona	Control	PFIC	0,026	0,052	ns	0,03789524
Sulfato de Dehidroepiandrosterona	PBC	PSC	0,017	0,051	ns	0,03789524
Sulfato de Dehidroepiandrosterona	PFIC	PSC	0,237	0,237	ns	0,03789524
Sulfato de p-Cresol	Control	PSC	0,00008	0,0004	***	0,555129854
Sulfato de p-Cresol	PFIC	PSC	0,00006	0,00036	***	0,555129854
Sulfato de p-Cresol	PBC	PSC	0,000014	0,00048	***	0,555129854
Sulfato de p-Cresol	Control	PBC	0,615	1	ns	0,555129854
Sulfato de p-Cresol	Control	PFIC	0,698	1	ns	0,555129854
Sulfato de p-Cresol	PBC	PFIC	0,39	1	ns	0,555129854

TABELA VI. Relação de metabólitos identificados putativamente, juntamente com as análises estatísticas ao comparar as amostras de plasma dos grupos CBP, CEP e PFIC3 com CS. Os resultados incluem os valores de significância estatística ($p < 0,05$ e $q < 0,05$), bem como a influência da idade ($p < 0,05$) (continuação).

Metabólito	Grupo1	Grupo2	p Value ($P < 0,05$)	q Value ($q < 0,05$)	p.adj.signif	Idade ($p < 0,05$)
Sulfóxido Butilcisteína	Control	PBC	3,14E-07	1,88E-06	****	-
Sulfóxido Butilcisteína	Control	PFIC	0,000466	0,001	**	-
Sulfóxido Butilcisteína	Control	PSC	5,85E-05	0,000292	***	-
Sulfóxido Butilcisteína	PBC	PFIC	0,00123	0,00492	**	-
Sulfóxido Butilcisteína	PBC	PSC	0,12	0,24	ns	-
Sulfóxido Butilcisteína	PFIC	PSC	0,157	0,24	ns	-
Sulfóxido de Metionina	Control	PBC	0,000504	0,00302	**	0,60075066
Sulfóxido de Metionina	Control	PFIC	0,00215	0,01	*	0,60075066
Sulfóxido de Metionina	Control	PSC	0,01	0,04	*	0,60075066
Sulfóxido de Metionina	PBC	PFIC	0,096	0,241	ns	0,60075066
Sulfóxido de Metionina	PBC	PSC	0,08	0,241	ns	0,60075066
Sulfóxido de Metionina	PFIC	PSC	0,596	0,596	ns	0,60075066
Tirosine	Control	PBC	0,003	0,019	*	0,983445946
Tirosine	Control	PFIC	0,461	1	ns	0,983445946
Tirosine	Control	PSC	0,829	1	ns	0,983445946
Tirosine	PBC	PFIC	0,104	0,416	ns	0,983445946
Tirosine	PBC	PSC	0,019	0,097	ns	0,983445946
Tirosine	PFIC	PSC	0,423	1	ns	0,983445946
Tridec-6-enedioilcarnitina	Control	PFIC	0,011	0,044	*	0,111239741
Tridec-6-enedioilcarnitina	Control	PSC	0,0018	0,0055	**	0,111239741
Tridec-6-enedioilcarnitina	PBC	PSC	0,000397	0,002	**	0,111239741
Tridec-6-enedioilcarnitina	PBC	PFIC	0,003	0,007	**	0,111239741
Tridec-6-enedioilcarnitina	Control	PBC	0,13	0,26	ns	0,111239741
Tridec-6-enedioilcarnitina	PFIC	PSC	0,362	0,362	ns	0,111239741
Triptofano	Control	PBC	1,96E-05	0,000118	***	0,476879874
Triptofano	PBC	PFIC	0,000489	0,002	**	0,476879874
Triptofano	PBC	PSC	0,0089	0,02	*	0,476879874
Triptofano	Control	PFIC	0,784	0,784	ns	0,476879874
Triptofano	Control	PSC	0,139	0,417	ns	0,476879874
Triptofano	PFIC	PSC	0,26	0,52	ns	0,476879874
Uridina	Control	PSC	0,000356	0,002	**	0,468573552
Uridina	Control	PBC	0,014	0,069	ns	0,468573552
Uridina	Control	PFIC	0,254	0,564	ns	0,468573552
Uridina	PBC	PFIC	0,486	0,564	ns	0,468573552
Uridina	PBC	PSC	0,188	0,564	ns	0,468573552
Uridina	PFIC	PSC	0,078	0,313	ns	0,468573552
Urocanato	Control	PFIC	0,002	0,01	**	0,589109265
Urocanato	PBC	PFIC	0,000529	0,003	**	0,589109265
Urocanato	PFIC	PSC	0,000141	0,000846	***	0,589109265

TABELA VI. Relação de metabólitos identificados putativamente, juntamente com as análises estatísticas ao comparar as amostras de plasma dos grupos CBP, CEP e PFIC3 com CS. Os resultados incluem os valores de significância estatística ($p < 0,05$ e $q < 0,05$), bem como a influência da idade ($p < 0,05$).

Metabólito	Grupo1	Grupo2	<i>p Value</i> ($P < 0,05$)	<i>q Value</i> ($q < 0,05$)	<i>p.adj.signif</i>	Idade ($p < 0,05$)
Urocanato	Control	PBC	0,344	0,688	ns	0,589109265
Urocanato	Control	PSC	0,118	0,354	ns	0,589109265
Urocanato	PBC	PSC	0,669	0,688	ns	0,589109265
Valina	Control	PBC	0,0003	0,0019	**	0,535462536
Valina	Control	PSC	0,0011	0,002	**	0,535462536
Valina	Control	PFIC	0,035	0,14	ns	0,535462536
Valina	PBC	PFIC	0,273	0,819	ns	0,535462536
Valina	PBC	PSC	0,779	0,888	ns	0,535462536
Valina	PFIC	PSC	0,444	0,888	ns	0,535462536

TABELA VII. Relação de metabólitos identificados putativamente em amostras de urina de CBP, CEP e PFIC3, obtidos das análises por LC-HRMS em RPLC e HILIC, nos modos de ionização (ESI +/-) (*continuação*).

Metabólito	(m/z)	Adutos	Modo de Eluição	ID	Score	Score (Frag)	Erro (ppm)
3-metilhistamina	126,1023	[M+H] ⁺	HILIC (+)	HMDB0001861	44,6	27,5	-2,41
1,2-ciclohexanodiol	161,0819	[M+FA-H] ⁻	RPLC (-)	HMDB0244061	41,9	12,4	-0,38
1,7-Dimetilguanosina	310,1162	[M-H] ⁻	HILIC (-)	HMDB0001961	39,1	12,5	-1,25
2,3-Dipalmitoil-glicerilcisteína	672,5245	[M+H] ⁺	RPLC (+)	HMDB0256098	47,1	45,5	2,07
2,3-DMHG	157,0509	[M-H ₂ O-H] ⁻	RPLC (-)	HMDB0002025	47,2	39,2	1,67
2,6-Dimetilheptanoil carnitina	302,2325	[M+H] ⁺	RPLC (+)	HMDB0006320	54,1	72	-0,13
3-HD-DCAR	310,201	[M+H-H ₂ O] ⁺	HILIC (+)	HMDB0241111	50,1	54,2	-0,76
4-Octenoilcarnitina	286,2011	[M+H] ⁺	HILIC (+)	HMDB0241701	50,5	55,9	-0,71
5-Aminovalerato	100,0755	[M+H-H ₂ O] ⁺	HILIC (+)	HMDB0003355	46,8	36,6	-1,56
5-CAT	436,3418	[M+ACN+H] ⁺	RPLC (+)	LMST04010302	41,4	14,8	-0,94
5-Hidroxivalerato	117,0557	[M-H] ⁻	RPLC (-)	LMFA01050010	48,8	44,2	0,14
6-Hidroxinicotinamida	139,05	[M+H] ⁺	HILIC (+)	HMDB0247081	45,3	28,8	-1,39
Ácido 2-octenodióico	171,0662	[M-H] ⁻	HILIC (-)	HMDB0000341	38,4	1,29	-0,66
Ácido 3-Hidroxibutírico	146,081	[M+ACN+H] ⁺	HILIC (+)	HMDB0000011	44,6	29,8	-1,32
Ácido 3-hidroxihipúrico	194,046	[M-H] ⁻	RPLC (-)	HMDB0006116	53,5	70,8	0,84
Ácido 4-hidroxihipúrico	194,0456	[M-H] ⁻	RPLC (-)	HMDB13678	46,4	65,6	2,7
Ácido glicurônico sulfatado	254,9817	[M-H ₂ O-H] ⁻	RPLC (-)	HMDB0252795	50,3	53,7	0,37
Ácido Hippurico	180,066	[M+H] ⁺	HILIC (+)	HMDB0000714	45,9	31,8	1,07
Alisina	146,0809	[M+H] ⁺	RPLC (+)	HMDB0001268	44,4	25,4	-1,82
Citraconato	129,0193	[M-H] ⁻	HILIC (-)	HMDB0002092	39,6	72,9	0,08
DG(2:0/PGJ2)	449,2543	[M-H] ⁻	RPLC (-)	HMDB0296921	40,7	7,58	-0,48
DH-CDCA	391,2835	[M+H] ⁺	RPLC (+)	HMDB0000432	34,8	0,1	-2
DMTPA	177,0227	[M-H] ⁻	RPLC (-)	HMDB0240388	42,1	12	0,28
Eritrose	119,0351	[M-H] ⁻	RPLC (-)	HMDB0002649	45,2	27,6	1,2
Fenilacetilglutamina	265,1188	[M+H] ⁺	HILIC (+)	HMDB0006344	50,5	58	1,63
Fenilalanina	164,0718	[M-H] ⁻	RPLC (-)	HMDB0000159	43	16,2	0,78
GCDCA 3-sulfato	528,2652	[M-H] ⁻	RPLC (-)	HMDB0002497	43,6	28	2,92
GLCA 3 - sulfato	512,2695	[M-H] ⁻	RPLC (-)	HMDB0002639	48,9	49,1	1,55
Glucosilgalactosil hidroxilisina	487,2129	[M+H] ⁺	HILIC (+)	HMDB0000585	46,3	34,2	-0,84
Hepta-2,4-dienoilcarnitina	250,1451	[M-H ₂ O-H] ⁻	RPLC (-)	HMDB0241690	44,1	22,6	0,95
Histidina	154,062	[M-H] ⁻	HILIC (-)	HMDB0000176	39,5	5,4	-1,41
N-Acetilglicosamina	186,0757	[M+H-H ₂ O] ⁺	HILIC (+)	HMDB0000215	46	33,5	-1,87
N-Acetilvalina	160,097	[M+H] ⁺	HILIC (+)	HMDB0011757	43,9	24,4	-1,88
N-Alfa-acetilisina	189,1231	[M+H] ⁺	HILIC (+)	HMDB0000446	46,4	40,3	-1,18
N-Eicosapentaenoil Aspartato	398,2334	[M-H ₂ O-H] ⁻	RPLC (-)	HMDB0242067	46,6	35,1	-0,63
N-Eicosapentaenoyl Leucine	416,3162	[M+H] ⁺	RPLC (+)	HMDB0242074	41,5	11,8	-1,35
Neomenthol-glucuronide	331,1768	[M-H] ⁻	RPLC (-)	HMDB0060012	44,9	28,6	1,63
o-Adipoylcarnitine	290,1594	[M+H] ⁺	RPLC (+)	HMDB0061677	48,8	47,3	-1,55

TABELA VII. Relação de metabólitos identificados putativamente em amostras de urina de CBP, CEP e PFIC3, obtidos das análises por LC-HRMS em RPLC e HILIC, nos modos de ionização (ESI +/-).

Metabólito	(m/z)	Adutos	Modo de Eluição	ID	Score	Score (Frag)	Erro (ppm)
o-Adipoylcarnitine	290,1594	[M+H] ⁺	RPLC (+)	HMDB0061677	48,8	47,3	-1,55
O-Sulfotyrosine	242,0127	[M-H ₂ O-H] ⁻	RPLC (-)	HMDB0155722	46,3	34,6	-0,6
Prolina	116,0704	[M+H] ⁺	HILIC (+)	RP001702	50,7	56,4	-1,41
Serina	106,0497	[M+H] ⁺	HILIC (+)	HMDB0003406	40,4	6,44	-1,54
Suberato	173,0821	[M-H] ⁻	RPLC (-)	HMDB0000893	48,6	45,5	1,21
sulfato de p-Cresol	187,0077	[M-H] ⁻	RPLC (-)	HMDB0011635	47,5	43,9	3,39
THFDA	187,0614	[M-H] ⁻	RPLC (-)	HMDB0059767	48,2	43,6	0,89
Tirosina	182,0809	[M+H] ⁺	RPLC (+)	HMDB0000158	62,7	88,01	0,16
TMA	158,1536	[M+H] ⁺	RPLC (+)	HMDB0245344	40,7	6,65	-1,98
Triptofano 2-C-manosídeo	367,1495	[M+H] ⁺	RPLC (+)	HMDB0240296	52,9	66,4	-1,44
Urocanato	139,0503	[M+H] ⁺	HILIC (+)	HMDB0000301	45,8	32	-1,73
3-metilhistamina	126,1023	[M+H] ⁺	HILIC (+)	HMDB0001861	44,6	27,5	-2,41

TABELA VIII. Tabela de metabólitos identificados, juntamente com as análises estatísticas ao comparar as amostras de urina dos grupos CBP, CEP, PFIC3 e CS. Os resultados incluem os valores de significância estatística ($p < 0,05$ e $q < 0,05$), bem como a influência da idade ($p < 0,05$) (continuação).

Metabólito	Grupo1	Grupo2	p-value ($p < 0,05$)	q-value ($q < 0,05$)	p.adj.signif	Idade ($p < 0,05$)
3-Metilhistamina	Control	PSC	0	5,00E-04	***	-
3-Metilhistamina	Control	PBC	0	6,00E-04	***	-
3-Metilhistamina	Control	PFIC	0	2,00E-04	***	-
3-Metilhistamina	PBC	PFIC	0,6	1	ns	-
3-Metilhistamina	PBC	PSC	0,7	1	ns	-
3-Metilhistamina	PFIC	PSC	0,9	1	ns	-
1,2-Ciclohexanodiol	Control	PSC	0,9	0,874	ns	0,015567
1,2-Ciclohexanodiol	Control	PFIC	0,1	0,274	ns	0,015567
1,2-Ciclohexanodiol	PFIC	PSC	0,2	0,45	ns	0,015567
1,2-Ciclohexanodiol	Control	PBC	0	4,00E-04	***	0,015567
1,2-Ciclohexanodiol	PBC	PFIC	0	0,046	*	0,015567
1,2-Ciclohexanodiol	PBC	PSC	0	0,012	*	0,015567
1,7-Dimetilguanosina	PBC	PSC	0	0,007	**	0,05555
1,7-Dimetilguanosina	PFIC	PSC	0	0,038	*	0,05555
1,7-Dimetilguanosina	Control	PBC	0,8	0,888	ns	0,05555
1,7-Dimetilguanosina	Control	PFIC	0,3	0,888	ns	0,05555
1,7-Dimetilguanosina	PBC	PFIC	0,3	0,888	ns	0,05555
1,7-Dimetilguanosina	Control	PSC	0	0,007	**	0,05555
2,2,6,6-Tetrametil-4-piperidinol	Control	PSC	0,7	1	ns	0,735062
2,2,6,6-Tetrametil-4-piperidinol	Control	PBC	0,6	1	ns	0,735062
2,2,6,6-Tetrametil-4-piperidinol	PBC	PFIC	0	0,114	ns	0,735062
2,2,6,6-Tetrametil-4-piperidinol	PBC	PSC	0	0,102	ns	0,735062
2,2,6,6-Tetrametil-4-piperidinol	PFIC	PSC	0	1,00E-04	***	0,735062
2,2,6,6-Tetrametil-4-piperidinol	Control	PFIC	0	0,018	*	0,735062
2,3-Dipalmitoil-glicerilcisteína	Control	PSC	0,4	0,806	ns	0,335579
2,3-Dipalmitoil-glicerilcisteína	Control	PFIC	0,1	0,351	ns	0,335579
2,3-Dipalmitoil-glicerilcisteína	PFIC	PSC	0,4	0,806	ns	0,335579
2,3-Dipalmitoil-glicerilcisteína	Control	PBC	0	0,035	*	0,335579
2,3-Dipalmitoil-glicerilcisteína	PBC	PFIC	0	6,00E-04	***	0,335579
2,3-Dipalmitoil-glicerilcisteína	PBC	PSC	0	0,002	**	0,335579
2,6-Dimetilheptanoil carnitina	Control	PSC	0,6	0,623	ns	-
2,6-Dimetilheptanoil carnitina	Control	PBC	0	0,009	**	-
2,6-Dimetilheptanoil carnitina	Control	PFIC	0	5,00E-04	***	-
2,6-Dimetilheptanoil carnitina	PBC	PFIC	0	2,00E-05	****	-
2,6-Dimetilheptanoil carnitina	PFIC	PSC	0	0,005	**	-
2,6-Dimetilheptanoil carnitina	PBC	PSC	0	0,009	**	-
3-Hidroxideca-6,8-dienoilcarnitina	PBC	PFIC	0,1	0,155	ns	0,11535
3-Hidroxideca-6,8-dienoilcarnitina	PBC	PSC	0,1	0,155	ns	0,11535
3-Hidroxideca-6,8-dienoilcarnitina	PFIC	PSC	0,8	0,82	ns	0,11535
3-Hidroxideca-6,8-dienoilcarnitina	Control	PSC	0	2,00E-04	***	0,11535

TABELA VIII. Tabela de metabólitos identificados, juntamente com as análises estatísticas ao comparar as amostras de urina dos grupos CBP, CEP, PFIC3 e CS. Os resultados incluem os valores de significância estatística ($p < 0,05$ e $q < 0,05$), bem como a influência da idade ($p < 0,05$) (continuação).

Metabólito	Grupo1	Grupo2	p-value ($p < 0,05$)	q-value ($q < 0,05$)	p.adj.signf	Idade ($p < 0,05$)
3-Hidroxideca-6,8-dienoilcarnitina	Control	PBC	0	2,00E-05	****	0,11535
3-Hidroxideca-6,8-dienoilcarnitina	Control	PFIC	0	2,00E-04	***	0,11535
4-Octenoilcarnitina	PBC	PSC	0	0,059	ns	0,255299
4-Octenoilcarnitina	PFIC	PSC	0,8	0,811	ns	0,255299
4-Octenoilcarnitina	Control	PSC	0	4,00E-04	***	0,255299
4-Octenoilcarnitina	Control	PBC	0	8,00E-06	****	0,255299
4-Octenoilcarnitina	Control	PFIC	0	2,00E-04	***	0,255299
4-Octenoilcarnitina	PBC	PFIC	0	0,024	*	0,255299
5-Aminovalerato	Control	PFIC	###	5,00E-06	****	0,208114
5-Aminovalerato	Control	PSC	0	4,00E-04	***	0,208114
5-Aminovalerato	Control	PBC	###	1,00E-06	****	0,208114
5-Aminovalerato	PBC	PFIC	0,2	0,594	ns	0,208114
5-Aminovalerato	PBC	PSC	0,5	0,79	ns	0,208114
5-Aminovalerato	PFIC	PSC	0,4	0,79	ns	0,208114
5-Hidroxivalerato	Control	PSC	0	0,081	ns	0,042066
5-Hidroxivalerato	Control	PFIC	0	0,081	ns	0,042066
5-Hidroxivalerato	PFIC	PSC	0,9	0,916	ns	0,042066
5-Hidroxivalerato	Control	PBC	0	1,00E-04	***	0,042066
5-Hidroxivalerato	PBC	PFIC	0	0,021	*	0,042066
5-Hidroxivalerato	PBC	PSC	0	0,005	**	0,042066
5 β -Colano-3 α ,7 α ,12 α ,24-tetrol	Control	PSC	0,5	1	ns	0,03516
5 β -Colano-3 α ,7 α ,12 α ,24-tetrol	Control	PBC	0,5	1	ns	0,03516
5 β -Colano-3 α ,7 α ,12 α ,24-tetrol	Control	PFIC	0	0,044	*	0,03516
5 β -Colano-3 α ,7 α ,12 α ,24-tetrol	PBC	PFIC	0	1,00E-04	****	0,03516
5 β -Colano-3 α ,7 α ,12 α ,24-tetrol	PBC	PSC	0,1	0,3	ns	0,03516
5 β -Colano-3 α ,7 α ,12 α ,24-tetrol	PFIC	PSC	0	0,044	*	0,03516
6-Hidroxinicotinamida	PBC	PFIC	0,4	0,525	ns	0,453427
6-Hidroxinicotinamida	PBC	PSC	0,1	0,111	ns	0,453427
6-Hidroxinicotinamida	PFIC	PSC	0,2	0,259	ns	0,453427
6-Hidroxinicotinamida	Control	PSC	0	2,00E-06	****	0,453427
6-Hidroxinicotinamida	Control	PFIC	0	3,00E-05	****	0,453427
6-Hidroxinicotinamida	Control	PBC	0	0,002	**	0,453427
Ácido 2,3-di-hidroxi-5-metiltio-4-pentenóico	Control	PBC	0,2	0,456	ns	0,263143
Ácido 2,3-di-hidroxi-5-metiltio-4-pentenóico	Control	PFIC	0	0,069	ns	0,263143
Ácido 2,3-di-hidroxi-5-metiltio-4-pentenóico	PBC	PFIC	0,2	0,456	ns	0,263143
Ácido 2,3-di-hidroxi-5-metiltio-4-pentenóico	PFIC	PSC	0,2	0,456	ns	0,263143
Ácido 2,3-di-hidroxi-5-metiltio-4-pentenóico	Control	PSC	0	0,01	*	0,263143

TABELA VIII. Tabela de metabólitos identificados, juntamente com as análises estatísticas ao comparar as amostras de urina dos grupos CBP, CEP, PFIC3 e CS. Os resultados incluem os valores de significância estatística ($p < 0,05$ e $q < 0,05$), bem como a influência da idade ($p < 0,05$) (continuação).

Metabólito	Grupo1	Grupo2	p-value ($p < 0,05$)	q-value ($q < 0,05$)	p.adj.signif	Idade ($p < 0,05$)
Ácido 2,3-di-hidroxi-5-metiltio-4-pentenóico	PBC	PSC	0	0,025	*	0,263143
Ácido 2,3-dimetil-3-hidroxi-glutárico	Control	PFIC	0,8	1	ns	0,924795
Ácido 2,3-dimetil-3-hidroxi-glutárico	Control	PSC	0	0,022	*	0,924795
Ácido 2,3-dimetil-3-hidroxi-glutárico	PBC	PSC	0	0,005	**	0,924795
Ácido 2,3-dimetil-3-hidroxi-glutárico	PFIC	PSC	0	0,025	*	0,924795
Ácido 2,3-dimetil-3-hidroxi-glutárico	Control	PBC	0,4	1	ns	0,924795
Ácido 2,3-dimetil-3-hidroxi-glutárico	PBC	PFIC	0,7	1	ns	0,924795
Ácido 2-octenodióico	Control	PSC	0,9	1	ns	0,838408
Ácido 2-octenodióico	Control	PFIC	0,5	1	ns	0,838408
Ácido 2-octenodióico	PBC	PSC	0	0,061	ns	0,838408
Ácido 2-octenodióico	PFIC	PSC	0,7	1	ns	0,838408
Ácido 2-octenodióico	PBC	PFIC	0	0,002	**	0,838408
Ácido 2-octenodióico	Control	PBC	0	0,008	**	0,838408
Ácido 3-Hidroxibutírico	Control	PSC	0	8,00E-12	****	0,101539
Ácido 3-Hidroxibutírico	Control	PBC	0	6,00E-10	****	0,101539
Ácido 3-Hidroxibutírico	Control	PFIC	0	3,00E-11	****	0,101539
Ácido 3-Hidroxibutírico	PFIC	PSC	0	0,035	*	0,101539
Ácido 3-Hidroxibutírico	PBC	PFIC	0,6	1	ns	0,101539
Ácido 3-Hidroxibutírico	PBC	PSC	0,5	1	ns	0,101539
Ácido 3-hidroxihipúrico	PBC	PSC	0	0,142	ns	-
Ácido 3-hidroxihipúrico	PFIC	PSC	0	0,16	ns	-
Ácido 3-hidroxihipúrico	PFIC	PSC	0	0,118	ns	-
Ácido 3-hidroxihipúrico	Control	PSC	0	4,00E-04	***	-
Ácido 3-hidroxihipúrico	Control	PBC	0	1,00E-04	***	-
Ácido 3-hidroxihipúrico	Control	PFIC	0	8,00E-04	***	-
Ácido 4-hidroxihipúrico	PBC	PFIC	0,8	0,8	ns	-
Ácido 4-hidroxihipúrico	Control	PBC	0,1	0,16	ns	-
Ácido 4-hidroxihipúrico	Control	PFIC	0	0,16	ns	-
Ácido 4-hidroxihipúrico	PBC	PSC	0	0,142	ns	-
Ácido 4-hidroxihipúrico	PFIC	PSC	0	0,16	ns	-
Ácido 4-hidroxihipúrico	Control	PSC	0	0,002	**	-
Ácido Desidroquenodeoxicólico	Control	PSC	0	0,159	ns	-
Ácido Desidroquenodeoxicólico	Control	PBC	0,1	0,268	ns	-
Ácido Desidroquenodeoxicólico	Control	PFIC	0	0,159	ns	-
Ácido Desidroquenodeoxicólico	PBC	PSC	0,4	0,357	ns	-
Ácido Desidroquenodeoxicólico	PBC	PFIC	0	3,00E-04	***	-
Ácido Desidroquenodeoxicólico	PFIC	PSC	0	3,00E-05	****	-
Ácido Glicolítico 3-sulfato	PBC	PFIC	0,9	0,875	ns	2,320964
Ácido Glicolítico 3-sulfato	PBC	PSC	0,1	0,293	ns	2,320964

TABELA VIII. Tabela de metabólitos identificados, juntamente com as análises estatísticas ao comparar as amostras de urina dos grupos CBP, CEP, PFIC3 e CS. Os resultados incluem os valores de significância estatística ($p < 0,05$ e $q < 0,05$), bem como a influência da idade ($p < 0,05$) (continuação).

Metabólito	Grupo1	Grupo2	p-value ($p < 0,05$)	q-value ($q < 0,05$)	p.adj.signif	Idade ($p < 0,05$)
Ácido Glicolítico 3-sulfato	PFIC	PSC	0,1	0,293	ns	2,320964
Ácido Glicolítico 3-sulfato	Control	PBC	0	0,003	**	2,320964
Ácido Glicolítico 3-sulfato	Control	PFIC	0	0,006	**	2,320964
Ácido Glicolítico 3-sulfato	Control	PSC	0	8,00E-04	***	2,320964
Ácido Glicolítico 3-sulfato	Control	PBC	0,3	0,42	ns	0,774162
Ácido glicurônico sulfatado	Control	PSC	0	0,03	*	0,237404
Ácido glicurônico sulfatado	PBC	PSC	0	0,03	*	1,237404
Ácido glicurônico sulfatado	PFIC	PSC	0	0,03	*	2,237404
Ácido glicurônico sulfatado	Control	PBC	0,9	1	ns	3,237404
Ácido glicurônico sulfatado	Control	PFIC	0,7	1	ns	4,237404
Ácido glicurônico sulfatado	PBC	PFIC	0,9	1	ns	5,237404
Ácido Hippúrico	Control	PSC	0	0,04	*	0,39836
Ácido Hippúrico	PBC	PSC	0	0,017	*	0,39836
Ácido Hippúrico	PFIC	PSC	0	0,002	**	0,39836
Ácido Hippúrico	Control	PBC	0,7	1	ns	0,39836
Ácido Hippúrico	Control	PFIC	0,9	1	ns	0,39836
Ácido Hippúrico)	PBC	PFIC	0,7	1	ns	0,39836
Ácido tetrahydro-2,5-furano-diacético	Control	PBC	0,5	0,617	ns	0,107991
Ácido tetrahydro-2,5-furano-diacético	Control	PFIC	0,2	0,356	ns	0,107991
Ácido tetrahydro-2,5-furano-diacético	PBC	PFIC	0,6	0,7	ns	0,107991
Ácido tetrahydro-2,5-furano-diacético	PFIC	PSC	0	0,069	ns	0,107991
Ácido tetrahydro-2,5-furano-diacético	Control	PSC	0	0,007	*	0,107991
Ácido tetrahydro-2,5-furano-diacético	PBC	PSC	0	0,026	*	0,107991
Alisina	Control	PSC	0	0,015	*	0,231271
Alisina	Control	PFIC	0,6	0,705	ns	0,231271
Alisina	Control	PBC	0,4	0,506	ns	0,231271
Alisina	PBC	PFIC	0,5	0,646	ns	0,231271
Alisina	PBC	PSC	0,4	0,499	ns	0,231271
Alisina	PFIC	PSC	0	0,041	ns	0,231271
Citraconato	Control	PSC	0,1	0,354	ns	0,349326
Citraconato	Control	PFIC	0,5	0,866	ns	0,349326
Citraconato	PFIC	PSC	0,4	0,866	ns	0,349326
Citraconato	Control	PBC	0	7,00E-04	***	0,349326
Citraconato	PBC	PFIC	0	4,00E-04	***	0,349326
Citraconato	PBC	PSC	0	0,006	**	0,349326
DG(2:0/PGJ2)	Control	PSC	0,3	0,41	ns	-
DG(2:0/PGJ2)	Control	PFIC	0,2	0,311	ns	-
DG(2:0/PGJ2)	PFIC	PSC	0,9	0,907	ns	-
DG(2:0/PGJ2)	Control	PBC	###	#####	****	-
DG(2:0/PGJ2)	PBC	PFIC	0	0,003	**	-

TABELA VIII. Tabela de metabólitos identificados, juntamente com as análises estatísticas ao comparar as amostras de urina dos grupos CBP, CEP, PFIC3 e CS. Os resultados incluem os valores de significância estatística ($p < 0,05$ e $q < 0,05$), bem como a influência da idade ($p < 0,05$) (continuação).

Metabólito	Grupo1	Grupo2	p-value ($p < 0,05$)	q-value ($q < 0,05$)	p.adj.signif	Idade ($p < 0,05$)
DG(2:0/PGJ2)	PBC	PSC	0	0,002	**	-
Eritrose	Control	PSC	0,3	0,402	ns	0,264492
Eritrose	Control	PBC	0	0,001	***	1,264492
Eritrose	Control	PFIC	0,1	0,103	ns	2,264492
Eritrose	PBC	PFIC	0	0,028	*	3,264492
Eritrose	PBC	PSC	0	0,002	**	4,264492
Eritrose	PFIC	PSC	0,3	0,412	ns	5,264492
Fenilacetilglutamina	PBC	PSC	0,1	0,144	ns	0,672828
Fenilacetilglutamina	Control	PSC	###	#####	****	0,672828
Fenilacetilglutamina	Control	PSC	###	#####	****	0,672828
Fenilacetilglutamina	Control	PBC	###	#####	****	0,672828
Fenilacetilglutamina	Control	PFIC	###	#####	****	0,672828
Fenilacetilglutamina	PBC	PFIC	0,7	0,797	ns	0,672828
Fenilacetilglutamina	PFIC	PSC	0,1	0,207	ns	0,672828
Fenilalanina	Control	PBC	0	0,048	*	0,127416
Fenilalanina	PBC	PFIC	0	9,00E-05	****	1,127416
Fenilalanina	PBC	PSC	0	5,00E-04	***	2,127416
Fenilalanina	Control	PSC	0,2	0,36	ns	3,127416
Fenilalanina	Control	PFIC	0,1	0,36	ns	4,127416
Fenilalanina	PFIC	PSC	1	0,958	ns	5,127416
Glicoquenodesoxicolato-3-sulfato	Control	PBC	0	3,00E-05	****	-
Glicoquenodesoxicolato-3-sulfato	Control	PFIC	0	0,001	**	-
Glicoquenodesoxicolato-3-sulfato	Control	PSC	0	1,00E-05	****	-
Glicoquenodesoxicolato-3-sulfato	PBC	PSC	0	0,012	*	-
Glicoquenodesoxicolato-3-sulfato	PFIC	PSC	0	0,004	**	-
Glicoquenodesoxicolato-3-sulfato	PBC	PFIC	0,3	0,319	ns	-
Glucosilgalactosil hidroxilisina	PBC	PFIC	0,1	0,207	ns	-
Glucosilgalactosil hidroxilisina	PBC	PSC	0	0,054	ns	-
Glucosilgalactosil hidroxilisina	PFIC	PSC	0,3	0,42	ns	-
Glucosilgalactosil hidroxilisina	Control	PSC	0	2,00E-04	***	-
Glucosilgalactosil hidroxilisina	Control	PFIC	0	2,00E-04	***	-
Glucosilgalactosil hidroxilisina	Control	PBC	0	0,006	**	-
Hepta-2,4-dienoilcarnitina	PBC	PSC	0,1	0,21	ns	3,074327
Hepta-2,4-dienoilcarnitina	PFIC	PSC	0	5,00E-06	****	5,074327
Hepta-2,4-dienoilcarnitina	Control	PSC	0	0,051	ns	0,074327
Hepta-2,4-dienoilcarnitina	Control	PBC	0,2	0,21	ns	1,074327
Hepta-2,4-dienoilcarnitina	Control	PFIC	0	0,132	ns	2,074327
Hepta-2,4-dienoilcarnitina	PBC	PFIC	0	1,00E-04	***	4,074327
Histidina	Control	PBC	0	0,019	*	0,00881
Histidina	PBC	PFIC	0	9,00E-05	****	0,00881

TABELA VIII. Tabela de metabólitos identificados, juntamente com as análises estatísticas ao comparar as amostras de urina dos grupos CBP, CEP, PFIC3 e CS. Os resultados incluem os valores de significância estatística ($p < 0,05$ e $q < 0,05$), bem como a influência da idade ($p < 0,05$) (continuação).

Metabólito	Grupo1	Grupo2	p-value ($p < 0,05$)	q-value ($q < 0,05$)	p.adj.signif	Idade ($p < 0,05$)
Histidina	PBC	PSC	0	0,002	**	0,00881
Histidina	Control	PSC	0,4	0,78	ns	0,00881
Histidina	PFIC	PSC	0,5	0,78	ns	0,00881
Histidina	Control	PFIC	0,1	0,321	ns	0,00881
N-Acetilglicosamina	PBC	PSC	0	0,077	ns	4,120262
N-Acetilglicosamina	Control	PSC	0	0,004	**	0,120262
N-Acetilglicosamina	Control	PFIC	0	0,022	*	1,120262
N-Acetilglicosamina	Control	PBC	0,2	0,236	ns	2,120262
N-Acetilglicosamina	PBC	PFIC	0,1	0,216	ns	3,120262
N-Acetilglicosamina	PFIC	PSC	0,6	0,716	ns	5,120262
N-Acetilvalina	Control	PSC	3,47E-06	5,5E-05	****	0,153016
N-Acetilvalina	Control	PBC	3,94E-05	0,0004	***	1,153016
N-Acetilvalina	Control	PFIC	8,73E-09	2,7E-07	****	2,153016
N-Acetilvalina	PBC	PFIC	0,801	0,8709	ns	3,153016
N-Acetilvalina	PBC	PSC	0,952	0,96638	ns	4,153016
N-Acetilvalina	PFIC	PSC	0,833	0,8885	ns	5,153016
N-Alfa-acetilisina	Control	PSC	0,000223	0,0014	**	0,382735
N-Alfa-acetilisina	Control	PBC	0,000289	0,0017	**	0,382735
N-Alfa-acetilisina	Control	PFIC	2,5E-07	6E-06	****	0,382735
N-Alfa-acetilisina	PBC	PFIC	0,036	0,0	ns	0,382735
N-Alfa-acetilisina	PBC	PSC	0,063	0,11	ns	0,382735
N-Alfa-acetilisina	PFIC	PSC	0,602	0,697	ns	0,382735
N-Eicosapentaenoil Aspartato	PBC	PFIC	0	0,004	**	-
N-Eicosapentaenoil Aspartato	Control	PSC	0,8	0,836	ns	-
N-Eicosapentaenoil Aspartato	Control	PBC	0	0,053	ns	-
N-Eicosapentaenoil Aspartato	Control	PFIC	0,2	0,28	ns	-
N-Eicosapentaenoil Aspartato	PBC	PSC	0,1	0,11	ns	-
N-Eicosapentaenoil Aspartato	PFIC	PSC	0,1	0,21	ns	-
N-Eicosapentaenoyl Leucine	PBC	PFIC	0,5	0,592	ns	-
N-Eicosapentaenoyl Leucine	PBC	PSC	0,1	0,11	ns	-
N-Eicosapentaenoyl Leucine	PFIC	PSC	0,2	0,277	ns	-
N-Eicosapentaenoyl Leucine	Control	PSC	0	0,007	*	-
N-Eicosapentaenoyl Leucine	Control	PBC	0	0,003	**	-
N-Eicosapentaenoyl Leucine	Control	PFIC	0	0,013	*	-
Neomenthol-glucuronide	Control	PSC	0,1	0,209	ns	0,762836
Neomenthol-glucuronide	Control	PFIC	0,1	0,17	ns	0,762836
Neomenthol-glucuronide	PBC	PFIC	0	0,096	ns	0,762836
Neomenthol-glucuronide	PBC	PSC	0	0,033	ns	0,762836
Neomenthol-glucuronide	PFIC	PSC	0,8	0,859	ns	0,762836
Neomenthol-glucuronide	Control	PBC	0	0,004	**	0,762836

TABELA VIII. Tabela de metabólitos identificados, juntamente com as análises estatísticas ao comparar as amostras de urina dos grupos CBP, CEP, PFIC3 e CS. Os resultados incluem os valores de significância estatística ($p < 0,05$ e $q < 0,05$), bem como a influência da idade ($p < 0,05$) (continuação).

Metabólito	Grupo1	Grupo2	p-value ($p < 0,05$)	q-value ($q < 0,05$)	p.adj.signif	Idade ($p < 0,05$)
o-Adipoylcarnitine	PFIC	PSC	0	0,032	*	0,222447
o-Adipoylcarnitine	Control	PSC	0	0,003	**	0,222447
o-Adipoylcarnitine	Control	PBC	0,2	0,51	ns	0,222447
o-Adipoylcarnitine	Control	PFIC	0,2	0,51	ns	0,222447
o-Adipoylcarnitine	PBC	PFIC	0,9	0,891	ns	0,222447
o-Adipoylcarnitine	PBC	PSC	0	0,061	ns	0,222447
O-Sulfotyrosine	Control	PBC	0	6,00E-04	***	0,059504
O-Sulfotyrosine	PBC	PSC	0	0,002	**	0,059504
O-Sulfotyrosine	PBC	PFIC	0	1,00E-04	***	0,059504
O-Sulfotyrosine	Control	PSC	0,3	0,386	ns	0,059504
O-Sulfotyrosine	Control	PFIC	0,9	0,923	ns	0,059504
O-Sulfotyrosine	PFIC	PSC	0,3	0,375	ns	0,059504
Prolina	Control	PSC	0	5,00E-11	****	-
Prolina	Control	PBC	0	3,00E-11	****	-
Prolina	Control	PFIC	0	2,00E-09	****	-
Prolina	PBC	PFIC	0,1	0,103	ns	-
Prolina	PBC	PSC	0	0,091	ns	-
Prolina	PFIC	PSC	0,6	0,557	ns	-
Serina	Control	PSC	0	2,00E-09	****	0,478451
Serina	Control	PBC	0	2,00E-07	****	0,478451
Serina	Control	PFIC	0	1,00E-09	****	0,478451
Serina	PBC	PSC	0	0,018	*	0,478451
Serina	PBC	PFIC	0,2	0,216	ns	0,478451
Serina	PFIC	PSC	0,1	0,16	ns	0,478451
Suberato	PBC	PFIC	0,4	0,483	ns	0,049145
Suberato	Control	PSC	0	0,024	*	0,049145
Suberato	PBC	PSC	0	0,007	**	0,049145
Suberato	Control	PBC	1	0,978	ns	0,049145
Suberato	Control	PFIC	0,5	0,596	ns	0,049145
Suberato	PFIC	PSC	0	0,045	ns	0,049145
succiniladenosina	Control	PFIC	0,7	0,812	ns	0,774162
succiniladenosina	PBC	PFIC	0,2	0,335	ns	0,774162
succiniladenosina	PBC	PSC	0,4	0,51	ns	0,774162
succiniladenosina	PFIC	PSC	0	0,007	**	0,774162
succiniladenosina	Control	PSC	0	0,015	*	0,774162
sulfato de p-Cresol	PBC	PSC	0	0,025	*	0,633382
sulfato de p-Cresol	PFIC	PSC	0	0,025	*	0,633382
sulfato de p-Cresol	Control	PSC	0	0,143	ns	0,633382
sulfato de p-Cresol	Control	PBC	0,4	1	ns	0,633382
sulfato de p-Cresol	Control	PFIC	0,4	1	ns	0,633382

TABELA VIII. Tabela de metabólitos identificados, juntamente com as análises estatísticas ao comparar as amostras de urina dos grupos CBP, CEP, PFIC3 e CS. Os resultados incluem os valores de significância estatística ($p < 0,05$ e $q < 0,05$), bem como a influência da idade ($p < 0,05$).

Metabólito	Grupo1	Grupo2	<i>p-value</i> ($p < 0,05$)	<i>q-value</i> ($q < 0,05$)	<i>p.adj.signif</i>	Idade ($p < 0,05$)
sulfato de p-Cresol	PBC	PFIC	1	1	ns	0,633382
Tirosina	Control	PFIC	0	0,003	**	-
Tirosina	Control	PSC	0	0,009	**	-
Tirosina	PBC	PFIC	0	7,00E-04	***	-
Tirosina	PBC	PSC	0	0,003	**	-
Tirosina	Control	PBC	0,7	0,722	ns	-
Tirosina	PFIC	PSC	0,4	0,716	ns	-
Triptofano 2-C-manosídeo	Control	PSC	0	0,001	**	0,89388
Triptofano 2-C-manosídeo	PFIC	PSC	0	0,015	*	1,89388
Triptofano 2-C-manosídeo	Control	PFIC	0,2	0,275	ns	2,89388
Triptofano 2-C-manosídeo	Control	PBC	0,3	0,412	ns	3,89388
Triptofano 2-C-manosídeo	PBC	PFIC	0,6	0,672	ns	4,89388
Triptofano 2-C-manosídeo	PBC	PSC	0,4	0,484	ns	5,89388
Urocanato	PFIC	PSC	0,6	1	ns	0,069017
Urocanato	Control	PFIC	0	0,005	**	0,069017
Urocanato	Control	PSC	0	0,009	**	0,069017
Urocanato	PBC	PFIC	0	0,002	**	0,069017
Urocanato	PBC	PSC	0	0,005	**	0,069017
Urocanato	Control	PBC	0,8	1	ns	0,069017

APÊNDICE III

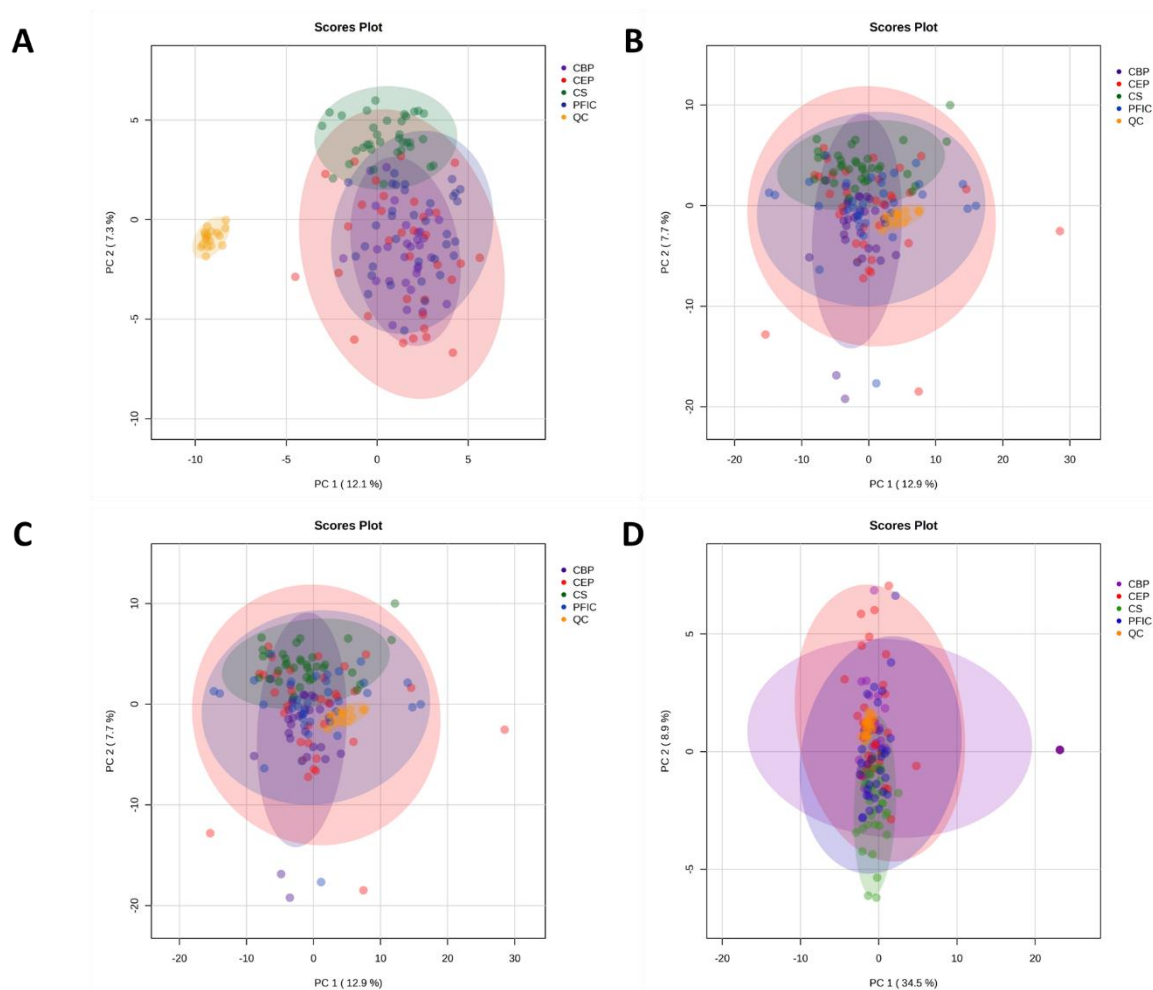


FIGURA I. Análise multivariada dos dados metabolômicos plasmáticos. Gráfico de pontuação 2D da análise de componentes principais (PCA) do conjunto de dados com todas as características detectadas nas análises LC-HRMS. As áreas verdes representam o grupo (CS), vermelhas (CEP), azul (PFIC) e roxo (CBP). A cor laranja representa o grupo de controles de qualidade (QCs).

- (a) RPLC (ESI+)
- (b) RPLC (ESI-)
- (c) HILIC (ESI+)
- (d) HILIC (ESI-)

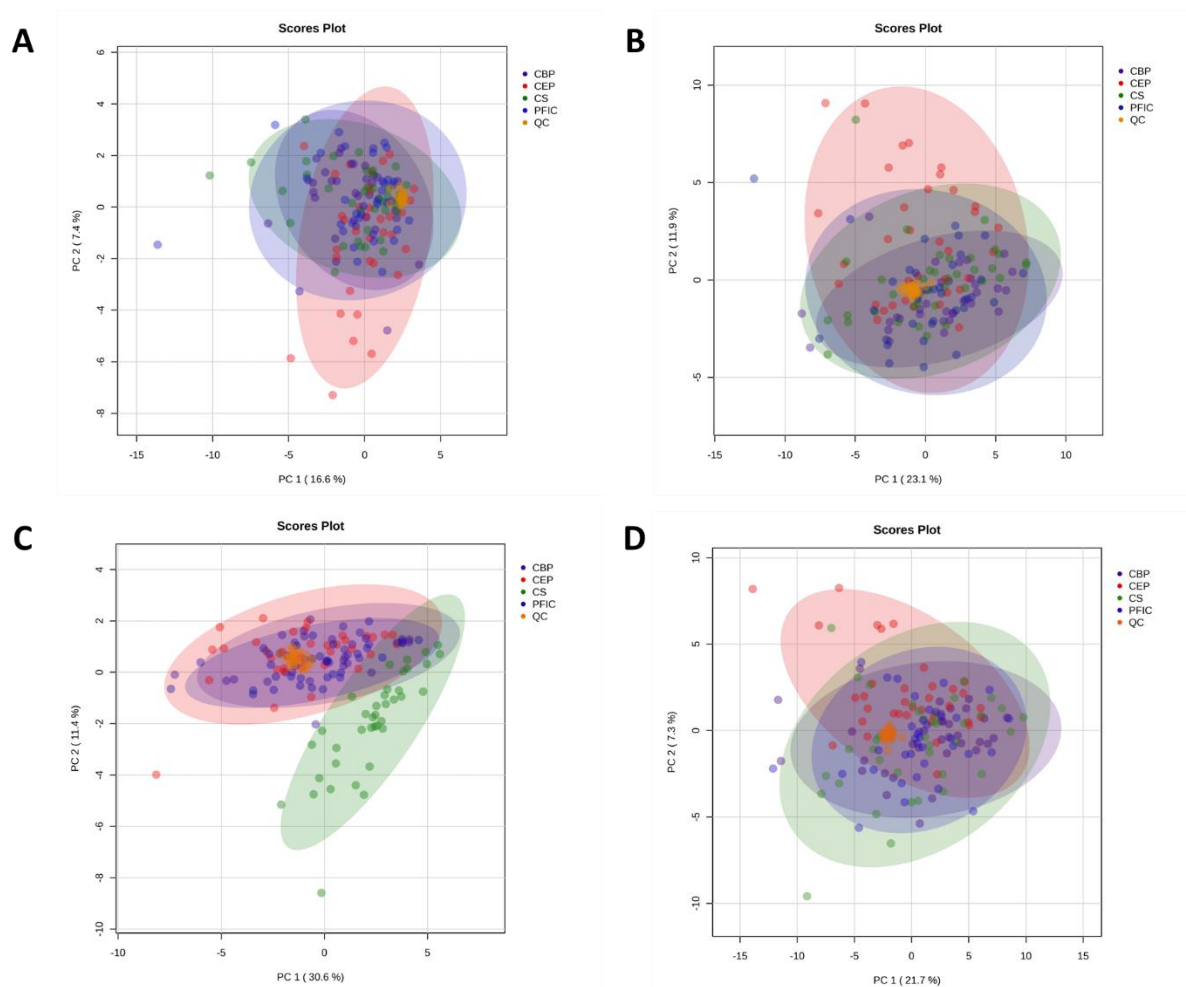


FIGURA II. Análise multivariada dos dados metabolômicos obtidos das amostras de urina. Gráfico de pontuação 2D da análise de componentes principais (PCA) do conjunto de dados com todos os *features* detectadas nas análises LC-HRMS. A cor laranja representa o grupo de controles de qualidade (QCs).

- (a) RPLC (ESI+)
- (b) RPLC (ESI-)
- (c) HILIC (ESI+)
- (d) HILIC (ESI-)