



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0710054-0 A2**

(22) Data de Depósito: 10/04/2007
(43) Data da Publicação: 02/08/2011
(RPI 2117)



(51) *Int.Cl.:*
G01N 33/50 2006.01

(54) Título: **MÉTODOS PARA IDENTIFICAR UM OU UMA PLURALIDADE DE METABÓLITOS CELULARES, PARA TRIAR UM COMPOSTO DE TESTE, PARA TESTAR UM COMPOSTO DE TESTE, E, PERFIL DE BIOMARCADOR PARA IDENTIFICAR UM COMPOSTO DE TESTE COMO UM COMPOSTO TÓXICO**

(30) Prioridade Unionista: 11/04/2006 US 60/790647,
11/08/2006 US 60/822163

(73) Titular(es): Wisconsin Alumni Research Foundation

(72) Inventor(es): Gabriela G. Cezar

(74) Procurador(es): Momsen, Leonardos & CIA.

(86) Pedido Internacional: PCT US2007008923 de 10/04/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/120699 de 25/10/2007

(57) Resumo: MÉTODOS PARA IDENTIFICAR UM OU UMA PLURALIDADE DE METABÓLITOS CELULARES, PARA TRIAR UM COMPOSTO DE TESTE E PARA TESTAR UM COMPOSTO DE TESTE, E, PERFIL DE BIOMARCADOR PARA IDENTIFICAR UM COMPOSTO DE TESTE COMO UM COMPOSTO TÓXICO A invenção provê perfis de biomarcador de metabólitos celulares e métodos para triar compostos químicos incluindo agentes farmacêuticos, compostos de fármacos de ponta e candidatos e outros produtos químicos usando células-tronco embrionárias humanas (hESC) ou células específicas de linhagem produzidas a partir das mesmas. Os métodos da invenção são utilizáveis para testar a toxicidade, particularmente toxicidade desenvolvimental, e detectar os efeitos teratogênicos destes compostos químicos.

“MÉTODOS PARA IDENTIFICAR UM OU UMA PLURALIDADE DE METABÓLITOS CELULARES, PARA TRIAR UM COMPOSTO DE TESTE, PARA TESTAR UM COMPOSTO DE TESTE, E, PERFIL DE BIOMARCADOR PARA IDENTIFICAR UM COMPOSTO DE TESTE
5 COMO UM COMPOSTO TÓXICO”

Este pedido reivindica o benefício de prioridade de pedidos de patente provisória US, números de série 60/790.647, depositado em 10 de abril de 2006, e 60/822.163, depositado em 11 de agosto de 2006, cujos conteúdos são incorporados aqui por referência.

10 **Fundamentos da invenção**

Campo da invenção

Esta invenção provê métodos para a triagem toxicológica de fármacos e outros compostos químicos. A invenção especificamente provê reagentes que são células-tronco embriônicas humanas (hESC) ou células
15 específicas de linhagem derivadas de hESC, como células-tronco neurais, células precursoras neurais e células neurais, assim como a métodos para usar estas células para detectar toxicidade desenvolvimental ou efeitos teratogênicos de compostos farmacêuticos e outros produtos químicos . Mais particularmente, a invenção provê um meio *in vitro* para analisar a toxicidade
20 de compostos previsores de sua toxicidade durante o desenvolvimento humano. Biomarcadores previsores candidatos para efeitos tóxicos ou teratogênicos são identificados e aqui providos.

Fundamentos da invenção

Os defeitos congênitos são a causa principal de morbidez
25 infantil nos Estados Unidos, afetando 1 em cada 33 recém-nascidos (Brent & Beckman, 1990, *Bull NY Acad Med* 66: 123-63; Rosano et al, 2000, *J Epidemiology Community Health* 54:660-66), ou 25 aproximadamente 125.000 recém-nascidos por ano. Entende-se que a toxicidade desenvolvimental pode causar defeitos congênitos e pode gerar letalidade

embriônica, restrição ao crescimento intra-uterino (IUGR), dismorfogenese (como má formações esqueléticas), e toxicidade funcional, que podem levar a distúrbios cognitivos como autismo. Existe uma preocupação crescente sobre o papel que a exposição a produtos químicos pode desempenhar no início destes distúrbios. De fato, estima-se que 5% a 10% de todos os defeitos congênitos são causados por exposição uterina a agentes teratogênicos conhecidos (Beckman & Brent, 1984, *Annu Rev Pharmacol* 24: 483-500).

Existe a preocupação de que a exposição a produtos químicos pode estar desempenhando um papel significativo e evitável na ocorrência dos defeitos congênitos (Claudio et al, 2001, *Environm Health Perspect* 109: A254-A261). Esta preocupação tem sido difícil de avaliar, no entanto, porque a técnica não dispõe de um modelo robusto e eficiente para testar a toxicidade desenvolvimental para os mais do que 80.000 produtos químicos no mercado, mais os novos 2.000 compostos introduzidos anualmente (General Accounting Office (GAO), 1994, *Toxic Substances Control Act: Preliminary Observações on Legislative Mudanças to Make TSCA More Effective*, Testimony, 07/13/94, GAO/T-RCED-94-263). Menos do que 5% destes compostos foram testados para as conseqüências na reprodução e mesmo menos para a toxicidade desenvolvimental (Environmental Protective Agency (EPA), 1998, *Chemical Hazard Data Availability Study*, Office of Pollution Prevention and Toxins). Apesar de algumas tentativas terem sido feitas para usar sistemas de modelo animal para avaliar a toxicidade (Piersma, 2004, *Toxicology Letters* 149: 147-53), diferenças inerentes na sensibilidade de humanos *in utero* tem limitado a utilidade previsora destes modelos. Desenvolvimento de sistema de modelo de células com base em humanos teria um enorme impacto no desempenho de fármacos e a avaliação de risco dos produtos químicos.

Toxicidade, particularmente toxicidade desenvolvimental, é também um obstáculo principal na progressão de compostos através do

processo de desenvolvimento de fármacos. Atualmente, o teste de toxicidade é conduzido em modelos de animais como um meio para prever os efeitos adversos de exposição ao composto, particularmente no desenvolvimento e organogênese em embriões e fetos humanos. Os modelos os mais
5 prevalecentes que contribuem para a aprovação pelo FDA de novos fármacos investigacionais são os estudos com animais completos em coelhos e ratos (Piersma, 2004, *Toxicology Letters* 149:147-53). Os estudos *in vivo* se baseiam na administração de compostos a animais grávidos em diferentes estágios de gravidez e desenvolvimento embriônico / fetal (primeira semana
10 de gestação, estágio de organogênese e extensão completa da gestação). NO entanto, estes modelos de animais *in vivo* são limitados por uma falta de robustez entre as respostas do animal e do humana a compostos químicos durante o desenvolvimento. As diferenças entre espécies são com frequência manifestadas em tendências como a sensibilidade à dose e processamento
15 farmacocinético de compostos. Atualmente, os modelos de animais são apenas 50% eficientes em prever a desenvolvimental resposta humana a compostos (Greaves et al, 1004, *Nat Rev Drug Discov* 3 :226-36). Assim, os modelos *in vitro* previsores dirigidos a humanos apresentam uma oportunidade para reduzir os custos do desenvolvimento de novos fármacos e
20 permitir fármacos mais seguros.

Os modelos *in vitro* tem sido empregados na indústria de fármacos há mais de 20 anos (Huuskonen, 2005, *Toxicology & Applied Pharm* 207:S495-S500). Muitos dos testes *in vitro* atuais envolvem os modelos de diferenciação usando culturas de células primárias ou linhagens
25 de células imortalizadas (Huuskonen, 2005, *Toxicology & Applied Pharm* 207:S495- S500). Infelizmente, estes modelos diferem de modo significativo de suas contra-partes *in vivo* em sua capacidade de avaliar com precisão o desenvolvimento da toxicidade. Em particular, a iniciativa ECVAM (European Center for Validation of Alternative Methods) tem usado células-

tronco embriônicas de camundongo como um sistema de triagem para toxicologia desenvolvimental previsora. O teste de células-tronco embriônicas (EST) tem mostrado resultados muito promissores, com uma correlação estatisticamente significativa de 78% aos estudos *in vivo*, e o teste foi capaz de

5 diferenciar teratogênios fortes de compostos moderados/ fracos ou não embriotóxicos (Spielmann et al, 1997, *In Vitro Toxicology* H): 119-27). Este modelo é limitado em parte devido aos pontos finais toxicológicos serem definidos somente para compostos que afetam a diferenciação cardíaca. Este modelo também falha em considerar as diferentes desenvolvimentais entre as

10 espécies dentre os camundongos e humanos, e assim não se dirige de modo completo à necessidade na técnica para sistemas de modelos específicos para humanos.

Assim, permanece a necessidade na técnica para um método *in vitro*, específico de humanos para determinar de modo confiável a toxicidade desenvolvimental em agentes farmacêuticos e outros compostos químicos.

15 Também existe a necessidade na técnica para melhor compreender o desenvolvimento humano e sua perturbação por toxinas ou outros agentes desreguladores do desenvolvimento, para auxiliar no controle clínico de distúrbios congênitos adquiridos e as muitas doenças que compartilham estas

20 vias bioquímicas, como o câncer.

A presente invenção provê a avaliação de uma pluralidade de moléculas pequenas, preferivelmente secretadas ou excretadas por células hES ou células específicas de linhagem derivadas de hESC, como células-tronco neurais, células precursoras neurais e células neurais, e é determinada e

25 correlacionada com um estado de saúde e doença ou insulto. As análises similares foram aplicadas a outros sistemas biológicos na técnica (Want et al., 2005 *Chem Bio Chem* 6: 1941-51), provendo biomarcadores de doença ou respostas tóxicas que podem ser detectadas em fluidos biológicos (Sabatine et al, 2005 *Circulation* 112:3868-875).

Sumário da invenção

A presente invenção provê reagentes e métodos para a triagem *in vitro* de toxicidade e teratogenicidade de produtos químicos farmacêuticos e não farmacêuticos usando células-tronco embriônicas humanas não diferenciadas (hESC) ou células específicas de linhagem derivadas de hESC, como células-tronco neurais, células precursoras neurais e células neurais. A invenção provê métodos *in vitro* específicos de humanos para determinar confiavelmente toxicidade, particularmente toxicidade desenvolvimental e teratogenicidade, de fármacos e outros compostos químicos usando células-tronco embriônicas humanas (hESCs) ou células específicas na linhagem derivadas de hESC, como células-tronco neurais, células precursoras neurais e células neurais. Como provido aqui, hESCs ou células específicas na linhagem derivadas de hESC, como células-tronco neurais, células precursoras neurais e células neurais, são utilizáveis para avaliar efeitos tóxicos de compostos químicos, particularmente referidos efeitos tóxicos e teratogênicos em desenvolvimento humano, assim superando as limitações associadas com modelos interespécies de animais. Em particular, a invenção demonstra que perfis metabólitos de células hES ou células específicas na linhagem derivadas de hESC, como células-tronco neurais, células precursoras neurais e células neurais são alterados em resposta a desreguladores conhecidos de desenvolvimento humano.

A invenção mostra que o metaboloma de hESC é uma fonte de biomarcadores humanos para doença e resposta tóxica. Em formas de realização particulares, exposição de hESC a valproato induziu mudanças significantes em diferentes vias metabólicas, consistentes com sua atividade conhecida como um teratogênio humano. Em outras formas de realização, exposição de hESC a níveis variados de etanol induziu significantes alterações em vias metabólicas consistentes com efeitos conhecidos do álcool em desenvolvimento fetal.

Em um aspecto, a invenção provê métodos para usar células-tronco embriônicas humanas pluripotentes não diferenciadas (hESC) ou células específicas de linhagem derivadas de hESC, como células-tronco neurais, células precursoras neurais e células neurais, para uma avaliação *in vitro* . Em métodos da invenção, nESCs não diferenciadas ou células específicas na linhagem derivadas de hESC, como células-tronco neurais, células precursoras neurais e células neurais são expostas um composto de testes, preferivelmente em concentrações refletivas de níveis em vivo ou em níveis encontrados em circulação maternal. Outras formas de realização deste aspecto da invenção provêm a determinação da capacidade do composto de teste de induzir a diferenciação de hESC pluripotente em tipos de células particulares. Em outras formas de realização, os métodos da invenção são providos usando células não limitadas à linhagem pluripotentes. O benefício de usar células-tronco pluripotentes é que elas permitem a análise de resposta(s) tóxica(s) global(ais) e são isoladas do alvo fisiológico de toxicidade desenvolvimental, isto é o embrião humano. Além disso, porque estas células não diferenciaram em linhagem específica, o potencial para falsos negativos é reduzido. Em ainda outras formas de realização são providos métodos usando células específicas na linhagem derivadas de hESC, como células-tronco neurais, células precursoras neurais e células neurais, para avaliar toxicidade e particularmente toxicidade desenvolvimental e teratogenicidade .

Em outro aspecto a invenção provê métodos para identificar biomarcadores previsores de respostas tóxicas a compostos químicos, particularmente produtos químicos farmacêuticos e não farmacêuticos, e particularmente a teratogênicos conhecidos. Em formas de realização deste aspecto, um conjunto dinâmico representativo de uma pluralidade de metabólitos celulares, preferivelmente secretados ou excretados por células hES ou células específicas de linhagem derivadas de hESC, como células-

tronco neurais, células precursoras neurais e células neurais, é determinado e correlacionado com estado de saúde e doença ou de insulto tóxico. Os metabólitos celulares de acordo com este aspecto da invenção geralmente estão na faixa de cerca de 10 a 15 cerca de 1500 Daltons, mais particularmente de cerca de 100 a cerca de 1000 Daltons, e incluem mas não são limitados a compostos como açúcares, ácidos orgânicos, aminoácidos, ácidos graxos e compostos de baixo peso molecular de sinalização. Referidos perfis de biomarcadores são diagnósticos para toxicidade de compostos químicos, particularmente produtos químicos farmacêuticos e não farmacêuticos, que participam em e revelam mecanismos funcionais de resposta celular a insulto químico patológico ou tóxico, assim servindo como biomarcadores de doença ou resposta tóxica que podem ser detectados em fluidos biológicos. Em formas de realização particularmente preferidos deste aspecto da invenção, estes biomarcadores são utilizáveis para identificar vias metabólicas ativas (ou ativadas), após as mudanças moleculares previstas, *inter alia*, por outros métodos (como transcriptômicos e proteômicos).

A invenção assim também provê biomarcador e pluralidade de biomarcadores, em alguns casos associados com metabólitos de vias metabólicas particulares, que são indicativos de insultos tóxicos ou teratogênicos. Referidos marcadores como providos pela invenção são usados para identificar insultos tóxicos e teratogênicos, e em formas de realização particulares são usados para caracterizar a quantidade ou extensão de referido insulto ao estarem correlacionados com a quantidade ou a extensão de um biomarcador particular ou pluralidade de biomarcadores detectados em meios de cultura de células. Em formas de realização particulares, a referida pluralidade de biomarcadores provendo um padrão diagnóstico de insultos tóxicos e teratogênicos, mais particularmente identificando uma ou uma multiplicidade de vias metabólicas específicas compreendendo metabólitos detectados após os insultos tóxicos e teratogênicos.

A presente invenção é vantajosa comparada com inter alia o modelo de camundongo ECVAM porque o teste de toxicidade e identificação do biomarcador são realizados com células humanas, especificamente células-tronco embriônicas humanas (hESC). Células-tronco embriônicas humanas são capazes de recapitular a organogênese de mamíferos *in vitro* (Reubinoff et al., 2000, *Nature Biotechnology* 18:399-404; He et al., 2003, *Circ Res* 93:32-9; Zeng et al., 2004, *Stem-Cells* 22:925-40; Lee et al., 2000, *Mol Genet Metab* 86:257-68; Yan et al., 2005, *Stem-Cells* 22:781-90) porque elas são células pluripotentes e de auto-renovação. Assim, hESCs podem revelar mecanismos de toxicidade, particularmente toxicidade desenvolvimental, e identificar as vias desenvolvimentais que são particularmente sensíveis aos produtos químicos durante o desenvolvimento humano inicial. O modelo embriônico "humano para humano" provido pelos métodos inventivos descritos aqui permite uma melhora compreensão das vias associados com toxicidade desenvolvimental, como este é um sistema desenvolvido diretamente do organismo alvo, assim como sendo um teste mais sensível e preciso para o for insulto tóxico ou teratogênico em desenvolvimento humano.

Os métodos da invenção provêm outras vantagens em identificar biomarcadores importantes para toxicidade e teratogenicidade por triagem funcional de hESCs ou células específicas na linhagem derivadas de hESC, como células-tronco neurais, células precursoras neurais e células neurais. Estes biomarcadores com vantagem identificam vias metabólicas e celulares e mecanismos de toxicidade, particularmente toxicidade desenvolvimental. Importaneamente, estes biomarcadores também podem auxiliar na avaliação dos efeitos tóxicos de produtos químicos sobre o embrião humano em desenvolvimento.

Em ainda outro aspecto da invenção, produtos celulares secretados ou excretados diferencialmente detectados identificados por métodos da invenção incluem os associados com distúrbios e alterações

neurodesenvolvimentais em via metabólicas associadas, e incluem mas não são limitados a quinurenina, glutamato, ácido piroglutâmico, 8-metoxiquinurenato, N'-formilquinurenina 5-hidroxitriptofano, N-acetil-D-triptofano e outros metabólitos em vias metabólicas triptofano e glutamato.

5 A toxicidade funcional na vida pós-natal pode ser prevista usando hESC porque células diferenciadas com propriedades *in vivo* críticas podem ser geradas *in vitro*. hESCs podem ser usados para produzir células específicas de linhagem, incluindo células-tronco específicas de linhagem, células precursoras e células terminalmente diferenciadas, provendo nas
10 mesmas populações enriquecidas de células tipicamente presentes *in vivo* em misturas de diferentes tipos de células compreendendo tecidos. A invenção assim provê métodos para usar hESCs para produzir estas populações enriquecidas e específicas de estado de desenvolvimento de células para a triagem da toxicidade de compostos químicos, particularmente fármacos, compostos de ponta para fármacos e compostos candidatos em
15 desenvolvimento de fármacos, para identificar as toxicidades específicas para humanos dos referidos compostos químicos. Estes aspectos dos métodos da invenção são vantajosos com relação aos sistemas de modelos de animais *in vitro* e *in vivo* reconhecidos na técnica.

20 As formas de realização específicas preferidas da presente invenção serão evidentes a partir da seguinte descrição mais detalhada de algumas formas de realização preferidas e as reivindicações.

Breve descrição dos desenhos

Estes e outros objetos e aspectos da invenção serão melhor entendidos a partir da seguinte descrição detalhada tomada em conjunto com os desenhos em que:

Figuras 1A a 1C são perfis de biomarcadores de metabólitos celulares secretados produzidos após contato de hESCs com 1 mM valproato. Estes perfis foram produzidos usando cromatografia de líquido/tempo de

ionização por eletropulverização de espectrometria de massa por tempo de voo (TOF)(LC/ESI-TOF-MS) após tratamento das células com valproato durante 24 horas (Figura 1A), quatro dias (Figura 1B) e oito dias (Figura 1C). As moléculas pequenas secretadas a partir de células-tronco embrionárias humanas tratadas (azul) e não tratadas (vermelho) foram medidas.

Figuras 2A a 2D são perfis de biomarcadores de metabólitos celulares secretados/excretados produzidos após contato de hESCs com 1 mM valproato. Estes perfis foram produzidos usando cromatografia de líquido/ tempo de ionização por eletropulverização de espectrometria de massa por tempo de voo (LC/ESI-TOF-MS) após tratamento das células com valproato durante 24 horas (Figura 2A), quatro dias (Figura 2B), oito dias (Figura 2C), e perfis metabólicos comparativos de células hES (azul) e meio condicionado (amarelo) (Figura 2D).

Figuras 3A a 3D são fotomicrografias de morfologia celular mostrando as células-tronco embrionárias pluripotentes após uma cultura prolongada. O marcador Oct-4 foi retido em um modo similar como controles não tratados (Figura 3A=5 dias valproato, Figura 3B=5 dias controle, Figura 3C-8 dias valproato, Figura 3D-8 dias controle).

Figura 4 mostra os resultados de espectrometria de massa comparativa na presença de padrões químicos confirmando a identidade química de ácido fólico (massa exata 441,14), ácido piroglutâmico (massa exata 129,04), glutamato (massa neutra exata 147,05) e quinurenina (massa exata 208,08).

Figura 5 representa a via de metabolismo de quinurenina de triptofano em humanos (Wang et al., 2006, *J Biol Chem* 281, 22021-22028, publicado eletronicamente em 5 de junho de 2006).

Figura 6 ilustra um agrupamento hierárquico de diferenças de mudanças de vezes de massas únicas de 22.573 e é representativo de experimentos independentes múltiplos em que hESCs e precursores neurais

produzidos a partir de hESCs foram tratadas com 1 mM valproato. Células não embriônicas (fibroblastos humanos) foram usados como controles (dados não mostrados). As mudanças de duplicações positivas são vermelhas, as mudanças de duplicações negativas são verde, e os dados faltando são cinza.

5 Figura 7 mostra a expressão relativa de enzimas nas vias de síntese de quinurenina e serotonina em células hES. INDO, indolamina 2,3 dioxigenase, TDO ou TDO2, triptofano 2,3-dioxigenase. (TDO2 foi regulado de modo positivo em células hES tratadas com valproato em comparação a controles.) AFMID, arilformamidase, TPH1, triptofano hidroxilase, AADAT, 10 aminoadipato aminotransferase, KYNU, quinunreninase, GAPDH, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, gene de controle doméstico. KMO, quinurenina 3-monooxigenase, não foi expressado em células tratadas com valproato ou controles.

Descrição Detalhada das Formas de Realização Preferidas

15 A invenção provê reagentes, incluindo células-tronco embriônicas humanas hESC) ou células específicas na linhagem derivadas de hESC, como células-tronco neurais, células precursoras neurais e células neurais produzidas a partir das mesmas, para avaliar a toxicidade desenvolvimental usando o metaboloma de células-tronco embriônicas 20 humanas. Células-tronco embriônicas humanas são células pluripotentes, de auto-renovação isoladas diretamente de embriões humanos pré-implante que recapitulam a organogênese *in vitro* . As células precursoras específicas de linhagem são derivadas de células hES e entraram em uma linhagem celular específica, mas ainda permanecem multipotentes com relação ao tipo celular 25 dentro da linhagem específica. Por exemplo, precursores neurais estão comprometidos com a diferenciação neural mas ainda permanecem não limitados com relação a seu tipo de célula neural. Também estão dentro do escopo dos métodos inventivos os tipos de células terminalmente diferenciadas, como neurônios. As vias bioquímicas do desenvolvimento

humano e doenças são ativas em hESCs e ou células específicas na linhagem derivadas de hESC, porque elas recapitulam a diferenciação em células somáticas funcionais. A desregulação destas vias durante o desenvolvimento contribuiu para distúrbios como defeitos do tubo neural (NTDs) e prejuízo cognitivo. Os agentes ambientais, ou seja os produtos químicos ou fármacos, participam na ontogênese de alguns distúrbios congênitos adquiridos. A questão de quais vias durante o desenvolvimento humano inicial são particularmente suscetíveis aos efeitos do ambiente permanece não resolvida.

O metaboloma, definido como o conjunto dinâmico total de metabólitos celulares presentes em células, é um produto de estados de saúde ou doença/insulto. Metabolômica é particularmente sensível aos efeitos ambientais em comparação com outras áreas de estudo "ômicas", como genômica e proteômica. Os metabólitos celulares incluem mas não são limitados a açúcares, ácidos orgânicos, aminoácidos e ácidos graxos, particularmente as espécies secretadas ou excretadas das células, que participam nos mecanismos funcionais de uma resposta celular a insulto patológico ou químico. Estes metabólitos celulares servem como biomarcadores de doença ou resposta tóxica e podem ser detectados em fluidos biológicos (Soga et al, 2006, *J Biol Chem* 281:16768-78; Zhao et al., 2006, *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 76:230-6), incluindo meios de cultura de hESC. Importante, o perfil metabolômico pode confirmar as mudanças funcionais que são com frequência previstas por transcriptômica e proteômica.

No entanto, porque se sabe que as hESCs são altamente sensíveis a microambiente da cultura (Levenstein et al., 2005, *Stem cells* 24: 568-574; Li et al, 2005, *Biotechnol Bioeng* 91:688-698.), sua aplicação como uma fonte de biomarcadores previsores em resposta a compostos químicos, incluindo toxinas, teratogênicos e particularmente agentes farmacêuticos, compostos de ponta de fármaco e compostos candidatos no desenvolvimento

de fármacos, e sua utilidade no estabelecimento de modelos *in vitro* de doença e desenvolvimento era incerta, inter alia, porque os versados na técnica podem antecipar que a exposição a um produto químico exógeno seria altamente prejudicial à sobrevivência das células hES e excluíram a obtenção de informação utilizável a partir das mesmas. Esta preocupação acabou demonstrada como não sendo justificada.

Como usado aqui, o termo "células-tronco embriônicas humanas (hESCs)" se destina a incluir células-tronco não diferenciadas originalmente derivadas da massa celular interna de blastócitos em desenvolvimento e especificamente células-tronco pluripotentes, não diferenciadas humanas e os tipos de células parcialmente diferenciadas das mesmas, (por exemplo, progenitores a jusante de hESC diferenciantes). Como provido aqui, culturas *in vitro* de hESC são pluripotentes e não imortalizadas e podem ser induzidas para produzir tipos de células específicas de linhagem e células diferenciadas usando métodos bem estabelecidos na técnica. Em formas de realização preferidas, hESCs utilizáveis na prática dos métodos desta invenção são derivadas de blastócitos pré-implantes como descrito por Thomson et al., em Patente US de comum propriedade No. 6.200,806. As linhagens de células múltiplas hESC estão atualmente disponíveis em dados de células-tronco nos Estados Unidos e Reino Unido.

Os termos "célula-tronco progenitora," "célula específica de linhagem," "célula derivada de hESC" e "célula diferenciada" como usados aqui se destinam a englobar células específicas de linhagem que são diferenciadas de células hES de modo que as células estão comprometidas com a linhagem específica de potência diminuída. Em algumas formas de realização, estas células precursoras específicas de linhagem permanecem não diferenciadas com relação ao tipo de célula final. Por exemplo, células-tronco neuronais são derivadas de hESCs e são diferenciadas o suficiente para se comprometer com a linhagem neuronal. No entanto, o precursor neuronal

retém "um rigor" em que ele retém o potencial para se desenvolver em qualquer tipo de célula neuronal. Os tipos de células adicionais incluem células terminalmente diferenciadas derivadas de hESCs ou células precursoras específicas de linhagem, por exemplo células neurais.

5 O termo " metabólito celular " como usado aqui refere-se a qualquer molécula pequena secretada e/ou excretada por uma hESC ou células específicas na linhagem derivadas de hESC, como células-tronco neurais, células precursoras neurais e células neurais, produzidas a partir das mesmas. Em formas de realização preferidas, metabólitos celulares incluem
10 mas não são limitados a açúcares, ácidos orgânicos, aminoácidos, ácidos graxos, hormônios, vitaminas, oligopeptídeos (menos do que cerca de 100 aminoácidos de comprimento), assim como os fragmentos iônicos dos mesmos. Células também podem ser lisadas a fim de medir os produtos celulares presentes dentro da célula. Em particular, referidos metabólitos
15 celulares tem de cerca de 10 a cerca de 3600 Daltons de peso molecular, mais particularmente cerca de 10 a cerca de 1500 Daltons, e ainda mais particularmente de cerca de 100 a cerca de 1000 Daltons.

hESCs são cultivadas de acordo com métodos da invenção usando métodos padrões de cultura de células bem conhecidos na técnica,
20 incluindo, por exemplo os métodos descritos em Ludwig et al. (2006, :Feeder-independent culture of human embryonic stem cells *Nat Methods* 3_: 637-46.). Em formas de realização preferidas, hESCs são cultivadas na ausência de uma camada de células alimentadoras durante a prática dos métodos inventivos; no entanto, hESCs podem ser cultivadas em camada de células
25 alimentadoras antes da prática dos métodos desta invenção.

O termo "administrar" como usado aqui refere-se a contar culturas *in vitro* de hESCs ou células específicas na linhagem derivadas de hESC, como células-tronco neurais, células precursoras neurais e células neurais produzidas a partir das mesmas, com um composto químico tóxico,

teratogênico, ou de teste. Em uma forma de realização preferida a dosagem do composto é administrada em uma quantidade equivalente aos níveis obtidos ou obteníveis *in vivo*, por exemplo, em circulação materna.

As frases "identificar metabólitos celulares que são
5 diferencialmente produzidos' ou "detectar alterações nas células ou
alterações em atividade celular" como usado aqui incluem mas não são
limitadas a comparações de células hES tratadas ou células específicas na
linhagem derivadas de hESC, como células-tronco neurais, células
precursoras neurais e células neurais, a células não tratadas (controle) (isto é,
10 células cultivadas na presença (tratadas) ou ausência (não tratadas) de um
composto químico tóxico, teratogênico, ou de teste). Detecção ou medida das
variações em metabólitos celulares, excretados ou secretados dos mesmos,
entre células tratadas e células não tratadas está incluída nesta definição. Em
uma forma de realização preferida, alterações em células ou atividade celular
15 são medidas por determinação de um perfil de mudanças em metabólitos
celulares tendo um peso molecular de menos do que 3000 Daltons, mais
particularmente entre 10 e 1500 Daltons, e ainda mais particularmente entre
100 e 1000 Daltons, em uma célula tratada versus célula não tratada como
ilustrado em Figuras 1A a 1C.

20 O termo "correlacionar" como usado aqui refere-se à
correlação positiva ou correspondência de alterações em metabólitos celulares
incluindo mas não limitados a açúcares, ácidos orgânicos, aminoácidos,
ácidos graxos, e compostos excretados ou secretados de baixo peso molecular
de células hES ou células específicas na linhagem derivadas de hESC, como
25 células-tronco neurais, células precursoras neurais e células neurais, para uma
resposta tóxica em vivo. Os metabólitos celulares triados podem estar
envolvidos em uma ampla faixa de vias bioquímicas nas células e
relacionados com uma variedade de atividades biológicas incluindo, mas não
limitadas a inflamação, resposta anti-inflamatória, vasodilatação,

neuroproteção, estresse oxidativo, atividade antioxidante, replicação de DNA, e controle do ciclo celular, metilação e biossíntese de, inter alia, nucleotídeos, carboidratos, aminoácidos e lipídeos dentre outros. As alterações em subconjuntos específicos de metabólitos celulares podem corresponder a uma via metabólica ou desenvolvimental particular e assim revelam efeitos de um composto de teste no desenvolvimento *in vivo*.

O termo "método de separação física" como usado aqui refere-se a qualquer método bem conhecido do versado suficiente para produzir um perfil de mudanças e diferenças em moléculas pequenas produzidas em hESCs ou células específicas na linhagens derivadas de hESC, como células-tronco neurais, células precursoras neurais e células neurais, contatadas com um composto químico tóxico, teratogênico ou de teste de acordo com métodos desta invenção. Em uma forma de realização preferida, métodos de separação física permitem detecção de metabólitos celulares incluindo mas não limitados a açúcares, ácidos orgânicos, aminoácidos, ácidos graxos, hormônios, vitaminas, e oligopeptídeos, assim como os fragmentos iônicos dos mesmos e compostos de baixo peso molecular (preferivelmente com um peso molecular menor do que 3000 Daltons, mais particularmente entre 10 e 1500 Daltons, e ainda mais particularmente entre 100 e 1000 Daltons). Em formas de realização particulares, esta análise é realizada por cromatografia de líquido/ tempo de ionização por eletropulverização de espectrometria de massa por tempo de voo (LC/ESI-TOF-MS), no entanto será entendido que os metabólitos celulares como especificados aqui podem ser detectados usando métodos alternativos de espectrometria ou outros métodos conhecidos na técnica para analisar estes tipos de compostos celulares nesta faixa de tamanho.

Os dados para análise estatística foram extraídos de cromatogramas (espectros de sinais de massa) usando o software Agilent Mass Hunter (Produto No. G3297AA, Agilent Technologies, Inc., Santa

Clara, CA); será entendido que os métodos de análise estatística alternativos também podem ser usados. As massas foram depositadas juntas se elas estavam na faixa de 10 ppm e eluídas em uma janela de tempo de retenção de 2 min. Uma massa depositada junto foi considerada como sendo a mesma molécula através de análises diferentes LC/ESI-TOF-MS (referida aqui como "massa exata," que será entendida como sendo ± 10 ppm). O armazenamento dos dados é requerido para análise estatística e comparação de massas através da experiência completa. Se picos múltiplos dentro da mesma massa no mesmo tempo de retenção dentre de uma única amostra forem detectados por Mass Hunter, eles foram obtidos em média para auxiliar na análise dos dados. As massas faltando uma distribuição isotópica natural ou com uma relação sinal-para-ruído de menos que 3 foram removidas dos dados antes da análise. Um versado na técnica irá notar que os resultados deste teste fornecem valores relativos que são avaliados de acordo com os valores anotados em 10 ppm para dar uma identidade para o peso molecular detectado. Assim, uma mudança de massa em 10 ppm é considerado consistente com a determinação da identidade de um metabólito celular específico anotado conhecido na técnica devido às diferenças na fonte de ionização e instrumentação, por exemplo entre diferentes experimentos ou usando diferentes instrumentos.

Como usado aqui, uma mass foi considerada como sendo a mesma através de ciclos de LC/ESI-TOF-MS usando um algoritmo simples que primeiro classifica os dados por massa e tempo de retenção. Após a classificação, um composto foi considerado singular se ele tinha uma diferença de tempo de retenção menor do que ou igual a três minutos e uma diferença de massa menor do que ou igual à fórmula ponderada ($0,000011 \times$ massa). Se uma série de medidas configurar esta definição, ele foi considerado como sendo do mesmo composto. Se ou a massa ou o tempo de retenção variar em mais do que os limites listados acima, ele foi considerado como sendo um composto diferente e recebeu uma nova designação única.

Os testes de significância foram determinados realizando-se ANOVAs nos valores de abundância transformados de base log 2 de compostos singulares presentes em meios tratados e não tratados no mesmo ponto de tempo. Um projeto de bloco completo randomizado foi usado com o modelo ANOVA incluindo os efeitos de tratamento, experimentos, e um prazo residual, com a seguinte fórmula: $\text{Log}_2(\text{abundância}_{tb}) = \text{tratamento}_t + \text{experimento}_b + \text{erro}_{tb}$.

Os dados faltando foram omitidos do teste mudando os graus de liberdade em vez de considerar que os dados faltando estavam ausentes. Esta suposição foi feita devido ao fato da filtração extensiva realizada pelo software Mass Hunter poder perder ou filtrar alguns picos porque eles estão abaixo de um certo limiar de abundância e não zero. O teste ANOVA F foi considerado significativo se seu valor p for menor que 0,05. As mudanças na duplicação foram calculadas usando a média de mínimos quadrados durante um tempo dado e tratamento.

O termo "biomarcador" como usado aqui refere-se a metabólitos celulares que demonstram alterações significantes entre controles tratados e não tratados. Em formas de realização preferidas, biomarcadores são identificados como especificado acima, por métodos incluindo LC/ESI-TOF-MS. Biomarcadores metabolômicos são identificados por sua consistência e massa molecular única com as quais o marcador é detectado em resposta a um composto químico tóxico, teratogênico ou de teste particular; assim, a identidade real do composto subjacente que corresponde ao biomarcador não é requerida para a prática desta invenção. Alternativamente, alguns biomarcadores podem ser identificados por, por exemplo, análise da expressão do gene, incluindo PCR em tempo real, RT-PCR, análise Northern, e hibridização in situ, mas estes não estarão geralmente dentro da definição do termo "metabólitos celulares" como especificado aqui.

O metaboloma basal de nESCs não diferenciadas serviu como

uma coleção de assinaturas bioquímicas de vias funcionais que são relevantes para seu caráter tronco e auto-renovação. Os perfis metabólitos foram conduzidos em metabólitos celulares excretados ou secretados como oposto a compostos intracelulares. Por fim, biomarcadores descobertos *in vitro* são esperados como sendo utilizáveis para análise de biofluidos *in vivo*, como soro, fluido amniótico, e urina, misturas complexas de biomoléculas extracelulares. Isto é vantajoso em comparação com os procedimentos invasivos como biopsias de tecido porque as moléculas pequenas em biofluidos podem ser detectadas não invasivamente (em contraste com compostos intracelulares). Além disso, o processamento do sobrenadante celular para espectrometria de massa é mais robusto e menos laborioso do que os extratos celulares. No entanto, os extratos celulares (de, por exemplo, células lisadas) podem ser usados nos métodos da invenção.

O termo "perfil do biomarcador" como usado aqui refere-se a uma pluralidade de biomarcadores identificados pelos métodos inventivos. Os perfis de biomarcador de acordo com invenção podem prover uma "impressão digital" molecular dos efeitos teratogênicos e tóxicos de um composto de teste e transferir os metabólitos celulares, metabólitos celulares especificamente excretados e secretados, que foram alterados de modo significativo após a administração do composto de teste a hESCs ou células específicas na linhagem derivadas de hESC, como células-tronco neurais, células precursoras neurais e células neurais. Nestas formas de realização, cada um dentre uma pluralidade de biomarcadores é caracterizado e identificado por sua massa molecular e consistência singulares com que o biomarcador é detectado em resposta a um composto químico tóxico, teratogênico ou de teste particular; assim a identidade real do composto subjacente que corresponde ao biomarcador não é requerida para a prática desta invenção.

O termo "portfolio de biomarcador " como usado aqui refere-se a uma coleção de perfis de biomarcadores individuais. Os portfolios de

biomarcadores pode ser usado como referências para comparar o perfil de biomarcadores de compostos novos ou desconhecidos. Portfolios de biomarcadores podem ser usados para identificar vias comuns, particularmente vias metabólicas ou desenvolvimentais, de resposta tóxica ou teratogênica.

Estes resultados especificados aqui demonstraram que a metabolômica de células-tronco embriônicas humanas, e metabolômica de células específicas na linhagem derivadas de hESC, como células-tronco neurais, células precursoras neurais e células neurais, podem ser usadas na descoberta de biomarcadores e identificação de vias. Metabolômicas detectaram moléculas pequenas secretadas por hESCs ou células específicas na linhagem derivadas de hESC, como células-tronco neurais, células precursoras neurais e células neurais, produzidas a partir daí e os biomarcadores identificados podem ser usados para pelo menos dois fins: primeiro para determinar as vias metabólicas ou desenvolvimentais específicas que respondem a ou são afetadas por exposição a toxinas ou teratogênicos, particularmente as referidas vias utilizadas ou afetadas durante o desenvolvimento inicial, que são sensíveis a compostos químicos tóxicos, teratogênicos ou de teste que são desreguladores desenvolvimentais e participam na ontogênese de defeitos congênitos; e segundo, para prover metabólitos celulares que podem ser medidos em biofluidos para auxiliar no controle e diagnóstico de exposição a agentes tóxicos, efeitos congênitos ou outras doenças.

Um portfolio de biomarcador de hESCs ou células específicas na linhagem derivadas de hESC, como células-tronco neurais, células precursoras neurais e células neurais, produzidas a partir dos mesmos podem servir também como uma ferramenta de triagem de produção elevada nas fases pré-clínicas de descoberta de fármacos. Além disso, esta abordagem pode ser usada para detectar efeitos prejudiciais de produtos químicos

ambientais (metais pesados, produtos de refugo industrial) e nutricionais (como álcool) sobre o desenvolvimento humano. Por fim, os métodos desta invenção utilizando o metaboloma de hESC ou o metaboloma de células específicas de linhagem derivadas de hESC, como células-tronco neurais, células precursoras neurais e células neurais, podem auxiliar as agências relacionadas com agentes farmacêuticos, biotecnologia e ambiental na tomada de decisões para o desenvolvimento de compostos e doses críticas para a exposição aos humanos. A integração de biologia química com a tecnologia de célula-tronco embriônica também oferece oportunidades singulares para reformar a compreensão de desenvolvimento humano e doença. Metabolômica de células diferenciadas de hESC pode servir a papéis similares e pode ser utilizável para elucidar mecanismos de toxicidade e doença com maior sensibilidade para tipos de células ou tecido particulares e em um modo específico humano. Por exemplo, vias metabólicas chaves, incluindo como especificado aqui síntese e degradação de folato, glutamato e triptofano, podem ser diferencialmente desreguladas em estágios anteriores *versus* estágios posteriores do desenvolvimento humano. Além disso, perfis metabólitos of células precursoras neurais ou populações de células neuronais podem revelar biomarcadores de distúrbios neurodesenvolvimentais em tipos de células alvo. A associação de metabolômica a biologia de células-tronco pode informar os mecanismos de ação de ácido fólico e defeitos do tubo neural no embrião humano inicial.

Portfolios de biomarcadores produzidos usando os métodos dependentes de hESC e dependentes de células específicas de linhagens derivadas de hESC desta invenção também podem ser usados em métodos de triagem de produção elevada para a avaliação pré-clínica de fármacos candidatos e compostos de ponta na descoberta de fármacos. Este aspecto dos métodos inventivos produz um impacto mínimo sobre os recursos da indústria em comparação com os modelos de toxicologia desenvolvimental atuais,

porque a implementação deste tecnologia não requer animais experimentais. O impacto positivo resultante sobre a produtividade permite que as equipes de pesquisa na indústria farmacêutica selecionem e antecipem compostos no desenvolvimento exploratório com uma maior confiança e um risco diminuído de entrar efeitos desenvolvimentais adversos.

O termo "via desenvolvimental" como usado aqui refere-se a via desenvolvimental ou metabólica em desenvolvimento embriônico e fetal.

"Sobrenadante" como usado aqui por incluir, mas não é limitado a meios extracelulares, meios co-cultivados, células, ou uma solução de células fracionadas ou lisadas.

Os perfis metabólitos celulares obtidos da análise de toxinas, teratogênicos, álcool, e compostos químicos de teste podem ser usados para compor uma biblioteca de portfolios de biomarcadores. Estes portfolios então podem ser usados como uma referência para a análise toxicológica de compostos químicos desconhecidos. Uma estratégia similar foi validada como um meio para determinar as mudanças celulares que surgem em resposta a produtos químicos em sistemas não ESC (Daston & Nacliff, 2005, *Reprod Toxicology* 19:381-94; Fella et al., 2005, *Proteomics* 5: 1914-21). Os perfis metabólicos de novos compostos podem ser comparados a portfolios de biomarcadores conhecidos para identificar mecanismos comuns de resposta tóxica. Esta abordagem pode revelar marcadores funcionais de resposta tóxica, que servem como moléculas de triagem que são compartilhadas, pelo menos em parte, como uma consequência de exposição a vários compostos tóxicos e teratogênicos diferentes. Estas moléculas pequenas derivadas de hESC podem ser usadas com mediadores mensuráveis de resposta tóxica que refinem ou substituem os sistemas de triagem onerosos e complexos (como em modelos de animais *in vivo*) e tem a vantagem adicional de serem específicos para células humanas e vias metabólicas e desenvolvimentais humanas.

Exemplos

Os exemplos que seguem são ilustrativos de formas de realização específicas da invenção, e vários usos das mesmas. Eles são enunciados para fins explanatórios apenas, e não devem ser tomados como

5 limitação da invenção.

Exemplo 1

Triagem de toxicologia desenvolvimental

Para demonstrar a eficácia de hESCs como um sistema de modelo para teste de toxicidade desenvolvimental, hESCs foram tratadas com

10 um conhecido teratogênio, valproato (VPA). Valproato é um estabilizador de humor comum e fármaco anti-convulsiva com indicações clínicas em epilepsia e distúrbio bipolar (Williams et al., 2001, Dev Med Child Neuro 43:202-6) que foram associados com anormalidades desenvolvimentais (Meador et al., 2006, Neurology 67: 407-412). O mecanismo pelo qual

15 valproato produz defeitos desenvolvimentais, no entanto, não é completamente entendido, apesar da suscetibilidade aumentada do sistema nervoso (Bjerkedal et al., 1982, Lance 2j.109; Wyszynski et al., 2005, Neurology 64_1961-5; Rasalam et al., 2005, Dev Med Child Neuro 47:551-555). Exposição a valproato resulta em um aumento pronunciado em defeitos

20 de espinha bífida e tubo neural (NTDs; Bjerkedal et al., 1982, Lancet 2:109) em dez a vinte vezes os da população geral, bem como distúrbio cognitivo como autismo (Adab et al., 2004, J Neurol Neurosurg Psychiatry 15 575-83). Entretanto, uma vez que VPA é um fármaco anti-convulsivo com indicações clínicas em epilepsia e distúrbio bipolar (Williams et al., 2001, Dev Med

25 Child Neurol 43:202-06), tratamento geralmente deve ser mantido durante toda a gravidez.

Suplementação com ácido fólico antes de gravidez reduz a incidência de espinha bífida em 70% (Shaw et al., 1995, Epidemiology 6j219-226) embora seu mecanismo preciso de ação seja desconhecido. Além disso,

homocisteína e glutathione também têm sido implicadas em NTDs (Zhao et al., 2006, Birth Defects Res A Clin Mol Teratol 76:230-6). Deste modo, perfis metabólitos de folato e vias relacionadas foram candidatos para mudanças em resposta a valproato. Nos resultados enunciados aqui, ácido fólico foi

5 significativamente aumentado (por 16%) nos meios de cultura extracelular de células hES tratadas com valproato ($p = 0,022$ em oito dias, Tabela 3 e Figura 4) mas não seu diidrofolato derivado. Uma vez que células de mamífero não sintetizam ácido fólico, valproato pode agir interferindo com a absorção celular de ácido fólico.

10 Exposição de hESCs foi realizada como segue. H1 hESCs (passagem 41) foram cultivadas em Matrigel (BD Scientific, San Jose, CA) na ausência de uma camada alimentadora. hESCs foram mantidas em meio de cultura condicionado (CM) coletado de fibroblastos embriônicos de camundongo (MEFs) (80% DMEM/F12, Invitrogen, Carlsbad, CA) e 20% de

15 substituição de soro KNOCKOUT (Invitrogen) suplementados com L-glutamina 1 mM (Invitrogen), MEM a 1% de aminoácidos não essenciais (Invitrogen), e 2- mercaptoetanol 0,1 mM (Sigma, Chemical Co., SL Louis, MO). Antes de alimentar hESCs, o meio de cultura foi suplementado com 4 ng/mL de fator de crescimento de fibroblastos básico recombinante humano

20 (Invitrogen). hESCs foram passadas quando as fontes foram ~80% confluentes. Para passagem, hESCs foram incubadas em uma solução de 1 mg/mL de dispase (Invitrogen)/DMEM/F12 por 7-10 minutos a 37°C. Após este tratamento, hESCs foram lavadas e semeadas em placas revestidas de Matrigel fresco. Em estudos paralelos descritos aqui, células de H1 e H9

25 foram cultivadas em meio de cultura definido conhecido como TeSR (Ludwig et al., 2006, Id.).

hESCs H1 e H9 (equivalentes a NIH código WA01/WA09) foram tratadas com valproato (VPA) (22µM e 1 mM) (Sigma # P4543) de acordo com procedimento resumido abaixo; cada experimento envolveu três

tratamentos com VPA separados, e cada grupo de tratamento teve um grupo de controle paralelo com um total de seis pratos de cultura de 6 cavidades (Nunc, Naperville, IL) por experimento (dois discos de cultura de 6 cavidades por tratamento). Tratamento 1 (rotulado 24H) células de hESC expostas a 1 mM de VPA (Sigma) durante 24 horas seguidas por coleta de sobrenadante e grânulos de células. Em um segundo grupo de tratamento (rotulado 4D), células de hESC foram expostas a 22 μ M ou 1 mM VPA durante 4 dias e coletadas no dia 4. Em um terceiro grupo de tratamento (rotulado cultura estendida, EC), células de hESC receberam 22 μ M ou 1 mM VPA durante 4 dias seguido por cultura em meios de hESC padrão por quatro dias adicionais. Para este grupo, células e sobrenadante foram coletados no dia oito.

Para avaliar os efeitos de tratamento de VPA teratogênico em hESCs, as células tratadas foram analisadas como especificado abaixo para determinar mudanças em um conjunto dinâmico total de moléculas pequenas presentes em células de acordo com estados de saúde e doença ou de insulto. Moléculas pequenas incluindo mas não limitadas a açúcares, ácidos orgânicos, aminoácidos, ácidos graxos, hormônios, vitaminas, oligopeptídeos (menos do que cerca de 100 aminoácidos em comprimento), bem como fragmentos iônicos dos mesmos e compostos de peso molecular baixo de sinalização foram conhecidos como participando em e revelando mecanismos funcionais de resposta celular a insulto patológico ou químico. Estas análises também foram usadas para identificar vias ativas seguindo mudanças moleculares previstas por outras análises incluindo *por exemplo* transcriptômica e proteômica.

Sobrenadante de hESCs tratadas com VPA e de controle foi submetido a cromatografia de líquido e tempo de ionização por eletropulverização de espectrometria de massa por tempo de voo (LC/ESI-TOF-MS) para avaliar mudanças e diferenças em moléculas pequenas (como definido aqui) produzidas pelas células na presença e ausência de tratamento

de VPA. Sobrenadante foi coletado das placas de controle e tratadas de hESCs a 24H, 4D, e 8D, e CM foi coletado como um controle "sem tratamento". O sobrenadante e meios de cultura foram armazenados a -80°C até preparação para análise de espectrometria de massa. Para análise, amostras
5 foram preparadas em uma solução de 20% de Acetonitrila (Fisher Scientific Co., Pittsburgh, PA) (compreendendo 500 µL de sobrenadante, 400µL de acetonitrila e 1,1 mL de água destilada) e centrifugadas através de uma coluna de Centricon Millipore 3kDa (Millipore, Billerica, MA) por 3 horas a 4575 x g para remover as proteínas. O fluxo completo foi retido para análise, pois
10 continha moléculas pequenas livres de compostos de peso molecular grande como proteínas. Em cada análise, três replicas para cada amostra foram injetadas em uma coluna de C18 de 2,1 x 200mm usando um gradiente de 90 minutos de 5% de Acetonitrila, 95% de Água, 0,1% Ácido Fórmico para 100% de Acetonitrila, 0,1% de Ácido Fórmico a uma taxa de fluxo de
15 40µL/min. ESI-TOF-MS (TOF) foi realizada no fluxo completo usando um espectrômetro de massa Agilent ESI-TOF. Dados foram coletados a 100-3600 m/z, e particularmente na faixa de 0-1500 m/z. Os dados de material foram analisados para identificar as moléculas pequenas separadas usando um programa de compilação e análise de computador (Mass Hunter) fornecido
20 pelo fabricante e de acordo com instruções do fabricante (Agilent; análises estatísticas foram realizadas como descrito abaixo na Descrição Detalhada e Formas de realização Preferidas. Esta análise gerou listas de aspectos de pares com tempo de retenção/massa exata. Outro programa (Mass Profiler, Agilent) foi usado para comparar conjuntos de ciclos múltiplos para encontrar
25 mudanças de intensidade iônica de aspectos que mudaram entre as condições de amostra. Testes de significância foram determinados executando ANOVAs no valores de abundância transformados de base log 2 de compostos únicos presentes em meios tratados e não tratados a cada ponto de tempo.

A pluralidade de moléculas pequenas identificadas

usando estes métodos foi então comparada com massa exata e tempo de retenção de ESI-TOF-MS usando bases de dados públicas (por exemplo, em <http://metlin.scripps.edu>, www.nist.gov/srd/chemistry.htm; <http://www.metabolomics.ca/>). Análise de espectrometria de massa também

5 inclui estruturas químicas previstas de moléculas pequenas baseadas em massa exata, apesar de bases de dados públicas disponíveis presentemente não incluírem, em cada exemplo, moléculas pequenas correspondentes devido às limitações da base de dados. Além disso, bases de dados privadas mais abrangentes são disponíveis para análises comparativas, como
10 NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library: Versão 05. NIST ASCII.

Os resultados destas análises são mostrados em Figuras 1A a 1C e Figura 2A a 2C. Em Figuras 1A a 1C, cada aspecto no gráfico corresponde a uma molécula pequena com massa exata específica e tempo de retenção. Os gráficos resumem diferenças significantes encontradas entre
15 grupos tratados (azul) e não tratados (vermelho) em diferentes pontos de tempo. Como mostrado na Figura, em 24 horas (24H) existia uma regulação negativa consistente das biomoléculas secretadas em células tratadas (azul) em comparação aos controles não tratados (vermelho). Em quatro dias (4D) e oito dias (8D), células tratadas (azul) secretaram um número maior de
20 moléculas pequenas em comparação com células não tratadas (vermelho); referidas moléculas pequenas foram assim consideradas como biomarcadores candidatos. Em particular, metabólitos da via folato, incluindo tetraidrofolato (massa exata 444) e diidrofolato (massa exata 441) foram detectados. Estas descobertas foram consideradas significantes porque elas mostram pela
25 primeira vez que hESCs tratadas com um teratogênio conhecido (VPA) que causa um defeito congênito (espinha bífida) respondeu por uma regulação de modo positivo a uma via metabólica que produz um composto (folato) conhecido como melhorando os efeitos de teratogênio quando administrado a uma mulher grávida de um embrião em desenvolvimento ou feto.

Além disso, os resultados mostrados em Figuras 1A a 1C revelaram aproximadamente 40 moléculas pequenas que estavam ausentes em grupos tratados, sugerindo que vias celulares múltiplas foram "silenciadas" em resposta a VPA em 24 horas em comparação com controles não tratados.

5 Em quatro e oito dias após tratamento, entretanto, candidatos de biomarcadores múltiplos foram regulados de modo positivo em células-tronco embriônicas humanas tratadas versus não tratadas; estes resultados são mostrados em Tabela 1. biomarcadores candidatos foram identificados como moléculas pequenas mostrando uma mudança em células tratadas versus
10 células não tratadas medidas como tendo uma diferença de pelo menos duas vezes. Em muitos exemplos, estas moléculas pequenas estão ausentes ou detectadas em concentrações muito baixas em células-tronco embriônicas humanas não tratadas.

Esses estudos demonstraram que os métodos reivindicados
15 para avaliar a toxicidade desenvolvimental e a identificação de biomarcadores usando hESCs proveu informação robusta em mudanças em teor de molécula pequena de células em resposta a serem contatadas com um teratogênio conhecido, VPA. Os resultados relativos a um composto (VPA) que está envolvido na etiologia de espinha bífida e defeitos de tubo neural
20 (NTDs)(Bjerkedal et al., 1982, Lancet 2: 109) quando exposto a um *conceptus* humano em desenvolvimento são particularmente surpreendentes. Os resultados mostrados aqui indicaram um aumento marcado (2 a 8 vezes) em metabólitos chave da via de folato (ácido diidrofólico, ácido tetraidrofólico, S-adenosilmetionina) seguindo tratamento com VPA (em
25 comparação com células não tratadas). Estes métodos foram reproduzíveis, tendo sido repetidos com resultados consistentes obtidos em três estudos independentes usando hESCs e em células não embriônicas (fibroblastos humanos) como controles (dados não mostrados), e sugeriram um resposta adaptiva até agora desconhecida do feto para o insulto químico/ambiental e

identificaram marcadores sensíveis para referido(s) insulto(s).

O mecanismo para defeitos desenvolvimentais de VPA, entretanto, não é completamente entendido apesar do fato de que o sistema nervoso é particularmente sensível a seus efeitos (Bjerkedal et al, 1982, *Lancet* 2:109; Narita et al, 2000, *Pediatric Res* 52:576-79; Rasalam et al., 2005, *Dev Med Child Neurol* 47:551-55). Suplementação com ácido fólico antes de gravidez previne a incidência de espinha bífida em 70% (Shaw et al., 1995, *Epidemiology* 6:219-226), apesar do mecanismo exato de ação ser também desconhecido. A informação obtida aqui pode ser usada para elucidar mecanismos de ação de ácido fólico e defeitos de tubo neural no embrião humano inicial. Estes métodos também podem ser aplicados a outros teratogênicos conhecidos, como ácido retinóico, warfarina, e talidomida (Franks et al., 2004, *Lancet* 363: 1802-11) para validar a habilidade previsora de hESCs usando os métodos da invenção.

Tabela 1 : Moléculas pequenas candidatas (biomarcadores) de toxicidade desenvolvimental detectadas em células-tronco embriônicas humanas não diferenciadas tratadas com 1 mM valproato em comparação com controles não tratados.

Mudança em hESCs tratadas com VPA em comparação com controles não tratados					
massa exata	RT	24 Horas	4 Dias	8 Dias	Biomarcador candidato
355,066	16		ASCEN-DENTE		SAM S-ADENOSILMETIO NINAMINA
355,12	30		ASCEN-DENTE		SAM
381,1574	12		ASCEN-DENTE	ASCEN-DENTE	GLUTATIONA
398,21	39	DESCEN-DENTE	ASCEN-DENTE		SAM OXOBUTANOATO
441,8831	12			ASCEN-DENTE	ACIDO DIIDROFÓLICO
444,1729	17		ASCEN-DENTE	ASCEN-DENTE	ÁCIDO TETRAHIDROFÓLICO
472,16	17	ZERO	ASCEN-DENTE	ASCEN-DENTE	TETRAIDROFOLATO
612,15	17	DESCEN-DENTE	DESCEN-DENTE	ASCEN-DENTE	GLUTATIONA OXIDADA

RT= tempo de retenção

A detecção de molécula pequena foi conduzida com LC/ESI-TOF-MS em amostras triplicadas de sobrenadantes processadas independentemente.

Como discutido acima, perfis metabólitos foram determinados

em 24 horas, quatro dias e oito dias após tratamento com valproato. Em quatro dias após tratamento, biomarcadores candidatos múltiplos foram regulados de modo positivo em células-tronco embriônicas humanas tratadas versus não tratadas (mostrado em Figuras 2A a 2C). Além dos resultados enunciatos acima com respeito a níveis aumentados de alguns metabólitos, picos de metabólitos múltiplos foram regulados de modo negativo em resposta a valproato em 24 horas em comparação com controles não tratados (Figuras 2A a 2C).

hESCs foram cultivadas em meio condicionado de fibroblastos embriônicos de camundongo, que geraram 1277 dos 3241 compostos medidos. Muitos metabólitos em desenvolvimento de humanos e doenças estão provavelmente presentes em meio condicionado de fibroblastos embriônicos de camundongos devido às vias metabólicas comuns. A investigação rigorosa é requerida para validar biomarcadores candidatos que não são exclusivos para hESCs e também estão presentes nos meios.

Exemplo 2

Análise de Expressão de Gene

A eficácia de uma análise mostrada no Exemplo 1 foi confirmada pelos estudos de expressão de gene, em que mudanças em expressão de genes foram observadas seguindo tratamento com VPA de hESCs. Tratamento com VPA não foi prejudicial a hESCs, que se mantiveram viáveis para passagens múltiplas após a exposição a teratogênio, assim possibilitando análise de expressão de genes a ser realizada .

Células WA01 de hES código H1/NIH tratadas e de controle (passagem 41) foram analisadas por PCR de tempo real, e cada grupo de tratamento foi dividido aos pares com um grupo de controle correspondente que recebeu a combinação de meios de cultura de crescimento padrão de CM+bFGF sem VPA. Nesses estudos, RNA celular total foi extraído de células coletadas em 24 horas (24H), 4 dias (4D) e 8 dias (EC) usando o Kit

RNA Easy (Qiagen, Valencia, CA) de acordo com as instruções do fabricante.

Níveis de expressão de genes de teste candidatos e um gene "housekeeping" (Beta-2- microglobulina) foram avaliados por PCR de tempo real quantitativo usando um sistema de detecção DNA Motor-Opticon 2 (MJ Research, Watertown, MA). O gene "housekeeping" atua como um controle interno para normalização de níveis de RNA. Os iniciadores usados para reações de PCR em tempo real foram projetados usando software Beacon Designer (Premier Biosoft International, Palo Alto, CA). RNA foi transcrito reverso usando kit de síntese de cDNA iScript (Bio-Rad, Hercules, CA), em que cada reação de síntese de cDNA (20 µL) incluiu 4 µL de 5x mistura de reação iScript, 1 µL de transcriptase reversa iScript, e 2 µL de RNA. PCR foi realizado em cDNA em misturas de reação de PCR (25 µL) cada contendo 12,5 µL de Supermix (contém dNTPs, taq DNA polimerase, SYBR Green I, e fluorescina), 250 nM de iniciador dianteiro, 250 nM de iniciador reverso, e 1,6 µL de produtos de RT-PCR. Análise de curva de fusão e de eletroforese de gel de agarose foram realizadas após reação de PCR de tempo real para monitorar a especificidade de PCR, em que os produtos de PCR foram detectados com SYBR Green I usando o Kit iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad).

Quantificação da expressão relativa de PCR de tempo real foi realizada usando o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak & Schmittgen, 2001, *Methods* 25:402-8), e um modelo linear geral foi empregado para se adequar aos dados de expressão. O procedimento PROC GLM em SAS (versão 8,2; SAS Institute, Cary, NC) foi usado para estimar as médias de mínimos quadrados em expressão entre hESCs tratadas e não tratadas e $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

PCR de tempo real foi conduzido em amostras de 24 horas (24H), 4 dias (4D) 25 e 8 dias (EC) após tratamento com VPA para investigar os níveis de expressão de reguladores epigenéticos (tais como DNA

metiltransferase-1, DNMT-1, BMI-1, EED) e fatores de transcrição críticos responsáveis por padronização embriônica e neurodesenvolvimento (RUNX2, BMP7, FGF8, CBX2, GLI3, SSH e SP8) em células-tronco embriônicas humanas. Estes experimentos mostraram que hESCs tratadas com VPA foram submetidas a mudanças marcadas em sua atividade transcripcional após o tratamento com teratogênio. VPA induziu regulação de modo negativo especialmente marcada (2 a 30 vezes) de níveis de transcrição logo em 24 horas após exposição em todos genes testados (com a exceção de DNMT-1 e Shh). Em 4 dias após tratamento, entretanto, expressão da DNMT-1 ubíqua foi quase abolida, e "sonic hedgehog", que é absolutamente crítico para neurogenese (Ye et al, 1998, Cell 93:755-66), foi regulado de modo negativo cinco vezes em comparação com controles não tratados. Em 8 dias após tratamento de VPA, a maioria dos genes foram regulados de modo positivo em comparação com controles não tratados.

Estes resultados corporificam duas implicações principais para toxicologia desenvolvimental. Primeiro, VPA induziu mudanças persistentes em moduladores epigenéticos chaves que também participam em diferenciação de outros tecidos, como DNMT-1 e o membro EED de família *polcomb*. Segundo, os efeitos de teratogênios persistiram em hESCs durante estágios críticos de neurogenese e organogenese. Por exemplo, genes cuja expressão foi afetada como mostrado aqui (incluindo "sonic hedgehog" e FGF-8) são conhecidos como sendo reguladores mestres de diferenciação de neurônios serotonérgicos no cérebro (Ye et al., 1998, Cell 93:755-66). De importância particular é o fato de que a expressão de DNMT-1 é quase abolida em quatro dias após tratamento. *In vivo*, a desregulação desta enzima é letal para embriões, uma vez que é a principal metiltransferase de manutenção durante a replicação de DNA (Li et al, 1992, Cell 69:915-26).

Seguindo exposição a teratogênio, alterações específicas temporais em expressão de gene desenvolvimental foram observadas. Genes

desenvolvimentais diferem em sua suscetibilidade para teratogênios em tempos diferentes. Esta indicação pode ser crítica para entender a especificidade de desreguladores epigenéticos em alguns órgãos ou tecidos. RUNX2, por exemplo, é um ativador transcripcional de desenvolvimento ósseo (Napierala et al., 2005, *Mol Genet Metab* 86:257-68), e é mais sensível a regulação de modo positivo mediada por VPA em estágios muito prematuros ou tardios após a exposição. Resultados de PCR de tempo real de hESCs descritas aqui foram correlacionados a resultados anteriores *in vivo* em camundongos (Okada et al., 2004, *Birth Defects Res A CHN Mol Teratol* 70:870-879) e ratos (Miyazaki et al, 2005, *Int J Dev Neurosci* 23:287-97). Nestes estudos de animal, VPA inibiu a expressão de genes Polycomb, Eed, Bmi1 e Cbx2 e induziu regulação de modo negativo de Shh enquanto níveis de FGF8 permaneceram inalterados. Os resultados mostrados aqui em quatro dias seguindo tratamento de VPA (Tabela 2) foram consistentes com essas observações usando outros sistemas de modelo desenvolvimentais.

Tabela 2: Tratamento com VPA 1 mM resultou em mudanças marcadas na expressão de reguladores epigenéticos e genes desenvolvimentais que são críticos para a padronização embrionária e a diferenciação de neurônios.

<i>Gene</i>	<i>Controle 1-24H</i>	<i>2-24H tratado VPA</i>	<i>Controle 3-4D</i>	<i>4-4D tratado VPA</i>	<i>Controle 5-EC</i>	<i>6-EC tratado VPA</i>
BMI-1	0,543	0,252	1,651	0,112	1,020	1,071
DNMT1	0,664	0,624	1,742	0,002	0,731	1,124
EED	0,757	0,342	1,501	0,185	1,381	1,769
H19	0,207	0,006	0,144	0,846	10,660	2,756
RUNX2	0,325	1,769	5,198	4,020	1,177	2,434
BMP7	0,511	0,093	0,397	0,342	0,731	1,664
FGF8	2,544	0,801	0,384	0,314	0,16	0,837
CBX2	1,113	0,245	1,221	1,1881	0,81	1,946
GLI3	0,202	0,015	0,016	0,774	0,950	1,918
Shh	0,562	0,562	2,772	0,533	1,369	---
SP8	0,49	0,235	0,25	1,703	2,132	5,808

Níveis de expressão de gene expressão são relativos a um gene de "housekeeping" (gene alvo/Beta-2-Microglobulina).

Exemplo 3

20 Metaboloma de célula-tronco embrionária humana: Perfis metabólitos

seguindo exposição a teratogênio

Exposição de células hES ao valproato de teratogênio induziu mudanças significantes em diferentes vias metabólicas, incluindo vias importantes durante a gravidez e desenvolvimento. Um via metabólica alternativa ativada durante gravidez é mostrada na Figura 5, em que triptofano é convertido em quinurenina. Para investigar este aspecto da invenção, hESCs foram cultivadas como descrito no Exemplo 1, e o procedimento para tratamento com valproato foi realizado como descrito desta maneira. Tratamento 1 (24 horas) expôs as células hES a 22 μ M de valproato durante 24 horas seguido por coleta de sobrenadante e grânulos de células. No grupo de tratamento (4 dias), células hES foram expostas a 22 μ M de valproato por 4 dias e coletadas no dia 4. No terceiro tratamento ou cultura estendida (EC, 8 dias), células hES receberam valproato por 4 dias seguido por cultura em meios de cultura celular de hES padrão por um adicional de quatro dias. Células e sobrenadante foram coletados no dia oito. Cada tratamento teve um grupo de controle paralelo com um total de seis culturas de discos de 6 cavidades por experimento (dois discos de cultura de 6 cavidades por tratamento).

Análise de metaboloma foi realizada como descrito no Exemplo 1 (Wu e McAllister, 2003, *J Mass Spectrom* 38: 1043-53). Misturas complexas foram separadas por cromatografia de líquido (LC) antes de espectrometria de massa de tempo de voo (TOF) de ionização por eletropulverização (ESI) de acordo com métodos descritos nesse Exemplo e Exemplo 1. Software Mass Hunter (Agilent) foi aplicado para desconvolutar os dados e determinar a abundância de cada massa. Dados foram extraídos do espectro de massa completo usando a faixa m/z de 0 a 1500 e a picos de massa mais abundantes de 2 milhões de topo de cada amostra foram usados para desconvolutar os dados. A razão mínima de sinal-ruído foi fixada em 5. As massas com uma abundância relativa mínima maior que 0,1% foram

exportadas do software Mass Hunter e usadas para outras análises.

hESCs tratadas com 22 μ M de valproato resultaram em 3.241 sinais de massa detectados em 42 injeções. Do total de 3.241 sinais de massa detectados nestes experimentos, 1.963 compostos foram medidos exclusivamente em células hES e 1.278 compostos também estavam presentes em meio condicionado; 443 destes foram apenas medidos em 1 de 42 injeções. 110 compostos (3%) tiveram diferenças estatisticamente significantes em pelo menos um ponto de tempo em hESCs tratadas com valproato comparados com controle. Mudanças de vezes tão elevadas quanto sete- a treze - vezes foram medidas após tratamento com valproato, mas estes sinais de massa exibiram alta variabilidade em todos os experimentos. Massas representativas identificadas seguindo tratamento de células com 1 mM e 22 μ M de VPA são resumidas em Tabelas 3 e 4, respectivamente. Vários picos (1 ,963) foram detectados em células hES mas não em meio condicionado. Uma dessas moléculas pequenas foi quinurenina, um composto produzido por uma via metabólica de triptofano alternativa, ativada durante gravidez e resposta imune. Os níveis de quinurenina aumentaram por 44% (valor de p = 0,004 em quatro dias, Tabela 5) seguindo tratamento com valproato. Quinurenina foi detectada exclusivamente em células hES e estava ausente em meio condicionado. A identidade química deste pico foi confirmada por espectrometria de massa comparativa na presença do padrão químico (Figura 4).

Os resultados destes experimentos sugeriram que quinurenina é um biomarcador candidato para distúrbios neurodesenvolvimentais, em particular aqueles originados por exposição do embrião humano a fármacos anti-epiléticos como VPA (Omoy et al., 2006, *Reproductive Toxicol* 21.: 399-409). Surpreendentemente, estudos recentes têm sugerido que metabolismo de quinurenina pode ser um novo alvo para o mecanismo de ação de fármacos anti-epiléticos (Kocki et al., 2006, *Eur J Pharmacol* 542:147-51). Distúrbios

cognitivos e comportamentais são efeitos adversos conhecidos de exposição a anti-epiléticos durante a gravidez. Triptofano é o precursor de serotonina, um neurotransmissor chave na patogênese destas e de outras doenças, como depressão. Além disso, níveis de plasma aumentados de quinurenina foram ligados à depressão pós-parto (Kohl et al., 2005, *J Affect Disord* 86_135-42). A alteração em metabolismo de triptofano detectado aqui é um meio para examinar novos mecanismos em patogênese de distúrbios comportamentais relacionados a serotonina como autismo (Chugani, 2004, *Merit Retard Dev Disabil Res Rev* 10- 112-116). Um aumento em níveis de quinurenina durante desenvolvimento pode reduzir a biodisponibilidade de triptofano e conseqüentemente serotonina, conduzindo a disfunção cognitiva.

Glutamato e ácido piroglutâmico foram também elevados em hESCs tratadas com valproato. Glutamato e ácido piroglutâmico foram elevados em resposta a valproato (20% e 27%, respectivamente), apesar de apenas ácido piroglutâmico demonstrar mudanças estatisticamente significantes ($p=0,021$ em 4 dias, Figuras 3 A a 3D). Glutathione (GSH) é metabolizada por gama-glutamyl transpeptidase em glutamato, um neurotransmissor de receptores de NMDA, e cisteinilglicina (Cys-Gly). Glutathione (massa neutral exata 612,15) e S-adenosil-homocisteína (massa neutral exata 384,12) foram detectadas em níveis muito baixos em comparação a outros sinais de massa (dados não mostrados). Para estes experimentos de detecção de nível baixo, moléculas pequenas foram identificadas por ESI-TOF-MS comparativos com padrões químicos que alcançaram "picos" em meios condicionados em diferentes concentrações e usados para confirmar massas exatas neutrais e tempos de retenção de sinais de massa experimentais (Figuras 3 A a 3D). Massas exatas neutrais e/ou fórmulas químicas empíricas geradas por ESI-TOF-MS foram procuradas em bases de dados públicas (incluindo por exemplo <http://metlin.scripps.edu>., www.nist.gov/srd/chemistry.htm, www.metabolomics.ca) para compostos

candidatos.

Estes resultados sugeriram que valproato afeta a via de síntese de glutamato no embrião humano desenvolvido. A afinidade de fármacos anti-epiléticos com respeito a alvos de glutamato foi previamente sugerida (Rogawski e Loscher, 2004, *Nat Rev Neurosci* 2004 5:553-64). Níveis anormais de metabólitos de glutamato foram medidos em soro materno e fluido amniótico de mulheres grávidas cujas crianças foram diagnosticadas com espinha bífida (Groenen et al., 2004, *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.*; 112:16-23) com ressonância magnética nuclear (RMN). Os níveis de glutamina e hidroxiprolina foram significativamente maiores em NTDs, e como um resultado os métodos de hESC dados aqui provêm um meio robusto para modelar as alterações *in vivo* de desenvolvimento.

Tabela 5. Mudanças em perfis metabólicos de quatro compostos em células hES tratadas com 10 valproato versus controles não tratados em 24 horas (24h), 4 dias (4D), e oito dias (8D) após tratamento.

Molécula	24h		4D		8D		Massa	RT
	valor P	24h duplic.	valor P	4D duplic.	valor P	8D duplic.		
ácido piroglutâmico	0,242	57% diminuição 3%	0,021	27% aumento	0,917	3% diminuição 16%	129,0426	19,9
ácido fólico	0,638	aumento 1%	0,626	4% aumento 24%	0,022	aumento 10%	441,1395	32,7
Glutamato	0,969	aumento 29%	0,108	aumento 44%	0,651	aumento	147,0535	20,0
quinurenina	0,087	aumento	0,004	aumento	N,D,	N,D,	208,0850	25,9

RT= tempo de retenção

Mudanças na duplicação são representadas como diferença de porcentagem das médias dos mínimos quadrados de células hES tratadas com valproato e não tratadas, valores de p foram determinados por ANOVA. A massa é uma massa neutra média detectada por ESI-TOF-MS e RT é o tempo de retenção médio em que a molécula eluiu. Valores P menores do que 0,05 estão em negrito.

Exemplo 4

Quinurenina: Biomarcador para diagnose e tratamento de toxicidade desenvolvimental e distúrbios de sistema nervoso central

Quinurenina foi mostrada no Exemplo 3 como sendo detectada em células hES tratadas com valproato. Quinurenina (junto com glutamato e

ácido piroglutâmico) foi diferencialmente produzida em células-tronco embriônicas humanas tratadas com valproato (hES) versus controles.

Quinurenina é um novo biomarcador utilizável para a identificação de distúrbios neurodesenvolvimentais em crianças e toxicidade desenvolvimental *in vitro* de produtos químicos . Este exemplo descreve a identificação de biomarcadores para distúrbios neurodesenvolvimentais, incluindo produtos celulares diferencialmente produzidos em hESCs tratadas com teratogênio.

O aminoácido triptofano (TRP) é um precursor da serotonina de neurotransmissor, um mediador chave de numerosos distúrbios do sistema nervoso central, como depressão, neurodegeneração e diminuição da capacidade cognitiva. Catabolismo de triptofano no ácido quinurênico é uma via alternativa para metabolismo de triptofano (Figura 5), que é ativado em circunstâncias específicas como resposta inflamatória ou gravidez. Regulação de modo positivo da via quinurenina está correlacionada com psicose em doenças de adultos como esquizofrenia e distúrbio bipolar, uma indicação que níveis aumentados de via intermediária podem alavancar traços psicóticos (Miller et al., 2006, *Brain Res* 16:25-37). Significativamente, metabolismo usando a via quinurenina é acompanhado por metabolismo de triptofano decaído usando a via de serotonina (na ausência de triptofano exógeno, um aminoácido essencial não sintetizado por mamíferos incluindo homem). Um aumento em níveis de quinurenina durante o desenvolvimento pode reduzir a biodisponibilidade de triptofano e conseqüentemente serotonina, conduzindo à disfunção cognitiva.

Além disso, ácido quinurênico (KYNA), um dos produtos finais desta via metabólica de triptofano, é um antagonista de neurotransmissão de glutamato e receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA). Estudos recentes têm demonstrado que ácido quinurênico é um dos alvos que podem servir como fármacos através de seu papel na ativação do GPR35 de

receptor de GPCR previamente órfão (Wang et al., 2006, *J Biol Chem* 281:22021-8). Ácido quinolínico (QUIN), outro produto de extremidade da via (Figura 5), e 3- hidroxiquinurenina, um intermediário, atuam como agentes neurotóxicos (Guillemin et al., 2005, *J Neuroinflammation* 26, 16; Chiarugui et al., 2001, *J Neurochem* 77, 1310-8). QUIN está envolvido na patogênese de mal de Alzheimer onde sua neurotoxicidade pode estar envolvida em inflamação diminuída e em convulsões interagindo com o complexo de receptor de N- metil-D-aspartato (NMDA), um tipo de receptor de glutamato (Guillemin et al., 2002, *J Neuroinflammation* 26:16, Nemeth et al., 2005, *Curr Neurovasc Res* 2, 249-60). Quinurenina (KYN), outra via intermediária, é sintetizada no cérebro e é transportada através da barreira sangue-cérebro (Nemeth et al., 2005, *Curr Neurovasc Res* 2:249-60). KYN é metabolizado para o ácido quinolínico neurotóxico (QUIN) e o ácido quinurênico neuroprotetor (KYNA) (Figura 5). Níveis de soro aumentado de KYN têm sido correlacionados a manifestação clínica de depressão com etiologias diferentes, como distúrbio pós parto (Kohl et al., 2005, *J Affect Disord* 86, 135-42) e tratamento com interferon-alfa (Capuron et al., 2003, *Biol Psychiatry* 54:906- 14V

Exposição de células hES a valproato, um desregulador de desenvolvimento humano, induziu mudanças significantes em diferentes vias metabólicas, incluindo a produção de quinurenina (massa neutral exata 208,08), que foi significativamente regulada de modo positivo em resposta a valproato como detectado por cromatografia de líquido e tempo de ionização por eletropulverização de espectrometria de massa por tempo de voo (LC/ESI-TOF-MS) como descrito no Exemplo 4. Adicionalmente, novas entidades químicas, tendo massas neutrais exatas de 328,058, 336,163, 343,080, foram detectadas e não estão ainda catalogadas nas bases de dados públicas.

Quando precursores neurais derivados de hESCs foram

expostos a 1 mM de valproato, uma diminuição marcada em ambos, serotonina (176,0946) e indolacetaldeído (159,0689), um subproduto à jusante de serotonina gerada por atividade de monoaminoxidase (MAO) foi observada (Tabela 6). Glutamato e ácido piroglutâmico ou hidroxiprolina (p=0,021) foram também elevados em células hES tratadas com valproato. Estes resultados sugerem que valproato afeta a via de síntese de glutamato no embrião humano em desenvolvimento. Esse achado emula neurofisiologia *in vivo*, onde compostos da via quinurenina modulam a atividade em receptores de glutamato de NMDA e produzem fenótipos epiléticos, incluindo ataques repentinos (Perkins e Stone, 1982, *Brain Res* 247: 184-187).

Como uma consequência de uma identificação de quinurenina aqui, inibidores químicos de síntese de quinurenina podem ser usados como novas terapêuticas em distúrbios de humor; por exemplo, moléculas pequenas que antagonizam 2,3-dioxigenase de indoleamina (IDO) ou atividades de formilase de quinurenina, que converte triptofano (TRP) em quinurenina (KYN). Inibição de catabolismo de TRP em KYN pode ser usada para melhorar os sintomas de doença em distúrbios cognitivos e neurodegenerativos aumentando os níveis de serotonina, através de síntese elevada deste neurotransmissor ou depleção reduzida através da via quinurenina.

Coletivamente, as mudanças de metabólito detectadas em células hES em resposta a valproato convergem funcionalmente em direção à vias de folato, quinurenina e glutamato. Figura 6 ilustra o agrupamento hierárquico das diferenças de mudança de duplicação de 22.573 massas singulares. Mudanças nas vias acima mencionadas foram consistentes e reproduzíveis em estudos independentes múltiplos de hESCs tratadas com VPA 1 mM, e precursores neurais produzidos a partir de hESCs (Figura 6).

Exemplo 5

Análise de Expressão de Genes de Via Quinurenina

A eficácia da análise no Exemplo 4 foi confirmada por estudos de expressão de gene, em que mudanças em expressão de genes foram observadas seguindo tratamento com VPA de hESC. Tratamento de valproato de células-tronco embriônicas humanas induziu uma regulação positiva marcada na quinurenina de molécula pequena, um metabólito intermediário no catabolismo de triptofano. Triptofano é o precursor do neurotransmissor serotonina (5HT). Deste modo, se expressão de enzimas no metabolismo de triptofano para quinurenina e sua via oposta, síntese de serotonina, foi alterada em células-tronco embriônicas humanas foi investigado para examinar as propriedades mecánísticas da via quinurenina e sua resposta a valproato.

Células-tronco embriônicas humanas tratadas com 1 mM valproato e controles não tratados foram coletadas em quatro dias após tratamento e armazenados a -80 °C antes de isolamento de RNA usando RNeasy (Qiagen). 5 µg de gabaritos de RNA foram transcritos reversos e amplificados (QIAGEN OneStep RT-PCR) de acordo com instruções do fabricante usando iniciadores projetados para transcrever as seqüências humanas dos seguintes genes: INDO, indoleamina 2,3 dioxigenase, TDO ou TDO2, triptofano 2,3- dioxigenase, AFMID, arilformamidase, TPH1, triptofano hidroxilase, a enzima limitante de taxa em biossíntese de serotonina, AADAT, aminoadipato aminotransferase, KYNU, quinunreninase, KMO, quinurenina 3-monooxigenase, GAPDH, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase.

Os resultados deste estudo mostraram que a maioria das enzimas na via quinurenina e síntese de serotonina foram expressadas em células hES em quatro dias após tratamento de células hES com 1 mM valproato (Figura 7). Indoleamina 2, 3 dioxigenase INDO, cataboliza triptofano na via quinurenina, e produz quinurenina como um produto de extremidade. A expressão de triptofano 2,3 dioxigenase (TDO ou TDO2) foi também examinada. TDO2, como INDO, catalisa a primeira etapa na via quinurenina. Esses dados sugerem que a expressão de TD02 foi regulada de

modo positivo em células hES tratadas com valproato em comparação com controles não tratados. A enzima limitante de taxa em síntese de 5HT, TPH1, foi também expressada em células hES (Figura 7). Expressão destas enzimas apoiou a conclusão de que células hES recapitulam vias metabólicas de catabolismo de triptofano e síntese de serotonina. De maneira interessante, VPA induziu expressão pronunciada de enzimas de limitantes de taxa nesta via.

Exemplo 6

Triagem de toxicologia desenvolvimental para exposição a álcool pré-natal

Para identificar os metabólitos diferencialmente secretados em resposta a álcool, bem como as vias envolvidas em síndrome de álcool fetal, células-tronco embriônicas humanas foram tratadas com 0, 0,1 e 0,3% etanol por quatro dias seguido por espectrometria de massa de LC/ESI-TOF de acordo com métodos principais descritos acima para valproato no Exemplo 1. Meios extracelulares foram coletados e processados em 24 horas e quatro dias após tratamento, e 49.481 sinais de massa foram detectados após três réplicas técnicas. Dentre os 49.481 sinais de massa, 1.860 compostos foram significativamente diferentes ($p < 0,05$) em pelo menos um tratamento e tiveram uma mudança de tempo significativa (< 1 ou > 1). (Tabela 7). Massas armazenadas foram anotadas *in silico* pesquisando massas neutrais em várias bases de dados diferentes. Estas bases de dados incluíram Metlin, Biological Magnetic Resonance Data Bank (BMRB), NIST Chemistry WebBook, Human Metabolome Database. A massa foi considerada identificada quando sua massa neutral estava dentro de 10 ppm de um composto conhecido anotado em uma destas bases de dados listadas acima.

O composto quinurenina putativo (massa neutral exata medida 208,0816) foi regulado de modo positivo três vezes no dia quatro, mas não 24 horas, em ambos os tratamentos (0,1 %, $p = 0,001$ e 0,3% $p = 0,002$, respectivamente). Outro metabólito putativo na via quinurenina, 8-

metoxiquinurenato (219,0532) foi também regulada de modo positivo em quatro dias em resposta a ambos, tratamento com álcool a 0,1% e 0,3% ($p < 0,05$). A análise também detectou uma regulação de modo negativo significativa de 5-hidroxi-L-triptofano (220,0848) em quatro dias seguindo tratamento com álcool a 0,3% ($p < 0,05$) em comparação com controles não tratados. 5-hidroxi-L-triptofano é o único metabólito intermediário entre triptofano e serotonina e sua síntese é mediada por triptofano hidroxilase, a enzima limitante de taxa em síntese de serotonina. Estes resultados sugerem que exposição a álcool durante desenvolvimento humano pode afetar biodisponibilidade de serotonina devido a regulação de modo positivo de catabolismo de triptofano em quinureninas. Além disso, exposição ao álcool induziu mudanças significantes em vias metabólicas e moléculas pequenas envolvidas em desenvolvimento neural como glutamato, gabapentina, adrenalina e glutatona.

Exemplo 7

Triagem de toxicologia desenvolvimental de células precursoras neuronais

Avaliação metabolômica de teratógenos em desenvolvimento embriônico não é limitado exclusivamente a hESCs. Os métodos da invenção são também utilizáveis com outras células-tronco progenitoras, incluindo células-tronco restritas na linhagem como células precursoras neurais. Para ilustrar a eficácia de triagem de toxicologia em células-tronco específicas de linhagem, precursores neuronais derivados de hESCs foram tratados com 1 mM valproato de acordo com métodos descritos no Exemplo 1.

Aproximadamente 135 compostos foram diferencialmente secretados em precursores neuronais tratados com VPA versus controle. (Ver Tabela 6). Os resultados desse estudo ilustraram que os métodos da invenção revelam alterações no perfil metabólico de células-tronco específicas de linhagem em resposta à exposição a teratogênio.

Os resultados descritos aqui estão enunciados nas seguintes tabelas.

Tabela 3: Metabólitos celulares medidos em células-tronco embrionárias humanas tratadas com 1 mM de valproato

EXP	RT	Massa arredondada	tempo	trt	Duplicação	Probt	anotação, 1	anotação, 2
1mM VPA	8,31910526	103,056358	4D	1mM VPA	1,987286671	0,01734377	Ácido gama-aminobutírico	
1mM VPA	6,78779869	103,098349	4D	1mM VPA	2,143101233	0,00047552	Ácido 2-aminoisobutírico	
1mM VPA	8,39854546	113,082093	4D	1mM VPA	16,4054129	0,01342684	1-Pirrolina-5-carboxílico ácido	
1mM VPA	11,7534444	120,043328	4D	1mM VPA	1,355758298	0,03951319	Ácido 3,4-Diidroxibutírico	
1mM VPA	85,7330833	121,088708	24H	1mM VPA	10,30519572	0,02442001	Feniletilamina	
1mM VPA	7,307128	122,071261	4D	1mM VPA	-2,2989897	0,01870947	Desconhecido	
1mM VPA	38,1047857	129,070626	8D	1mM VPA	3,023878137	0,03988213	ácido 2-cetobutírico; ácido 2-Oxobutírico; ácido alfa-cetobutírico; alfa-cetobutirato	
1mM VPA	14,2761702	136,038753	8D	1mM VPA	2,696709281	0,00083818	Hipoxantina	Alopurinol
1mM VPA	31,3610896	141,114252	8D	1mM VPA	1,865419366	0,02273706	Desconhecido	
1mM VPA	43,9201842	143,095482	8D	1mM VPA	2,064797071	0,03120757	ácido 1-Aminociclo-hexano carboxílico	
1mM VPA	51,283453	144,113677	24H	1mM VPA	4,820891632	0,02775836	Ácido caprílico	Ácido valpróico
1mM VPA	51,283453	144,113677	4D	1mM VPA	8,26720694	0,0011089	Ácido caprílico	Ácido valpróico
1mM VPA	16,307931	147,068314	4D	1mM VPA	-2,05380612	0,03872229	3-Metiloxiindol	
1mM VPA	16,307931	147,068314	24H	1mM VPA	-1,80875876	0,037812	3-Metiloxiindol	
1mM VPA	22,5095926	153,079352	4D	1mM VPA	-2,65737163	0,01268393	Dopamina	
1mM VPA	5,36288806	155,068364	8D	1mM VPA	-1,34957018	0,0476914	L-Histidina	
1mM	20,6395854	155,072941	4D	1mM	3,82298622	0,00676609	L-Histidina	

Tabela 3: Metabólitos celulares medidos em células-tronco embrionárias humanas tratadas com 1 mM de valproato

EXP	RT	Massa arredondada	tempo	trt	Duplicação	Probt	anotação,1	anotação,2
VPA				VPA				
1mM VPA	14,2071091	160,060653	8D	1mM VPA	12,348809	1,23E-06	Desconhecido	
1mM VPA	14,3670392	161,081539	8D	1mM VPA	4,777314979	0,0001252	Desconhecido	
1mM VPA	44,8165285	162,067353	4D	1mM VPA	1,640573238	0,01289447	Desconhecido	
1mM VPA	31,5154611	162,124096	24H	1mM VPA	1,911228139	0,01933211	Desconhecido	
1mM VPA	31,3624074	165,079533	8D	1mM VPA	1,705269784	0,00206584	ácido 4-(3-Piridil)-butanóico	
1mM VPA	32,0426154	167,094942	8D	1mM VPA	-2,20640862	0,01874726	Metildopamina	
1mM VPA	20,0098065	173,083484	4D	1mM VPA	5,458861144	0,00198632	2-Oxoarginina	
1mM VPA	15,3496532	177,082617	8D	1mM VPA	2,397781171	0,01291216	Desconhecido	Homofenilalanina
1mM VPA	24,1314286	179,094351	4D	1mM VPA	1,851635336	0,03464009	Salsinol	
1mM VPA	21,8046482	187,064183	8D	1mM VPA	2,839427352	0,00590774	Desconhecido	
1mM VPA	21,8046482	187,064183	4D	1mM VPA	3,356831218	1,24E-05	Desconhecido	
1mM VPA	23,317	187,08492	4D	1mM VPA	3,781608467	0,03987705	6-Acetamido-3-oxo-hexanoato	
1mM VPA	27,7865556	189,042631	8D	1mM VPA	2,865724657	0,02214848	ácido quinurénico	
1mM VPA	61,5462473	196,090684	4D	1mM VPA	3,519815968	0,01102697	Desconhecido	
1mM VPA	24,0551398	197,105003	4D	1mM VPA	2,231478645	0,00076838	L-Metanefrina	
1mM VPA	20,0989286	197,175657	8D	1mM VPA	4,237754463	0,00034728	Desconhecido	
1mM	73,9582188	198,16015	4D	1mM	2,039619449	0,01232495	ácido 5-Dodecenóico	

Tabela 3: Metabólitos celulares medidos em células-tronco embrionárias humanas tratadas com 1 mM de valproato

EXP	RT	Massa arredondada	tempo	trt	Duplicação	Probt	anotação,1	anotação,2
VPA				VPA				
1mM VPA	29,2935714	201,100569	4D	1mM VPA	5,966976107	0,00328699	Desconhecido	
1mM VPA	28,6036393	203,115212	8D	1mM VPA	1,872544495	0,00040874	Éster n-bútilico de ácido L-glutâmico	Acetilcarnitina
1mM VPA	9,07926923	209,06985	8D	1mM VPA	-12,4054314	0,01848957	4-Carboxifenilglicina	
1mM VPA	48,3434453	213,079468	8D	1mM VPA	2,512458907	0,02116099	Desconhecido	
1mM VPA	44,6001887	214,064259	4D	1mM VPA	1,446032522	0,02767084	Desconhecido	
1mM VPA	44,6001887	214,064259	8D	1mM VPA	1,783609761	0,00082206	Desconhecido	
1mM VPA	69,6687917	214,064356	24H	1mM VPA	1,316493137	0,0171064	Desconhecido	
1mM VPA	18,7504371	216,094569	4D	1mM VPA	2,349086763	0,01043169	Desconhecido	
1mM VPA	30,5773235	216,100485	4D	1mM VPA	2,050108123	0,04358571	Desconhecido	
1mM VPA	6,39474737	218,076897	4D	1mM VPA	1,737243521	0,02003307	Desconhecido	
1mM VPA	6,68071429	219,144891	24H	1mM VPA	-1,58008262	0,02066251	Desconhecido	
1mM VPA	10,5609423	220,085746	4D	1mM VPA	-2,39827983	1,63E-06	5-Hidroxitriptofano	
1mM VPA	53,8814512	222,078039	4D	1mM VPA	2,882259036	0,02550855	Desconhecido	
1mM VPA	73,0997018	223,049411	8D	1mM VPA	-4,31392173	0,04819747	7,8-Diidro-7,8-diidroxiquinurenato	
1mM VPA	6,45641791	229,095757	8D	1mM VPA	2,4471457	0,00094873	Malonilcarnitina	
1mM VPA	23,7927189	229,095855	4D	1mM VPA	2,057653416	0,00038761	Malonilcarnitina	
1mM	55,5371429	229,145042	4D	1mM	2,032140286	0,00236036	Desconhecido	

Tabela 3: Metabólitos celulares medidos em células-tronco embrionárias humanas tratadas com 1 mM de valproato

EXP	RT	Massa arredondada	tempo	trt	Duplicação	Probt	anotação,1	anotação,2
VPA				VPA				
1mM VPA	19,9783175	229,164555	8D	1mM VPA	3,779774064	1,34E-08	Desconhecido	
1mM VPA	32,6065714	229,201979	4D	1mM VPA	3,088058322	0,00439209	Desconhecido	
1mM VPA	9,79255	230,080163	4D	1mM VPA	-1,383766	0,02197836	Desconhecido	
1mM VPA	7,80846914	233,123128	8D	1mM VPA	6,784300156	0,00043647	Desconhecido	
1mM VPA	14,3537949	236,080213	4D	1mM VPA	-3,35334287	0,00032832	N ¹ -Formilquinureína	
1mM VPA	45,2867439	238,12327	8D	1mM VPA	3,718961983	0,01466842	Ácido 2-Amino-3-metilbutírico	
1mM VPA	12,1171264	244,109135	4D	1mM VPA	1,659329044	0,01962434	Desconhecido	
1mM VPA	12,127642	245,119507	4D	1mM VPA	2,061936638	0,02383097	Desconhecido	
1mM VPA	19,8036863	246,100428	4D	1mM VPA	4,924577653	0,02636633	N-Acetil-D-triptofano	
1mM VPA	8,947	247,140975	8D	1mM VPA	2,877468231	0,01777412	Desconhecido	
1mM VPA	19,7590488	247,173942	8D	1mM VPA	3,071620539	3,15E-06	Desconhecido	
1mM VPA	48,7837308	248,191881	4D	1mM VPA	2,692786782	0,00724013	Desconhecido	
1mM VPA	8,00665714	249,119037	4D	1mM VPA	1,948008537	0,01865508	Desconhecido	
1mM VPA	53,1723271	256,1093	8D	1mM VPA	3,068428571	0,00024804	Ácido D-2-Amino-3-hidroxi-butírico	Ácido gama-Amino-beta-hidroxi-butírico
1mM VPA	23,22678	257,099256	8D	1mM VPA	2,601240877	0,00033049	5-Metilcistidina	
1mM VPA	5,57045	257,891738	24H	1mM VPA	-1,17015529	0,01640996	Desconhecido	
1mM	7,08067539	258,019715	24H	1mM	1,315125063	0,02206679	Desconhecido	

Tabela 3: Metabólitos celulares medidos em células-tronco embrionárias humanas tratadas com 1 mM de valproato

EXP	RT	Massa arredondada	tempo	trt	Duplicação	Probt	anotação,1	anotação,2
VPA				VPA				
1mM VPA	22,8759189	258,121153	4D	1mM VPA	1,510263204	0,01588551	Desconhecido	
1mM VPA	28,8676889	258,133722	24H	1mM VPA	5,578974665	0,03000729	Desconhecido	
1mM VPA	47,6525584	258,133727	4D	1mM VPA	-1,91733177	0,01442461	Desconhecido	
1mM VPA	18,7499759	259,11867	4D	1mM VPA	1,504620863	0,02037249	N-(gamma-L-Glutamyl)amino-D-prolina	
1mM VPA	13,2221957	260,083648	8D	1mM VPA	2,984522231	0,02760558	Desconhecido	
1mM VPA	22,373	264,109282	4D	1mM VPA	-1,74811488	0,01791457	Acetil-N-formil-5-metoxiquinurenamina	
1mM VPA	58,8093824	265,132541	8D	1mM VPA	2,363623094	0,03359569	ácido (2R,3S)-rel-2,3-diidroxi--Butanóico	
1mM VPA	27,779593	271,112691	4D	1mM VPA	1,685060044	0,03867385	Desconhecido	
1mM VPA	24,7259575	272,124009	4D	1mM VPA	2,036511555	0,02960407	Desconhecido	
1mM VPA	44,0582051	272,168272	8D	1mM VPA	2,056227653	0,00325332	Desconhecido	
1mM VPA	41,65612	272,211662	8D	1mM VPA	-5,12943527	0,00643051	3-Oxo-delta1-esteróide	
1mM VPA	39,378469	273,105953	4D	1mM VPA	2,674742484	0,00030929	Desconhecido	
1mM VPA	8,93373171	276,136639	4D	1mM VPA	5,215118375	0,0006752	Desconhecido	
1mM VPA	67,6599775	280,237772	24H	1mM VPA	2,086232575	0,04410145	ácido Linoleico	ácido Octadecadienóico
1mM VPA	14,2211017	281,125398	8D	1mM VPA	8,170361997	1,56E-06	1-Metiladenosina	
1mM VPA	71,5568571	282,225649	4D	1mM VPA	4,282045127	0,00101203	Desconhecido	
1mM	72,7757434	282,253397	8D	1mM	-1,86257691	0,03054583	ácido oléico	ácido eláidico

Tabela 3: Metabólitos celulares medidos em células-tronco embrionárias humanas tratadas com 1 mM de valproato

EXP	RT	Massa arredondada	tempo	trt	Duplicação	Probt	anotação,1	anotação,2
VPA				VPA				
1mM VPA	59,4208378	284,19613	4D	1mM VPA	5,253576839	0,0351483	Desconhecido	
1mM VPA	5,70108824	284,980449	4D	1mM VPA	1,366608495	0,03819988	Desconhecido	
1mM VPA	6,9018125	285,140063	4D	1mM VPA	15,96344365	0,00293691	Desconhecido	
1mM VPA	64,3362162	286,186749	4D	1mM VPA	2,524154118	0,04701735	N-Acetil-leucil-leucina	
1mM VPA	64,3362162	286,186749	24H	1mM VPA	2,577549261	0,00532464	N-Acetil-leucil-leucina	
1mM VPA	75,3938769	288,263273	4D	1mM VPA	2,556553115	0,0003234	Desconhecido	
1mM VPA	26,6263806	289,137569	8D	1mM VPA	7,105814367	0,00077408	Desconhecido	
1mM VPA	15,0419293	289,139413	8D	1mM VPA	3,953690666	0,00671585	Desconhecido	
1mM VPA	15,8950204	295,128678	8D	1mM VPA	2,286752138	1,23E-06	N6,N6-Dimetiladenosina	
1mM VPA	6,02850649	301,172858	4D	1mM VPA	5,302600282	0,00165331	Desconhecido	
1mM VPA	59,5394364	301,222733	4D	1mM VPA	4,091131755	0,01328711	Desconhecido	
1mM VPA	72,4551579	304,237816	8D	1mM VPA	-5,09223853	0,00158305	Ácido araquidônico	
1mM VPA	44,6849231	305,936181	8D	1mM VPA	2,13864941	0,00372138	3-Iodo-4-hidroxifenilpiruvato	
1mM VPA	7,93489796	306,092269	24H	1mM VPA	-2,59907813	0,00116532	Desconhecido	
1mM VPA	22,339	306,121765	24H	1mM VPA	2,666042908	0,00540921	Z-Gly-Pro; Z-Gly-Pro-OH	
1mM VPA	59,461	306,180711	4D	1mM VPA	2,390810858	0,01473431		
1mM	12,9788342	307,161748	8D	1mM	5,76411852	0,00135244	Desconhecido	

Tabela 3: Metabólitos celulares medidos em células-tronco embrionárias humanas tratadas com 1 mM de valproato

EXP	RT	Massa arredondada	tempo	trt	Duplicação	Probt	anotação,1	anotação,2
VPA				VPA				
1mM VPA	4,76167568	308,158497	8D	1mM VPA	3,212062578	7,02E-05	Desconhecido	
1mM VPA	7,58973529	316,131974	4D	1mM VPA	1,861931503	0,01887819	Desconhecido	
1mM VPA	66,9950694	316,200989	4D	1mM VPA	2,178145003	0,00392399	Gibberelina A12 aldeído	
1mM VPA	62,605	319,244008	24H	1mM VPA	3,088914632	0,0457215	Desconhecido	
1mM VPA	19,019754	320,137541	4D	1mM VPA	2,083198045	0,04299189	Desconhecido	
1mM VPA	67,8541343	320,230187	4D	1mM VPA	1,784846494	0,03271491	Desconhecido	
1mM VPA	67,8541343	320,230187	24H	1mM VPA	1,981647012	0,01061379	Desconhecido	
1mM VPA	10,672	321,168775	24H	1mM VPA	2,153375627	0,00361195	Desconhecido	
1mM VPA	35,4656491	324,169472	4D	1mM VPA	2,684214566	0,00585101	Desconhecido	
1mM VPA	63,932859	326,0008	24H	1mM VPA	1,479797739	0,00340947	Desconhecido	
1mM VPA	63,932859	326,0008	4D	1mM VPA	1,541142217	0,01010729	Desconhecido	
1mM VPA	62,4897344	328,242558	4D	1mM VPA	1,831213495	0,03531113	Ácido docosa-hexanóico	
1mM VPA	55,092	329,001202	24H	1mM VPA	1,889887032	0,01315641	Desconhecido	
1mM VPA	6,02840404	330,105879	8D	1mM VPA	4,856779538	0,01414085	Desconhecido	
1mM VPA	12,8257065	330,153322	4D	1mM VPA	-1,46094311	0,02278769	Desconhecido	
1mM VPA	47,63185	330,240548	4D	1mM VPA	2,777910272	0,01585359	Desconhecido	
1mM	67,7267647	330,242694	4D	1mM	3,168939244	0,02399703	Desconhecido	

Tabela 3: Metabólitos celulares medidos em células-tronco embrionárias humanas tratadas com 1 mM de valproato

EXP	RT	Massa arredondada	tempo	trt	Duplicação	Probt	anotação,1	anotação,2
VPA				VPA				
1mM VPA	9,01253333	331,103633	8D	1mM VPA	5,010657754	0,00879812	Desconhecido	
1mM VPA	18,8430244	334,151446	24H	1mM VPA	7,598422851	0,04853637	Desconhecido	
1mM VPA	4,05694118	336,031706	4D	1mM VPA	-23,1557728	5,36E-05	Desconhecido	
1mM VPA	6,7701658	336,15353	4D	1mM VPA	2,062222503	0,01789166	Desconhecido	
1mM VPA	54,915974	347,982073	4D	1mM VPA	16,74896451	0,02976287	Desconhecido	
1mM VPA	45,6079091	348,203076	4D	1mM VPA	3,375263185	0,00190076	Desconhecido	
1mM VPA	6,04629167	349,134979	8D	1mM VPA	1,449645356	0,02177991	Desconhecido	
1mM VPA	67,3780816	352,221576	24H	1mM VPA	2,329951622	0,01190993	Prostaglandina	
1mM VPA	22,8247245	353,157641	4D	1mM VPA	3,01822425	0,00974537	Ácido 2-ceto-3-metilvalérico	
1mM VPA	19,103773	353,158931	4D	1mM VPA	2,134354771	0,00286811	Desconhecido	
1mM VPA	29,94892	355,242828	4D	1mM VPA	3,751584361	0,01212028	Desconhecido	
1mM VPA	15,1070313	356,156972	4D	1mM VPA	5,181249294	0,00024122	l-Glutâmico-gama-semialdeído	
1mM VPA	59,1895507	358,229755	4D	1mM VPA	4,389936283	0,00450968	Desconhecido	
1mM VPA	7,78296	359,071286	8D	1mM VPA	3,504721971	0,02819084	Desconhecido	
1mM VPA	27,8286847	359,198793	4D	1mM VPA	2,67566964	0,04513681	Desconhecido	
1mM VPA	7,67294845	362,15214	24H	1mM VPA	3,677690313	0,01613594	Ácido amino-hexanóico	
1mM	6,16412	364,18324	4D	1mM	4,422922613	0,01590116	Desconhecido	

Tabela 3: Metabólitos celulares medidos em células-tronco embrionárias humanas tratadas com 1 mM de valproato

EXP	RT	Massa arredondada	tempo	trt	Duplicação	Probt	anotação,1	anotação,2
VPA				VPA				
1mM VPA	19,3098372	364,185514	8D	1mM VPA	2,529233091	0,00135633	Gibberelina A44	
1mM VPA	53,9854054	366,239292	4D	1mM VPA	6,176116644	3,03E-05	3b-Allotetra-hidrocurtolol	
1mM VPA	17,7238836	372,188649	4D	1mM VPA	3,32395304	2,43E-07	Ornitina	
1mM VPA	11,4481111	374,168865	8D	1mM VPA	3,707636994	0,00715743	Desconhecido	
1mM VPA	13,8172619	374,207426	8D	1mM VPA	2,50185816	0,03397986	Desconhecido	
1mM VPA	17,6750468	388,183189	8D	1mM VPA	3,124878291	0,00060074	Ácido málico	Ácido diglicólico
1mM VPA	21,3150329	392,209899	4D	1mM VPA	2,402938958	0,02146723	Desconhecido	
1mM VPA	79,7277263	404,258123	4D	1mM VPA	2,231633324	0,02122436	Ácido 7a,12a-Diidroxi-3-oxo-4-colenólico	
1mM VPA	24,7042427	407,206755	4D	1mM VPA	2,564362115	0,03457095	Desconhecido	
1mM VPA	16,9907536	408,172332	8D	1mM VPA	1,47549599	0,01779219	4-Hidroxiifenilacetaldéido;	
1mM VPA	16,9907536	408,172332	4D	1mM VPA	1,84894204	0,00218606	4-Hidroxiifenilacetaldéido;	
1mM VPA	29,02944	411,227331	4D	1mM VPA	3,412904392	0,00663705	Gln His Lys	
1mM VPA	31,0764706	411,788303	4D	1mM VPA	4,812211329	0,01959219	Desconhecido	
1mM VPA	9,74277941	412,191819	8D	1mM VPA	4,778970957	0,02280244	Desconhecido	
1mM VPA	24,0870602	416,213608	8D	1mM VPA	1,904483779	0,00013882	Desconhecido	
1mM VPA	13,7165	420,160178	4D	1mM VPA	4,500233939	0,04166145	Desconhecido	
1mM VPA	27,4410904	421,219685	4D	1mM VPA	2,92999865	0,01453378	Desconhecido	

Tabela 3: Metabólitos celulares medidos em células-tronco embrionárias humanas tratadas com 1 mM de valproato

EXP	RT	Massa arredondada	tempo	trt	Duplicação	Probt	anotação,1	anotação,2
VPA				VPA				
1mM VPA	84,9993429	424,278966	4D	1mM VPA	2,302178983	0,02079967	ácido 1b,3a,7a,12a-Tetra-hidroxi-5b-colanólico	
1mM VPA	84,9993429	424,278966	24H	1mM VPA	2,318995467	0,00016902	ácido 1b,3a,7a,12a-Tetra-hidroxi-5b-colanólico	
1mM VPA	54,5975206	429,099036	4D	1mM VPA	3,524698852	2,05E-05	Desconhecido	
1mM VPA	25,5684706	430,183077	4D	1mM VPA	1,148698355	0,00012401	Desconhecido	
1mM VPA	47,39725	432,071275	4D	1mM VPA	2,645059178	0,01175067	Desconhecido	
1mM VPA	14,5288987	445,217914	8D	1mM VPA	2,820595921	0,00824753	Desconhecido	
1mM VPA	7,5585	445,286693	4D	1mM VPA	-1,13705339	0,04453994	Desconhecido	
1mM VPA	19,9357624	455,226453	8D	1mM VPA	2,768491323	0,0146344	Adipato	
1mM VPA	84,7522195	470,350048	4D	1mM VPA	3,767741534	0,00027941	Desconhecido	
1mM VPA	8,479	471,146232	24H	1mM VPA	2,569343893	0,02598742	10-Formildihidrofolato	
1mM VPA	22,7650396	471,202698	4D	1mM VPA	2,257302866	1,30E-06	Desconhecido	
1mM VPA	15,4262845	491,253192	8D	1mM VPA	4,916392167	0,00321994	Desconhecido	
1mM VPA	60,5202059	493,458959	4D	1mM VPA	2,789487333	0,00131052	Desconhecido	
1mM VPA	44,8878444	502,216027	4D	1mM VPA	1,922921676	0,00968802	Desconhecido	
1mM VPA	14,5675854	502,227438	8D	1mM VPA	3,101787817	0,00862582	Desconhecido	
1mM VPA	31,0262667	504,2848	4D	1mM VPA	5,119489655	7,48E-05	Desconhecido	
1mM	17,4495833	516,244788	4D	1mM	2,722628233	0,00035163	Desconhecido	

Tabela 3: Metabólitos celulares medidos em células-tronco embrionárias humanas tratadas com 1 mM de valproato

EXP	RT	Massa arredondada	tempo	trt	Duplicação	Probt	anotação, 1	anotação, 2
VPA				VPA				
1mM VPA	44,14925	527,321492	8D	1mM VPA	2,213454933	0,00740287	Desconhecido	
1mM VPA	70,8363171	528,362659	4D	1mM VPA	2,941801698	0,03554601	Desconhecido	
1mM VPA	74,25245	530,344375	24H	1mM VPA	3,680750602	0,03848341	Desconhecido	
1mM VPA	9,15167857	532,249475	8D	1mM VPA	7,170133597	0,00736475	Desconhecido	
1mM VPA	29,9863488	535,254098	8D	1mM VPA	6,049014001	0,00097203	Desconhecido	
1mM VPA	87,9394	535,392963	4D	1mM VPA	1,80125196	0,03183737	Desconhecido	
1mM VPA	8,02928261	549,20135	8D	1mM VPA	11,08087574	0,00035145	Desconhecido	
1mM VPA	19,5000458	550,228302	4D	1mM VPA	2,35969435	0,00064579	Desconhecido	
1mM VPA	24,7983934	551,248871	24H	1mM VPA	1,396388132	0,01890342	Desconhecido	
1mM VPA	74,3730889	552,326244	24H	1mM VPA	1,885569072	0,031072	Litolato 3-O-glucuronídeo	
1mM VPA	75,3072222	561,322428	4D	1mM VPA	5,181249294	0,00798648	Desconhecido	
1mM VPA	14,1881491	565,230107	4D	1mM VPA	2,651300141	0,04312251	Desconhecido	
1mM VPA	5,97658065	574,262774	8D	1mM VPA	2,982867719	0,00682514	Desconhecido	
1mM VPA	70,4439429	594,37144	4D	1mM VPA	2,591881931	0,04970674	2-Hidroxiadenina	
1mM VPA	15,895551	598,283549	8D	1mM VPA	4,074717385	0,00446383	2-Hidroxiadenina	
1mM VPA	76,5242159	599,574322	8D	1mM VPA	2,569165805	2,63E-05	Desconhecido	
1mM	76,2647	600,576755	4D	1mM	1,998614186	0,00464652	Desconhecido	

Tabela 3: Metabólitos celulares medidos em células-tronco embrionárias humanas tratadas com 1 mM de valproato

EXP	RT	Massa arredondada	tempo	trt	Duplicação	Probt	anotação,1	anotação,2
VPA				VPA				
1mM VPA	76,2647	600,576755	8D	1mM VPA	2,690920931	0,00059418	Desconhecido	
1mM VPA	79,7894576	613,589997	8D	1mM VPA	3,099853425	0,01314731	Desconhecido	
1mM VPA	8,59329167	658,254492	8D	1mM VPA	13,32441233	0,02367066	Desconhecido	
1mM VPA	60,8503	688,51026	4D	1mM VPA	3,690969971	0,00301918	Desconhecido	
1mM VPA	69,7080175	690,409258	4D	1mM VPA	3,89061979	0,001728	Desconhecido	
1mM VPA	65,32996	738,583348	4D	1mM VPA	3,877159268	0,00021681	Desconhecido	
1mM VPA	69,7792917	810,640892	4D	1mM VPA	3,934008296	0,00141534	Desconhecido	
1mM VPA	21,6729286	921,002586	24H	1mM VPA	10,91318268	0,00761215	Desconhecido	
1mM VPA	5,86856	1007,84992	4D	1mM VPA	23,49041018	0,04324009	3-Dehidrocarnitina	

Tabela 4: Metabólitos celulares produzidos em hECSs tratadas com 22µM valproato

cpdID	RT	MASSA média	tempo	trt	Duplic.	Valor P	Composto 1	Composto2
77	28,21	99,0681	4 dias	VPA	-1,81	0,020	N-Metil-2-pirrolidinona	
103	12,00	103,0991	4 dias	VPA	-2,24	0,028	ácido Gama-Aminobutírico	Ácido 2-aminoisobutírico
141	34,03	113,0840	4 dias	VPA	-1,43	0,013	Desconhecido	
189	12,08	119,0473	8 dias	VPA	1,22	0,040	4-Amino-3-hidroxi-butanato	
210	96,44	120,0436	4 dias	VPA	-4,22	0,006	ácido 3,4-Dihidroxi-butírico	1-Pirrolina-4-hidroxi-2-carboxilato
263	19,93	129,0426	4 dias	VPA	-1,27	0,021	Ácido piroglutâmico	
323	29,83	134,0939	4 dias	VPA	-1,43	0,034	Desconhecido	
329	16,96	136,0384	24 horas	VPA	-2,09	0,038	Hipoxantina	Allopurinol
343	12,98	141,0412	4 dias	VPA	-1,24	0,011	1,4,4,6-Tetra-hidro-6-oxonicotinato	2-Aminomuconato semialdeído
362	11,40	141,9381	4 dias	VPA	1,19	0,034	Desconhecido	
396	11,97	146,0683	4 dias	VPA	-1,02	0,002	Glutamina	
413	44,84	148,0638	8 dias	VPA	-2,72	0,004	Desconhecido	
444	12,37	144,0687	8 dias	VPA	-1,42	0,014	Desconhecido	
449	20,19	146,0066	8 dias	VPA	-1,24	0,002	ácido 2,4-dicarboxílico	
496	30,40	161,0688	8 dias	VPA	-1,23	0,019	4-Metil-L-glutamato	2,2'-Iminodipropionato
431	24,83	164,4009	4 dias	VPA	-1,17	0,049	Desconhecido	
603	72,83	173,9844	8 dias	VPA	-1,80	0,017	Desconhecido	
604	20,34	174,0160	4 dias	VPA	-1,36	0,003	cis-Aconitato	Dehidroascorbato
636	42,18	178,0994	8 dias	VPA	1,47	0,002	Ácido fenilvalérico	
646	24,00	181,0740	4 dias	VPA	-1,11	0,004	Salsolinol	Homofenilalanina
671	24,90	187,0609	4 dias	VPA	-1,40	0,018	Desconhecido	
674	36,08	187,0973	4 dias	VPA	2,14	0,042	Desconhecido	
812	29,93	204,0899	8 dias	VPA	1,08	0,034	L-Triptofano	Formil-4-hidroxi-quinurenina
843	24,94	208,0840	4 dias	VPA	-1,14	0,004	Quinurenina	
893	44,64	214,1680	8 dias	VPA	-2,11	0,005	ácido Fenamico	
1089	47,40	242,0808	8 dias	VPA	1,87	0,02	Desconhecido	
1104	7,98	243,9760	4 dias	VPA	1,92	0,032	Desconhecido	
1282	44,30	274,0947	8 dias	VPA	1,78	0,019	3-Oxo-delta4-esteróide	
1447	43,40	300,2784	8 dias	VPA	-2,22	0,033	Desconhecido	
1440	27,94	314,2032	4 dias	VPA	-1,12	0,012	Desconhecido	

cpdID	RT	MASSA média	tempo	trt	Duplic.	Valor P	Composto 1	Composto2
1637	24,91	330,1480	4 dias	VPA	-1,42	0,004	Desconhecido	
1684	11,94	336,1634	4 dias	VPA	-1,13	0,023	Desconhecido	
1691	34,87	338,0974	4 dias	VPA	1,74	0,033	Desconhecido	
1776	39,67	342,1130	4 dias	VPA	1,46	0,044	Desconhecido	
1816	24,40	348,1139	8 dias	VPA	2,56	0,025	Desconhecido	
1838	11,00	361,9194	4 dias	VPA	-1,08	0,004	Desconhecido	
1948	12,00	384,1664	8 dias	VPA	1,38	0,018	Desconhecido	
1949	14,98	387,1498	4 dias	VPA	-1,26	0,001	Desconhecido	
2084	64,24	414,2934	4 dias	VPA	-1,20	0,031	Desconhecido	
2131	88,14	426,2983	4 dias	VPA	1,85	0,022	ácido Colanóico	
2134	74,20	427,1200	8 dias	VPA	-1,88	0,044	Desconhecido	
2138	26,91	428,2423	8 dias	VPA	1,70	0,003	Desconhecido	
2144	34,14	431,2733	4 dias	VPA	-1,24	0,041	Desconhecido	
2186	32,68	441,1394	8 dias	VPA	-1,16	0,022	Folato	ácido fólico
2191	64,67	442,2934	8 dias	VPA	1,79	0,001	Desconhecido	
2214	92,89	440,3448	8 dias	VPA	-1,84	0,037	Desconhecido	
2233	12,00	444,0841	8 dias	VPA	-1,30	0,041	Desconhecido	
2244	64,41	449,3198	24 horas	VPA	-1,78	0,024	Desconhecido	
2291	87,74	470,3249	4 dias	VPA	-0,18	0,002	Desconhecido	
2244	30,91	467,2631	8 dias	VPA	1,69	0,004	Desconhecido	
743	13,81	197,0186	8 dias	VPA	-1,39	0,016	Desconhecido	
636	42,18	178,0994	8 dias	VPA	1,47	0,010	Desconhecido	

Tabela 6: Metabólitos celulares medidos em precursores neurais derivados de hESells tratadas com 1 mM de valproato

EXP	RT	Massa arredond.	tempo	trt	Duplicação	anotação,1	anotação,2
NS 1mM				NS 1mM			
VPA	36,648	102,0322438	2d	VPA	-2,23119	ácido 2-cetobutírico	Ácido acetoacético
NS 1mM				NS 1mM			
VPA	36,648	102,0322438	4d	VPA	-1,83846	ácido 2-cetobutírico	Ácido acetoacético
NS 1mM	9,33225	119,958645	4d	NS 1mM	6,98086	Desconhecido	
VPA				VPA			
NS 1mM	12,2841	121,0621387	4d	NS 1mM	3,502341	Desconhecido	
VPA				VPA			

EXP	RT	Massa arredond.	tempo	trt	Duplicação	anotação,1	anotação,2
NS 1mM	24,10558	125,0838833	2d	NS 1mM	1,79316	Desconhecido	
VPA				VPA			
NS 1mM	30,43985	125,08394	2d	NS 1mM	1,529012	1-Metil-histamina	
VPA				VPA			
NS 1mM	30,43985	125,08394	4d	NS 1mM	1,576622	1-Metil-histamina	
VPA				VPA			
NS 1mM	23,33772	129,0573222	2d	NS 1mM	1,543375	Ácido piroglutâmico	
VPA				VPA			
NS 1mM	23,33772	129,0573222	4d	NS 1mM	1,663008	Ácido piroglutâmico	
VPA				VPA			
NS 1mM	12,13216	131,0941359	4d	NS 1mM	1,577796	L-Isoleucina	Ácido aminocapróico
VPA				VPA			
NS 1mM	12,13216	131,0941359	2d	NS 1mM	2,474877	L-Isoleucina	Ácido aminocapróico
VPA				VPA			
NS 1mM	8,881211	136,0366263	2d	NS 1mM	2,287439	Ácido eritrônico	Ácido eritrônico
VPA				VPA			
NS 1mM	8,881211	136,0366263	4d	NS 1mM	2,653537	Ácido eritrônico	Ácido eritrônico
VPA				VPA			
NS 1mM	12,00967	136,0376917	2d	NS 1mM	2,346054	Ácido eritrônico	Ácido eritrônico
VPA				VPA			
NS 1mM	12,00967	136,0376917	4d	NS 1mM	2,914393	Ácido eritrônico	Ácido eritrônico
VPA				VPA			
NS 1mM	3,9669	138,04396	2d	NS 1mM	1,521407	Ácido urocânico	Nicotinamida N- óxido
VPA				VPA			
NS 1mM	3,9669	138,04396	4d	NS 1mM	2,642558	Ácido urocânico	Nicotinamida N- óxido
VPA				VPA			
NS 1mM	4,28225	141,9392625	2d	NS 1mM	1,077336	5,10-Metilenotetraidrofolato	
VPA				VPA			
NS 1mM	4,28225	141,9392625	4d	NS 1mM	1,111532	5,10-Metilenotetraidrofolato	
VPA				VPA			
NS 1mM	23,33784	143,0734947	2d	NS 1mM	1,728349	Desconhecido	
VPA				VPA			
NS 1mM	23,33784	143,0734947	4d	NS 1mM	1,986515	Desconhecido	
VPA				VPA			
NS 1mM	55,5845	144,1153313	4d	NS 1mM	10,83178	Ácido caprílico	Ácido valpróico
VPA				VPA			

EXP	RT	Massa arredond.	tempo	trt	Duplicação	anotação,1	anotação,2
NS 1mM VPA	55,5845	144,1153313	2d	NS 1mM VPA	11,64535	Ácido caprílico	Ácido valpróico
NS 1mM VPA	5,609182	145,1572818	2d	NS 1mM VPA	1,00993	Espermidina	
NS 1mM VPA	5,609182	145,1572818	4d	NS 1mM VPA	1,117314	Espermidina	
NS 1mM VPA	33,6357	148,03738	4d	NS 1mM VPA	-5,75294	ácido Citramalico	ácido Hidroxiiglutarico
NS 1mM VPA	33,6357	148,03738	2d	NS 1mM VPA	-1,49356	ácido Citramalico	ácido Hidroxiiglutarico
NS 1mM VPA	62,42614	152,1201762	4d	NS 1mM VPA	2,50602	Desconhecido	
NS 1mM VPA	62,42614	152,1201762	2d	NS 1mM VPA	3,371426	Desconhecido	
NS 1mM VPA	8,862333	158,0177333	2d	NS 1mM VPA	1,596402	Desconhecido	
NS 1mM VPA	8,862333	158,0177333	4d	NS 1mM VPA	2,236076	Desconhecido	
NS 1mM VPA	8,269857	158,1374571	4d	NS 1mM VPA	3,106829	Desconhecido	
NS 1mM VPA	8,269857	158,1374571	2d	NS 1mM VPA	3,626498	Desconhecido	
NS 1mM VPA	10,07033	159,0688667	2d	NS 1mM VPA	-2,87026	Indolacetaldéido	
NS 1mM VPA	10,07033	159,0688667	4d	NS 1mM VPA	-1,35298	Indolacetaldéido	
NS 1mM VPA	12,85888	161,0509118	2d	NS 1mM VPA	2,601443	Desconhecido	
NS 1mM VPA	12,85888	161,0509118	4d	NS 1mM VPA	5,136057	Desconhecido	
NS 1mM VPA	6,713565	166,0840609	4d	NS 1mM VPA	33,80296	Desconhecido	
NS 1mM VPA	6,713565	166,0840609	2d	NS 1mM VPA	90,97629	Desconhecido	
NS 1mM VPA	23,58909	168,0687909	2d	NS 1mM VPA	4,649885	Desconhecido	

EXP	RT	Massa arredond.	tempo	trt	Duplicação	anotação,1	anotação,2
NS 1mM VPA	23,58909	168,0687909	4d	NS 1mM VPA	5,02165	Desconhecido	
NS 1mM VPA	31,08471	171,1250706	4d	NS 1mM VPA	1,626943	Desconhecido	
NS 1mM VPA	62,57554	172,1454	4d	NS 1mM VPA	1,745543	Ácido cáprico	ácido Decanóico
NS 1mM VPA	62,57554	172,1454	2d	NS 1mM VPA	1,8794	Ácido cáprico	ácido Decanóico
NS 1mM VPA	20,68721	175,0830857	2d	NS 1mM VPA	1,153935	ácido N-Carboxietil-gama-aminobutírico	
NS 1mM VPA	20,68721	175,0830857	4d	NS 1mM VPA	2,294392	ácido N-Carboxietil-gama-aminobutírico	
NS 1mM VPA	41,71109	176,0946	2d	NS 1mM VPA	-1,60014	Serotonina	
NS 1mM VPA	41,71109	176,0946	4d	NS 1mM VPA	-1,23797	Serotonina	
NS 1mM VPA	25,29	177,0469231	2d	NS 1mM VPA	3,379693	N-Formil-L-metionina	
NS 1mM VPA	25,29	177,0469231	4d	NS 1mM VPA	3,82485	N-Formil-L-metionina	
NS 1mM VPA	26,75621	177,0789684	2d	NS 1mM VPA	1,26513	5-Hidroxitriptofol	
NS 1mM VPA	26,75621	177,0789684	4d	NS 1mM VPA	1,423219	5-Hidroxitriptofol	
NS 1mM VPA	8,503333	177,113375	2d	NS 1mM VPA	-6,74695	Desconhecido	
NS 1mM VPA	8,503333	177,113375	4d	NS 1mM VPA	-2,88736	Desconhecido	
NS 1mM VPA	27,53982	179,0938118	2d	NS 1mM VPA	-2,71897	Salsolinol	Homofenilalanina
NS 1mM VPA	27,53982	179,0938118	4d	NS 1mM VPA	-1,71231	Salsolinol	Homofenilalanina
NS 1mM VPA	55,15089	179,0949632	4d	NS 1mM VPA	-1,64525	Salsolinol	Homofenilalanina
NS 1mM VPA	55,15089	179,0949632	2d	NS 1mM VPA	-1,39458	Salsolinol	Homofenilalanina

EXP	RT	Massa arredond.	tempo	trt	Duplicação	anotação, 1	anotação, 2
NS 1mM VPA	37,08443	185,1406571	4d	NS 1mM VPA	-2,39254	Desconhecido	
NS 1mM VPA	23,33726	187,0635211	2d	NS 1mM VPA	1,674013	Desconhecido	
NS 1mM VPA	23,33726	187,0635211	4d	NS 1mM VPA	1,921765	Desconhecido	
NS 1mM VPA	28,77111	187,1206333	2d	NS 1mM VPA	2,457813	ácido 8-Amino-7-oxononanoico	
NS 1mM VPA	28,77111	187,1206333	4d	NS 1mM VPA	3,559361	ácido 8-Amino-7-oxononanoico	
NS 1mM VPA	62,50765	190,1720118	4d	NS 1mM VPA	1,758553	Desconhecido	
NS 1mM VPA	62,50765	190,1720118	2d	NS 1mM VPA	1,940004	Desconhecido	
NS 1mM VPA	7,850167	196,0933333	4d	NS 1mM VPA	1,937281	Desconhecido	
NS 1mM VPA	7,850167	196,0933333	2d	NS 1mM VPA	6,390957	Desconhecido	
NS 1mM VPA	45,36418	197,1060727	2d	NS 1mM VPA	1,280472	L-Metanefrina	
NS 1mM VPA	45,36418	197,1060727	4d	NS 1mM VPA	1,62879	L-Metanefrina	
NS 1mM VPA	8,363925	199,0952975	2d	NS 1mM VPA	10,44025	Desconhecido	
NS 1mM VPA	8,363925	199,0952975	4d	NS 1mM VPA	10,88407	Desconhecido	
NS 1mM VPA	22,22829	206,06375	4d	NS 1mM VPA	2,263839	Desconhecido	
NS 1mM VPA	22,22829	206,06375	2d	NS 1mM VPA	4,317383	Desconhecido	
NS 1mM VPA	62,46678	208,1829217	4d	NS 1mM VPA	2,052914	Desconhecido	
NS 1mM VPA	62,46678	208,1829217	2d	NS 1mM VPA	2,734885	Desconhecido	
NS 1mM VPA	9,2636	211,0349075	4d	NS 1mM VPA	1,516795	Fosfato de creatina	

EXP	RT	Massa arredond.	tempo	trt	Duplicação	anotação, 1	anotação, 2
NS 1mM VPA	9,2636	211,0349075	2d	NS 1mM VPA	1,893074	Fosfato de creatina	
NS 1mM VPA	44,11333	212,1400167	4d	NS 1mM VPA	-9,35257	Desconhecido	
NS 1mM VPA	44,11333	212,1400167	2d	NS 1mM VPA	-6,85493	Desconhecido	
NS 1mM VPA	7,746115	217,1048885	2d	NS 1mM VPA	2,916422	N-a-Acetilcitrulina	
NS 1mM VPA	7,746115	217,1048885	4d	NS 1mM VPA	23,86569	N-a-Acetilcitrulina	
NS 1mM VPA	22,26729	217,1307097	2d	NS 1mM VPA	2,122093	Propionilcarnitina	
NS 1mM VPA	22,26729	217,1307097	4d	NS 1mM VPA	2,236406	Propionilcarnitina	
NS 1mM VPA	16,1278	220,0841	2d	NS 1mM VPA	-1,25214	5-Hidroxitriptofano	5-Hidroxi-L- triptofano
NS 1mM VPA	16,1278	220,0841	4d	NS 1mM VPA	1,215413	5-Hidroxitriptofano	5-Hidroxi-L- triptofano
NS 1mM VPA	9,809786	220,0845	2d	NS 1mM VPA	-1,06102	5-Hidroxitriptofano	5-Hidroxi-L- triptofano
NS 1mM VPA	9,809786	220,0845	4d	NS 1mM VPA	1,371126	5-Hidroxitriptofano	5-Hidroxi-L- triptofano
NS 1mM VPA	12,15958	220,0845895	2d	NS 1mM VPA	-1,54275	5-Hidroxitriptofano	5-Hidroxi-L- triptofano
NS 1mM VPA	12,15958	220,0845895	4d	NS 1mM VPA	1,162644	5-Hidroxitriptofano	5-Hidroxi-L- triptofano
NS 1mM VPA	8,4172	223,92951	2d	NS 1mM VPA	-3,24844	Desconhecido	
NS 1mM VPA	8,4172	223,92951	4d	NS 1mM VPA	-2,85631	Desconhecido	
NS 1mM VPA	22,009	225,62685	4d	NS 1mM VPA	2,716119	Desconhecido	
NS 1mM VPA	22,009	225,62685	2d	NS 1mM VPA	3,854852	Desconhecido	
NS 1mM VPA	10,0963	227,01938	4d	NS 1mM VPA	1,631698	ácido 5-fosfato L-Glutâmico	

EXP	RT	Massa arredond.	tempo	trt	Duplicação	anotação,1	anotação,2
NS 1mM VPA	6,0771	227,09052	4d	NS 1mM VPA	-5,41292	Deoxicitidina	
NS 1mM VPA	6,0771	227,09052	2d	NS 1mM VPA	-2,98012	Deoxicitidina	
NS 1mM VPA	14,51476	228,05894	4d	NS 1mM VPA	3,339111	Desconhecido	
NS 1mM VPA	14,51476	228,05894	2d	NS 1mM VPA	6,425869	Desconhecido	
NS 1mM VPA	67,13919	230,1515667	4d	NS 1mM VPA	-5,02528	ácido Dodecanodióico	
NS 1mM VPA	67,13919	230,1515667	2d	NS 1mM VPA	-2,98776	ácido Dodecanodióico	
NS 1mM VPA	19,28286	234,1010143	2d	NS 1mM VPA	-1,25569	5-Metoxitriptofano	
NS 1mM VPA	19,28286	234,1010143	4d	NS 1mM VPA	-1,18869	5-Metoxitriptofano	
NS 1mM VPA	10,51438	236,0815625	4d	NS 1mM VPA	1,367658	N'-Formilquinurenina	
NS 1mM VPA	17,826	238,0864167	2d	NS 1mM VPA	5,397657	ácido Propanóico	
NS 1mM VPA	17,826	238,0864167	4d	NS 1mM VPA	5,703771	ácido Propanóico	
NS 1mM VPA	7,8115	239,087425	4d	NS 1mM VPA	1,950568	Desconhecido	
NS 1mM VPA	7,8115	239,087425	2d	NS 1mM VPA	30,57925	Desconhecido	
NS 1mM VPA	42,05716	246,1469838	4d	NS 1mM VPA	-2,28801	ácido 3-Hidroxidodecanodióico	
NS 1mM VPA	42,05716	246,1469838	2d	NS 1mM VPA	-1,71537	ácido 3-Hidroxidodecanodióico	
NS 1mM VPA	30,669	256,09664	4d	NS 1mM VPA	1,692487	Aril beta-D-glucosídeo	
NS 1mM VPA	30,669	256,09664	2d	NS 1mM VPA	1,966122	Aril beta-D-glucosídeo	
NS 1mM VPA	59,82681	256,1080938	2d	NS 1mM VPA	2,962348	Desconhecido	

EXP	RT	Massa arredond.	tempo	trt	Duplicação	anotação, 1	anotação, 2
NS 1mM VPA	59,82681	256,1080938	4d	NS 1mM VPA	3,845884	Desconhecido	
NS 1mM VPA	69,57173	258,18226	4d	NS 1mM VPA	4,075358	ácido Tetradecanodióico	
NS 1mM VPA	69,57173	258,18226	2d	NS 1mM VPA	5,744182	ácido Tetradecanodióico	
NS 1mM VPA	22,0274	264,11209	2d	NS 1mM VPA	1,230997	Acetil-N-formil-5-metoxiquinurenamina	
NS 1mM VPA	22,0274	264,11209	4d	NS 1mM VPA	1,338241	Acetil-N-formil-5-metoxiquinurenamina	
NS 1mM VPA	11,94583	268,0806	4d	NS 1mM VPA	3,240011	ácido 3-Deoxi-D-glicero-D-galacto-2-nonulosônico	
NS 1mM VPA	11,94583	268,0806	2d	NS 1mM VPA	3,329815	ácido 3-Deoxi-D-glicero-D-galacto-2-nonulosônico	
NS 1mM VPA	20,58271	270,1203286	2d	NS 1mM VPA	1,808333	L-gama-Glutamil-L-hipoglicina;	
NS 1mM VPA	20,58271	270,1203286	4d	NS 1mM VPA	1,890677	L-gama-Glutamil-L-hipoglicina;	
NS 1mM VPA	56,5351	272,08566	4d	NS 1mM VPA	1,178071	5-S-Cisteinildopamina	
NS 1mM VPA	56,5351	272,08566	2d	NS 1mM VPA	1,718998	5-S-Cisteinildopamina	
NS 1mM VPA	64,11407	278,0251024	4d	NS 1mM VPA	5,17024	Desconhecido	
NS 1mM VPA	64,11407	278,0251024	2d	NS 1mM VPA	6,667641	Desconhecido	
NS 1mM VPA	28,90879	290,1501643	4d	NS 1mM VPA	3,329013	Desconhecido	
NS 1mM VPA	28,90879	290,1501643	2d	NS 1mM VPA	8,490919	Desconhecido	
NS 1mM VPA	26,42889	295,1063913	2d	NS 1mM VPA	7,265582	Desconhecido	
NS 1mM VPA	26,42889	295,1063913	4d	NS 1mM VPA	8,896581	Desconhecido	
NS 1mM VPA	73,28533	315,2406111	4d	NS 1mM VPA	2,599877	Decanoilcarnitina	

EXP	RT	Massa arredond.	tempo	trt	Duplicação	anotação,1	anotação,2
NS 1mM VPA	73,28533	315,2406111	2d	NS 1mM VPA	3,899691	Decanoilcarnitina	
NS 1mM VPA	77,38144	318,2193688	4d	NS 1mM VPA	1,932263	Leucotrieno A4	
NS 1mM VPA	77,38144	318,2193688	2d	NS 1mM VPA	2,342543	Leucotrieno A4	
NS 1mM VPA	41,33024	324,1144588	4d	NS 1mM VPA	3,317923	Aceto-hexamida	
NS 1mM VPA	41,33024	324,1144588	2d	NS 1mM VPA	3,713445	Aceto-hexamida	
NS 1mM VPA	33,60576	330,1013765	4d	NS 1mM VPA	2,25561	Desconhecido	
NS 1mM VPA	33,60576	330,1013765	2d	NS 1mM VPA	2,310447	Desconhecido	
NS 1mM VPA	35,06233	331,1049867	4d	NS 1mM VPA	2,719086	Desconhecido	
NS 1mM VPA	35,06233	331,1049867	2d	NS 1mM VPA	3,041317	Desconhecido	
NS 1mM VPA	52,557	349,22592	4d	NS 1mM VPA	2,41993	Desconhecido	
NS 1mM VPA	52,557	349,22592	2d	NS 1mM VPA	6,652089	Desconhecido	
NS 1mM VPA	53,57858	350,2096	4d	NS 1mM VPA	1,508076	Prostaglandina E3	
NS 1mM VPA	53,57858	350,2096	2d	NS 1mM VPA	1,612834	Prostaglandina E3	
NS 1mM VPA	65,76353	356,2702895	4d	NS 1mM VPA	2,05875	ácido Tetracosa-hexaenóico	
NS 1mM VPA	65,76353	356,2702895	2d	NS 1mM VPA	2,405825	ácido Tetracosa-hexaenóico	
NS 1mM VPA	81,79271	369,2880824	4d	NS 1mM VPA	6,636435	cis-5-Tetradecenoilcarnitina	
NS 1mM VPA	81,79271	369,2880824	2d	NS 1mM VPA	9,965816	cis-5-Tetradecenoilcarnitina	
NS 1mM VPA	27,34076	374,1222235	4d	NS 1mM VPA	2,300022	Desconhecido	

EXP	RT	Massa arredond.	tempo	trt	Duplicação	anotação, 1	anotação, 2
NS 1mM VPA	27,34076	374,1222235	2d	NS 1mM VPA	2,889783	Desconhecido	
NS 1mM VPA	8,881	380,164	4d	NS 1mM VPA	2,519949	Desconhecido	
NS 1mM VPA	8,881	380,164	2d	NS 1mM VPA	2,633667	Desconhecido	
NS 1mM VPA	22,46583	385,1025667	4d	NS 1mM VPA	1,45497	S-Inosil-L-homocisteína	
NS 1mM VPA	22,46583	385,1025667	2d	NS 1mM VPA	1,533705	S-Inosil-L-homocisteína	
NS 1mM VPA	68,31689	386,23145	4d	NS 1mM VPA	6,386163	1-tridecanoil-sn-glicero-3-fosfato	
NS 1mM VPA	68,31689	386,23145	2d	NS 1mM VPA	7,117538	1-tridecanoil-sn-glicero-3-fosfato	
NS 1mM VPA	89,1946	390,27608	2d	NS 1mM VPA	1,682855	ácido 7-Hidroxi-3-oxocolanóico	
NS 1mM VPA	89,1946	390,27608	4d	NS 1mM VPA	3,296512	ácido 7-Hidroxi-3-oxocolanóico	
NS 1mM VPA	26,42904	394,2127308	2d	NS 1mM VPA	2,670186	Desconhecido	
NS 1mM VPA	26,42904	394,2127308	4d	NS 1mM VPA	3,50273	desconhecido n	
NS 1mM VPA	76,06971	398,2439857	4d	NS 1mM VPA	2,845315	Desconhecido	
NS 1mM VPA	76,06971	398,2439857	2d	NS 1mM VPA	3,609136	Desconhecido	
NS 1mM VPA	33,53038	399,2100125	2d	NS 1mM VPA	6,345173	desconhecido n	
NS 1mM VPA	33,53038	399,2100125	4d	NS 1mM VPA	8,777833	desconhecido n	
NS 1mM VPA	8,9305	406,1058875	4d	NS 1mM VPA	1,976577	desconhecido n	
NS 1mM VPA	8,9305	406,1058875	2d	NS 1mM VPA	2,00634	desconhecido n	
NS 1mM VPA	65,76447	409,3155632	4d	NS 1mM VPA	4,662331	Desconhecido	

EXP	RT	Massa arredond.	tempo	trt	Duplicação	anotação, 1	anotação, 2
NS 1mM VPA	65,76447	409,3155632	2d	NS 1mM VPA	5,930421	Desconhecido	
NS 1mM VPA	18,93053	416,0834333	4d	NS 1mM VPA	3,527468	Desconhecido	
NS 1mM VPA	18,93053	416,0834333	2d	NS 1mM VPA	4,202864	Desconhecido	
NS 1mM VPA	8,6127	416,20208	2d	NS 1mM VPA	3,29783	Lactona	
NS 1mM VPA	8,6127	416,20208	4d	NS 1mM VPA	3,495266	Lactona	
NS 1mM VPA	14,963	420,05275	2d	NS 1mM VPA	-3,434	Desconhecido	
NS 1mM VPA	14,963	420,05275	4d	NS 1mM VPA	-3,09195	Desconhecido	
NS 1mM VPA	62,93221	427,1025357	2d	NS 1mM VPA	3,882014	Desconhecido	
NS 1mM VPA	62,93221	427,1025357	4d	NS 1mM VPA	6,045912	Desconhecido	
NS 1mM VPA	33,59771	430,1185143	2d	NS 1mM VPA	3,469797	N-Etilmaleimida-S-glutationa	
NS 1mM VPA	33,59771	430,1185143	4d	NS 1mM VPA	3,98295	N-Etilmaleimida-S-glutationa	
NS 1mM VPA	24,9718	434,19845	4d	NS 1mM VPA	3,713915	Desconhecido	
NS 1mM VPA	24,9718	434,19845	2d	NS 1mM VPA	3,76882	Desconhecido	
NS 1mM VPA	23,07	434,1985875	2d	NS 1mM VPA	2,416021	Desconhecido	
NS 1mM VPA	23,07	434,1985875	4d	NS 1mM VPA	3,44524	Desconhecido	
NS 1mM VPA	37,33089	438,1460579	2d	NS 1mM VPA	2,829002	Desconhecido	
NS 1mM VPA	37,33089	438,1460579	4d	NS 1mM VPA	3,253909	Desconhecido	
NS 1mM VPA	5,410909	441,9424	4d	NS 1mM VPA	-3,5345	Desconhecido	

EXP	RT	Massa arredond.	tempo	trt	Duplicação	anotação, 1	anotação, 2
NS 1mM VPA	5,410909	441,9424	2d	NS 1mM VPA	-2,45689	Desconhecido	
NS 1mM VPA	34,58505	443,2362947	2d	NS 1mM VPA	2,648862	Desconhecido	
NS 1mM VPA	34,58505	443,2362947	4d	NS 1mM VPA	3,427563	Desconhecido	
NS 1mM VPA	33,85267	445,1694	2d	NS 1mM VPA	-1,31487	ácido Tetraidrofólico	Tetraidrofolato
NS 1mM VPA	33,85267	445,1694	4d	NS 1mM VPA	-1,04073	ácido Tetraidrofólico	Tetraidrofolato
NS 1mM VPA	38,63717	449,1638333	2d	NS 1mM VPA	3,04704	Desconhecido	
NS 1mM VPA	38,63717	449,1638333	4d	NS 1mM VPA	4,206864	Desconhecido	
NS 1mM VPA	21,9772	456,2448	4d	NS 1mM VPA	4,145738	desconhecido n	
NS 1mM VPA	21,9772	456,2448	2d	NS 1mM VPA	8,390862	desconhecido n	
NS 1mM VPA	42,40369	467,1731077	2d	NS 1mM VPA	-10,3323	Desconhecido	
NS 1mM VPA	42,40369	467,1731077	4d	NS 1mM VPA	-4,42263	Desconhecido	
NS 1mM VPA	23,41189	474,1090778	4d	NS 1mM VPA	2,094815	Desconhecido	
NS 1mM VPA	23,41189	474,1090778	2d	NS 1mM VPA	2,928466	Desconhecido	
NS 1mM VPA	22,666	482,1554563	4d	NS 1mM VPA	2,075721	Desconhecido	
NS 1mM VPA	22,666	482,1554563	2d	NS 1mM VPA	2,519832	Desconhecido	
NS 1mM VPA	75,55014	493,3252405	4d	NS 1mM VPA	2,09415	1-(9E-hexadecenoil)-sn-glicero-3-fosfocolina	
NS 1mM VPA	75,55014	493,3252405	2d	NS 1mM VPA	2,34894	1-(9E-hexadecenoil)-sn-glicero-3-fosfocolina	
NS 1mM VPA	37,34533	506,1856556	2d	NS 1mM VPA	2,031088	Desconhecido	

EXP	RT	Massa arredond.	tempo	trt	Duplicação	anotação,1	anotação,2
NS 1mM VPA	37,34533	506,1856556	4d	NS 1mM VPA	2,405509	desconhecido n	
NS 1mM VPA	23,67792	514,162208	2d	NS 1mM VPA	2,2744	desconhecido n	
NS 1mM VPA	23,67792	514,162208	4d	NS 1mM VPA	3,27837	desconhecido n	
NS 1mM VPA	36,44195	514,2430667	4d	NS 1mM VPA	4,332807	Desconhecido	
NS 1mM VPA	36,44195	514,2430667	2d	NS 1mM VPA	4,565629	Desconhecido	
NS 1mM VPA	41,29621	527,3552786	2d	NS 1mM VPA	9,44893	Desconhecido	
NS 1mM VPA	41,29621	527,3552786	4d	NS 1mM VPA	12,3251	Desconhecido	
NS 1mM VPA	21,94381	534,2784846	4d	NS 1mM VPA	2,818876	desconhecido n	
NS 1mM VPA	21,94381	534,2784846	2d	NS 1mM VPA	2,912693	desconhecido n	
NS 1mM VPA	26,05061	546,3146929	2d	NS 1mM VPA	1,574871	Desconhecido	
NS 1mM VPA	26,05061	546,3146929	4d	NS 1mM VPA	3,130802	Desconhecido	
NS 1mM VPA	25,92929	556,13945	4d	NS 1mM VPA	4,837329	desconhecido n	
NS 1mM VPA	25,92929	556,13945	2d	NS 1mM VPA	5,293236	desconhecido n	
NS 1mM VPA	9,093727	575,1451545	4d	NS 1mM VPA	2,795937	Desconhecido	
NS 1mM VPA	9,093727	575,1451545	2d	NS 1mM VPA	4,232054	Desconhecido	
NS 1mM VPA	36,92372	575,3159222	2d	NS 1mM VPA	2,816601	Desconhecido	
NS 1mM VPA	36,92372	575,3159222	4d	NS 1mM VPA	3,446719	desconhecido n	
NS 1mM VPA	80,9297	583,44194	2d	NS 1mM VPA	1,503812	Desconhecido	

EXP	RT	Massa arredond.	tempo	trt	Duplicação	anotação,1	anotação,2
NS 1mM	80,9297	583,44194	4d	NS 1mM	4,532225	Desconhecido	
VPA				VPA			
NS 1mM	4,824	594,2327	4d	NS 1mM	2,212473	Desconhecido	
VPA				VPA			
NS 1mM	4,824	594,2327	2d	NS 1mM	4,279664	Desconhecido	
VPA				VPA			
NS 1mM	41,278	632,232825	2d	NS 1mM	3,171377	Desconhecido	
VPA				VPA			
NS 1mM	41,278	632,232825	4d	NS 1mM	4,764468	Desconhecido	
VPA				VPA			
NS 1mM	14,97571	659,1506941	4d	NS 1mM	3,054219	Desconhecido	
VPA				VPA			
NS 1mM	23,39707	660,1513786	2d	NS 1mM	3,542683	Desconhecido	
VPA				VPA			
NS 1mM	23,39707	660,1513786	4d	NS 1mM	4,100844	Desconhecido	
VPA				VPA			
NS 1mM	14,884	682,2853	2d	NS 1mM	2,823221	Desconhecido	
VPA				VPA			
NS 1mM	14,884	682,2853	4d	NS 1mM	5,153298	Desconhecido	
VPA				VPA			
NS 1mM	33,64471	822,2805429	2d	NS 1mM	2,668941	Desconhecido	
VPA				VPA			
NS 1mM	33,64471	822,2805429	4d	NS 1mM	3,816104	Desconhecido	
VPA				VPA			
NS 1mM	83,24742	907,54555	4d	NS 1mM	1,507945	Desconhecido	
VPA				VPA			
NS 1mM	83,24742	907,54555	2d	NS 1mM	1,586431	Desconhecido	
VPA				VPA			
NS 1mM	31,5316	908,22015	2d	NS 1mM	1,640148	Desconhecido	
VPA				VPA			
NS 1mM	31,5316	908,22015	4d	NS 1mM	1,998983	Desconhecido	
VPA				VPA			
NS 1mM	33,44333	1028,3246	2d	NS 1mM	5,833998	Desconhecido	
VPA				VPA			
NS 1mM	33,44333	1028,3246	4d	NS 1mM	8,654592	Desconhecido	
VPA				VPA			

EXP	RT	Massa arredond.	tempo 2d	trt	Duplicação	anotação,1	anotação,2
NS 1mM VPA	4,649125	1291,75965	4d	NS 1mM VPA	1,739338	beta-D-Glucosil-1,4-N-acetil-D-glucosaminildifosfoundecaprenol	
NS 1mM VPA	4,649125	1291,75965	4d	NS 1mM VPA	1,793695	beta-D-Glucosil-1,4-N-acetil-D-glucosaminildifosfoundecaprenol	

Tabela 7: Metabólitos celulares medidos em células hES tratadas com álcool

Tempo		Massa		Tempo		Duplic.		Valor P		Composto 1	Composto 2
Experimento	ret.										
ETOH 0,1	15,48433	99,0689	4D			1,434154		0,034571		N-Metil-2-pirrolidinona	
ETOH 0,1	52,01225	99,1043	4D			2,703447		0,012638		Desconhecido	
ETOH 0,1	13,40565	120,2112	4D			4,847027		0,029776		Desconhecido	
ETOH 0,1	16,73904	129,0452	24H			1,502328		0,002871		ácido 3,4-diidroxitributrico	
ETOH 0,1	88,64043	130,9541	24H			1,631614		0,046779		Desconhecido	
ETOH 0,1	22,22892	131,0746	24H			-1,85703		0,037466		3-Metilindol	
ETOH 0,1	14,35336	131,076	4D			3,62907		0,014778		Desconhecido	
ETOH 0,1	3,958833	148,0052	24H			-1,94841		0,034059		Desconhecido	
ETOH 0,1	52,88652	148,016	4D			-2,44409		0,047122		2-Oxo-4-ácido metiltiobutanóico	
ETOH 0,1	19,18355	168,0434	4D			-1,46785		0,019426		ácido Homogentísico	ácido vanílico
ETOH 0,1	26,70635	171,1244	24H			2,376107		0,008413		análogo GABA	
ETOH 0,1	22,17997	187,1343	24H			1,48782		0,045452		(+/-)-2-(4'-Isobutilfenil)propionitrila	
ETOH 0,1	46,31086	187,1348	4D			2,329144		4,21E-05		(+/-)-2-(4'-Isobutilfenil)propionitrila	
ETOH 0,1	5,935143	194,073	4D			-1,38924		0,003217		Fenantreno-9,10-oxide	
ETOH 0,1	31,19917	195,124	4D			-2,22499		0,004386		Benzenometanol, 2-(2-aminopropoxi)-3-metil-	a-[1-(etilamino)etil]-p-hidroxi-Alcool benzílico
ETOH 0,1	38,99212	195,1253	4D			2,158606		0,00953		Benzenometanol, 2-(2-aminopropoxi)-3-metil-	a-[1-(etilamino)etil]-p-hidroxi-Alcool benzílico
ETOH 0,1	48,37093	197,1769	4D			-3,11904		0,016197		Desconhecido	
ETOH 0,1	9,675726	203,1138	4D			-1,70728		0,023636		Acetilcarnitina	Ester n-butílico de ácido L-glutâmico

Experimento	Tempo ret.	Massa	Tempo	Duplic.	Valor P	Composto 1	Composto 2
ETOH 0,1	6,747279	205,1304	4D	-1,2578	0,005318	Pantotenol	dimetilbutanamida
ETOH 0,1	36,18938	210,0922	4D	1,864256	0,040527	ácido 3-(2,5-Dimetoxi fenilpropionico	
ETOH 0,1	24,52067	229,0949	24H	-2,33044	0,008877	Malonilcarnitina	
ETOH 0,1	17,7027	243,1089	4D	-2,18071	0,016141	Desconhecido	
ETOH 0,1	64,66999	266,1613	24H	-1,51898	0,047652	Desconhecido	
ETOH 0,1	42,3656	268,2487	4D	-1,54971	0,015019	Desconhecido	
ETOH 0,1	4,86619	271,9364	24H	2,629339	0,04245	Desconhecido	
ETOH 0,1	43,99398	272,16	24H	1,929598	0,032191	Desconhecido	
ETOH 0,1	43,99398	272,16	4D	2,186768	0,003018	Desconhecido	
ETOH 0,1	63,00428	285,2285	24H	4,002774	0,018095	Desconhecido	
ETOH 0,1	37,97297	292,1862	4D	2,239381	0,0496	Desconhecido	
ETOH 0,1	4,014175	293,9773	4D	1,938848	0,036775	Desconhecido	
ETOH 0,1	6,160071	294,0957	24H	1,269183	0,005089	Desconhecido	
ETOH 0,1	8,967061	295,1521	4D	1,513407	0,042025	Desconhecido	
ETOH 0,1	71,55535	296,2308	24H	3,545035	0,003758	Desconhecido	
ETOH 0,1	50,75387	298,174	4D	-3,00237	0,045113	Desconhecido	
ETOH 0,1	18,88505	300,1147	4D	2,686262	0,023485	Desconhecido	
ETOH 0,1	17,18696	300,1656	24H	1,548853	0,036582	Desconhecido	
ETOH 0,1	7,719471	301,1345	4D	6,648828	0,030822	Desconhecido	
ETOH 0,1	15,22357	312,1341	4D	-2,01503	0,041156	Desconhecido	
ETOH 0,1	26,51229	315,6732	4D	2,014609	0,010998	Desconhecido	
ETOH 0,1	18,82373	325,2711	4D	-1,75625	0,013853	Desconhecido	
ETOH 0,1	20,94557	325,2714	4D	-2,07426	0,00333	Desconhecido	
ETOH 0,1	8,542672	337,2012	24H	1,402499	0,000372	Desconhecido	
ETOH 0,1	3,85935	353,2765	4D	2,622059	0,002006	Desconhecido	
ETOH 0,1	25,16993	357,1781	4D	2,217294	0,001346	Desconhecido	
ETOH 0,1	24,01428	359,1532	4D	1,535704	0,033	Desconhecido	
ETOH 0,1	18,50245	360,1321	4D	2,11023	0,004465	Desconhecido	
ETOH 0,1	83,72506	362,2787	24H	2,819814	0,04795	Desconhecido	
ETOH 0,1	83,72506	362,2787	4D	2,916423	0,023844	Desconhecido	
ETOH 0,1	27,98054	368,2122	4D	1,69537	0,02565	Desconhecido	
ETOH 0,1	20,76168	379,1771	24H	-1,72285	0,021135	Desconhecido	
ETOH 0,1	20,76168	379,1771	4D	1,539861	0,019592	Desconhecido	

Experimento	Tempo ret.	Massa	Tempo	Duplic.	Valor P	Composto 1	Composto 2
ETOH 0,1	15,20829	383,1721	4D	1,914543	0,043581	Desconhecido	
ETOH 0,1	23,38956	384,2127	4D	-2,55567	0,025704	Desconhecido	
ETOH 0,1	51,65871	386,1724	4D	5,308852	0,032774	(+)-Eudesmina	
ETOH 0,1	19,97914	387,0812	4D	-1,97698	0,024641	Desconhecido	
ETOH 0,1	19,97914	387,0812	24H	1,739051	0,018391	Desconhecido	
ETOH 0,1	17,53242	388,1815	24H	-1,44894	0,012322	Desconhecido	
ETOH 0,1	46,346	388,2349	4D	1,946524	0,002762	Desconhecido	
ETOH 0,1	15,90129	393,1889	24H	-1,43098	0,022977	Desconhecido	
ETOH 0,1	6,259963	396,1687	24H	1,717607	0,047952	Desconhecido	
ETOH 0,1	51,66325	403,1978	4D	3,11601	0,048224	Desconhecido	
ETOH 0,1	30,70733	405,2001	4D	2,668076	0,001676	Desconhecido	
ETOH 0,1	16,21743	408,1636	4D	1,965641	0,028858	Desconhecido	
ETOH 0,1	21,14975	417,2386	4D	-1,97972	0,007183	Desconhecido	
ETOH 0,1	33,09057	417,2338	4D	2,032563	0,016902	Desconhecido	
ETOH 0,1	26,77212	420,1862	4D	3,282511	0,030236	Desconhecido	
ETOH 0,1	18,03482	429,2533	4D	-1,80751	0,006213	Desconhecido	
ETOH 0,1	30,24237	429,2535	4D	1,804876	0,044332	Desconhecido	
ETOH 0,1	35,58196	431,2501	4D	1,532408	0,037928	Desconhecido	
ETOH 0,1	32,18393	437,2042	24H	24,53212	0,001124	Desconhecido	
ETOH 0,1	4,808947	440,0223	4D	-1,52785	0,03034	Desconhecido	
ETOH 0,1	24,13915	443,2381	4D	2,985557	0,023682	Desconhecido	
ETOH 0,1	67,0705	443,3216	4D	1,751997	0,037074	Desconhecido	
ETOH 0,1	51,58546	444,2237	4D	2,130512	0,031074	Desconhecido	
ETOH 0,1	33,51823	460,9391	4D	-4,51805	0,005949	Desconhecido	
ETOH 0,1	22,95657	462,2217	24H	-1,98563	0,0437	Desconhecido	
ETOH 0,1	25,3287	464,225	24H	-1,63071	0,025852	Desconhecido	
ETOH 0,1	46,51446	467,3804	4D	2,068091	0,042613	Desconhecido	
ETOH 0,1	51,6158	468,2002	4D	1,875012	0,015762	Desconhecido	
ETOH 0,1	30,37291	471,1928	4D	2,001387	0,022662	glucuronídeo	
ETOH 0,1	30,72707	471,7804	4D	-2,83569	0,037476	Desconhecido	
ETOH 0,1	30,28867	478,2761	4D	1,698899	0,000475	Desconhecido	
ETOH 0,1	72,7735	482,3062	24H	-1,95925	0,042853	Desconhecido	
ETOH 0,1	6,676207	485,2069	24H	-2,01419	0,013732	Desconhecido	
ETOH 0,1	66,73744	487,3472	4D	2,931014	0,007475	Desconhecido	

Experimento	Tempo ret.	Massa	Tempo	Duplic.	Valor P	Composto 1	Composto 2
ETOH 0,1	21,72729	489,2127	4D	-1,51037	0,0314	Desconhecido	
ETOH 0,1	31,22083	510,8202	4D	2,488196	0,011267	Desconhecido	
ETOH 0,1	34,35986	521,9924	24H	-1,44593	0,032994	Desconhecido	
ETOH 0,1	34,57864	525,3161	4D	1,551324	0,037545	Desconhecido	
ETOH 0,1	51,73057	526,2773	4D	3,445707	0,006877	Desconhecido	
ETOH 0,1	23,87065	530,314	4D	1,964552	0,006366	L-Oleandro-oleandolideo	
ETOH 0,1	32,50661	531,2876	4D	2,106138	0,024689	Desconhecido	
ETOH 0,1	35,58454	531,3191	4D	-1,25162	0,027019	Desconhecido	
ETOH 0,1	66,31491	531,3736	4D	3,862674	0,01116	Desconhecido	
ETOH 0,1	32,24719	541,3274	4D	2,161601	0,038319	Desconhecido	
ETOH 0,1	17,6573	545,3029	4D	-1,39484	0,043629	Desconhecido	
ETOH 0,1	31,891	554,8471	4D	2,038489	0,037688	Desconhecido	
ETOH 0,1	15,78741	555,2406	4D	1,835025	0,014923	Desconhecido	
ETOH 0,1	5,742094	555,8505	4D	-1,28922	0,017625	Desconhecido	
ETOH 0,1	88,02533	556,3971	4D	-3,11839	0,016192	Desconhecido	
ETOH 0,1	31,97996	559,8329	4D	-1,7213	0,049678	Desconhecido	
ETOH 0,1	24,7039	574,3397	4D	1,58436	0,02116	Desconhecido	
ETOH 0,1	31,71105	574,3427	4D	1,750055	0,026643	Desconhecido	
ETOH 0,1	47,90467	576,096	4D	1,361314	0,021201	Desconhecido	
ETOH 0,1	16,90923	577,2825	24H	1,727637	0,047154	Desconhecido	
ETOH 0,1	35,26918	589,6938	4D	1,819573	0,027966	Desconhecido	
ETOH 0,1	31,54325	591,3789	4D	1,578222	0,000714	Desconhecido	
ETOH 0,1	25,14927	596,3543	4D	1,395808	0,049214	L-Urobilinogenio	
ETOH 0,1	32,67372	603,3535	4D	-2,62952	0,015253	Desconhecido	
ETOH 0,1	8,056862	612,1509	24H	-1,47366	0,02889	glutaciona oxidada	glutaciona oxidada
ETOH 0,1	33,68866	619,3409	4D	1,856648	0,030722	Desconhecido	dissulfeto de glutaciona; GSSG; Oxiglutaciona
ETOH 0,1	32,73907	620,8861	4D	2,248558	0,00893	Desconhecido	
ETOH 0,1	32,08734	635,4065	4D	1,392618	0,030885	Desconhecido	
ETOH 0,1	5,903429	646,7084	4D	-1,27147	0,020652	Desconhecido	
ETOH 0,1	26,7452	661,3846	4D	1,295402	0,046573	Desconhecido	
ETOH 0,1	33,48766	677,9101	24H	-2,22083	0,028347	Desconhecido	
ETOH 0,1	31,11764	693,4124	4D	2,318353	0,028562	Desconhecido	

Experimento	Tempo ret.	Massa	Tempo	Duplic.	Valor P	Composto 1	Composto 2
ETOH 0,1	28,2045	695,4286	24H	-32,9384	0,027453	Desconhecido	
ETOH 0,1	33,70266	699,9225	4D	1,719036	0,039493	Desconhecido	Neu5Acalfa2-3Galbeta1-4Glcbeta-Sp
ETOH 0,1	40,84822	702,2497	4D	-2,76945	0,001031		
ETOH 0,1	34,62439	707,3928	4D	2,136871	0,0353	Desconhecido	
ETOH 0,1	56,18269	707,4296	24H	1,489574	0,046762	Desconhecido	
ETOH 0,1	33,73428	708,9387	4D	2,159654	0,006959	Desconhecido	
ETOH 0,1	4,826824	711,8344	24H	-3,02033	0,013448	Desconhecido	
ETOH 0,1	33,89008	730,4494	4D	2,613893	0,009133	Desconhecido	
ETOH 0,1	47,76987	722,0954	4D	-2,77579	0,004811	Desconhecido	
ETOH 0,1	50,6027	732,007	4D	1,795393	0,021782	Desconhecido	
ETOH 0,1	35,028	751,4193	4D	1,87008	0,032616	Desconhecido	
ETOH 0,1	34,12668	752,4629	4D	2,066515	0,031345	Desconhecido	
ETOH 0,1	69,32865	765,5211	24H	1,873064	0,033127	Desconhecido	
ETOH 0,1	34,33545	774,4767	4D	2,103658	0,020363	Desconhecido	
ETOH 0,1	89,29926	774,5055	4D	-2,40077	0,006755	Desconhecido	
ETOH 0,1	5,886782	780,241	4D	-1,31403	0,025516	Desconhecido	
ETOH 0,1	34,52749	796,4891	4D	1,926524	0,049615	Desconhecido	
ETOH 0,1	34,60124	796,9917	4D	1,818186	0,015806	Desconhecido	
ETOH 0,1	4,613879	820,8181	4D	-1,47009	0,047535	Desconhecido	
ETOH 0,1	5,259716	888,8041	4D	-1,45771	0,021932	Desconhecido	
ETOH 0,1	8,502051	909,5934	24H	2,274264	0,037836	Desconhecido	
ETOH 0,1	5,217833	913,8074	24H	-1,86064	0,028059	Desconhecido	
ETOH 0,1	5,399211	921,0025	4D	1,677834	0,001526	Desconhecido	
ETOH 0,1	3,646902	994,0917	24H	1,441829	0,019979	Desconhecido	
ETOH 0,1	3,705141	1008,072	4D	1,30378	0,048393	Desconhecido	
ETOH 0,1	5,177162	1038,786	4D	1,677834	0,030851	Desconhecido	
ETOH 0,3	85,57399	83,0372	24H	2,472036	0,010882	Desconhecido	
ETOH 0,3	15,48433	99,0689	4D	1,337742	0,043286	N-Metil-2-pirrolidinona	
ETOH 0,3	15,48433	99,0689	24H	1,467845	0,043638	N-Metil-2-pirrolidinona	
ETOH 0,3	52,01225	99,1043	24H	3,331103	0,000378	Desconhecido	
ETOH 0,3	10,21225	101,1201	24H	2,191927	0,043209	Hexilamina	
ETOH 0,3	4,032816	111,9839	4D	-8,67642	0,018374	tiosulfato	
ETOH 0,3	3,767232	120,0436	4D	1,936297	0,034585	ácido 3,4-	

Experimento	Tempo ret.	Massa	Tempo	Duplic.	Valor P	Composto 1	Composto 2
ETOH 0,3	13,40565	120,2112	4D	3,90007	0,046375	Diidroxibutírico	
						Desconhecido	
						ácido 3,4-	
ETOH 0,3	16,73904	129,0452	24H	1,795891	3,32E-05	Diidroxibutírico	
ETOH 0,3	88,64043	130,9541	24H	2,024969	0,006982	Desconhecido	
ETOH 0,3	22,22892	131,0746	4D	2,502205	0,049833	3-Metilindol	
ETOH 0,3	14,35336	131,076	4D	4,050219	0,020549	Desconhecido	
ETOH 0,3	3,958833	148,0052	24H	-1,72967	0,043053	Desconhecido	
						ácido Amino-	
ETOH 0,3	7,479235	149,0511	4D	-1,30477	0,014313	4metiltiobutírico	
ETOH 0,3	27,80141	153,0811	24H	-1,6976	0,025771	Desconhecido	
ETOH 0,3	5,559732	155,0681	4D	1,637846	0,022817	L-Histidina	ácido 4-propiónico
ETOH 0,3	14,22357	161,0805	24H	-6,43527	0,032474	Desconhecido	
ETOH 0,3	44,88033	162,0662	4D	1,799131	0,037703	Desconhecido	
ETOH 0,3	23,6763	167,0941	24H	-2,83	0,012984	3-Metoxitiramina	Fenilefrina
ETOH 0,3	19,18355	168,0434	4D	1,281914	0,028006	ácido Homogentísico	ácido Vanílico
ETOH 0,3	26,70635	171,1244	24H	3,755227	0,001253	análogo de GABA	
						1,3-Dimetil-8-	
ETOH 0,3	20,23014	173,084	24H	-1,43983	0,019446	isoquinolínol	
ETOH 0,3	28,52393	178,5546	24H	-2,76389	0,001401	Desconhecido	
							9-Hidroxifenantreno; 9-fenantrol
ETOH 0,3	5,935143	194,073	4D	-1,39988	0,002956	Fenantreno-9,10-óxido	
ETOH 0,3	22,61355	194,0836	24H	-1,70303	0,030955	Desconhecido	
						Benzenometanol, 2-(2-aminopropoxi)-3-metil-	a-[1-(etilamino)etil]-p-hidroxi-Alcool benzílico
ETOH 0,3	31,19917	195,124	4D	-1,86013	0,015911	Desconhecido	
ETOH 0,3	19,48063	201,1709	4D	-2,97874	0,009458	Desconhecido	
ETOH 0,3	6,747279	205,1304	4D	-1,33858	0,014168	Pantotenol	dimetilbutanamida;
						ácido 3-(2,5-Dimetoxi fenilpropionico	
ETOH 0,3	36,18938	210,0922	4D	1,849968	0,042032	Desconhecido	
ETOH 0,3	6,62669	218,0762	4D	-1,77129	0,047105	Desconhecido	
ETOH 0,3	27,57188	222,0401	24H	-2,11155	0,040386	Desconhecido	
ETOH 0,3	13,6845	223,119	24H	-2,73967	0,024694	Desconhecido	Desconhecido
ETOH 0,3	24,52067	229,0949	4D	-1,74038	0,010344	Malonilcarnitina	Malonilcarnitina
ETOH 0,3	55,50731	229,1457	4D	-1,53336	0,028395	Desconhecido	

Experimento	Tempo ret.	Massa	Tempo	Duplic.	Valor P	Composto 1	Composto 2
ETOH 0,3	5,033976	340,9252	24H	-1,83604	0,037709	Desconhecido	
ETOH 0,3	5,033976	340,9252	4D	2,624968	0,049915	Desconhecido	
ETOH 0,3	68,02448	342,1482	24H	-1,85279	0,043066	Desconhecido	
ETOH 0,3	3,85935	353,2765	4D	4,904139	0,000229	Desconhecido	
ETOH 0,3	18,50245	360,1321	24H	-2,28881	0,005116	Desconhecido	
ETOH 0,3	83,72506	362,2787	24H	-2,54153	0,005266	Desconhecido	
ETOH 0,3	20,16372	365,1606	4D	-1,92519	0,027055	Desconhecido	
ETOH 0,3	11,47109	375,1898	4D	2,131693	0,028486	Desconhecido	
ETOH 0,3	26,07722	375,1886	4D	-4,75123	0,000746	Desconhecido	
ETOH 0,3	41,28494	378,2956	24H	1,636485	0,027631	Desconhecido	
ETOH 0,3	15,20829	383,1721	4D	3,377369	0,002214	Desconhecido	
ETOH 0,3	51,65871	386,1724	4D	4,85106	0,031786	(+)-Eudesmina	
ETOH 0,3	19,97914	387,0812	4D	-1,69949	0,015257	Desconhecido	
ETOH 0,3	46,346	388,2349	4D	-1,53209	0,040255	Desconhecido	
ETOH 0,3	15,90129	393,1889	24H	-1,51089	0,011717	Desconhecido	
ETOH 0,3	19,69092	393,1886	4D	-2,05894	0,011258	Desconhecido	
ETOH 0,3	6,259963	396,1687	4D	2,422002	0,013544	Desconhecido	
ETOH 0,3	17,27421	403,1984	4D	-2,30266	0,00281	Desconhecido	
ETOH 0,3	21,14975	417,2386	4D	-1,57309	0,03368	Desconhecido	
ETOH 0,3	33,09057	417,2338	4D	-1,77978	0,026439	Desconhecido	
ETOH 0,3	13,35295	420,0513	4D	-1,90198	0,003417	Desconhecido	
ETOH 0,3	27,46219	421,2201	4D	-2,27332	0,012803	Desconhecido	
ETOH 0,3	18,03482	429,2533	4D	-2,20091	0,002807	Desconhecido	
ETOH 0,3	54,46495	440,0284	24H	2,51037	0,011972	Desconhecido	
ETOH 0,3	30,87201	443,2339	4D	2,171362	0,0186	Desconhecido	
ETOH 0,3	67,0705	443,3216	4D	1,688451	0,048544	Desconhecido	
ETOH 0,3	51,58546	444,2237	24H	2,241866	0,044444	Desconhecido	
ETOH 0,3	51,58546	444,2237	4D	2,030169	0,032667	Desconhecido	
ETOH 0,3	30,05687	444,2789	24H	-1,83503	0,021764	Desconhecido	
ETOH 0,3	54,8719	446,0431	24H	-2,22145	0,049006	Desconhecido	
ETOH 0,3	54,8719	446,0431	4D	1,933882	0,047398	Desconhecido	
ETOH 0,3	29,86415	447,2509	4D	-1,85819	0,025964	Desconhecido	
ETOH 0,3	29,86415	447,2509	24H	2,10322	0,036254	Desconhecido	
ETOH 0,3	30,45343	449,2653	4D	-2,41429	0,016795	Desconhecido	

Experimento	Tempo ret.	Massa	Tempo	Duplic.	Valor P	Composto 1	Composto 2
ETOH 0,3	26,7452	661,3846	4D	1,546707	0,010714	Desconhecido	
ETOH 0,3	16,3338	666,3836	24H	-1,37135	0,037278	Desconhecido	
ETOH 0,3	33,48766	677,9101	24H	-2,64653	0,009907	Desconhecido	
ETOH 0,3	40,84822	702,2497	24H	1,283337	0,019733	Neu5Acalfa2-3Galbeta1-4Glcbeta-Sp	
ETOH 0,3	40,84822	702,2497	4D	-2,21591	0,004389	Neu5Acalfa2-3Galbeta1-4Glcbeta-Sp	
ETOH 0,3	30,43889	707,3933	24H	-1,79166	0,048232	Desconhecido	
ETOH 0,3	56,18269	707,4296	24H	-2,43361	0,009442	Desconhecido	
ETOH 0,3	4,826824	711,8344	24H	-2,25605	0,017007	Desconhecido	
ETOH 0,3	47,76987	731,0954	4D	-3,25036	0,027339	Desconhecido	
ETOH 0,3	5,918027	732,007	4D	1,76125	0,038454	Desconhecido	
ETOH 0,3	35,028	751,4193	24H	-1,70279	0,045682	Desconhecido	
ETOH 0,3	35,028	751,4193	4D	1,845101	0,0375	Desconhecido	
ETOH 0,3	69,32865	765,5211	24H	1,884393	0,027105	Desconhecido	
ETOH 0,3	34,33545	774,4767	24H	-2,34161	0,036388	Desconhecido	
ETOH 0,3	34,60124	796,9917	4D	1,688919	0,047852	Desconhecido	
ETOH 0,3	4,613879	820,8181	24H	-1,85112	0,038895	Desconhecido	
ETOH 0,3	4,613879	820,8181	4D	-1,57113	0,014605	Desconhecido	
ETOH 0,3	5,259716	888,8041	24H	1,221624	0,043348	Desconhecido	
ETOH 0,3	5,217833	913,8074	24H	-1,88465	0,026148	Desconhecido	
ETOH 0,3	5,399211	921,0025	4D	1,944905	2,78E-05	Desconhecido	
ETOH 0,3	5,387775	922,0048	24H	-2,75471	0,015691	Desconhecido	
ETOH 0,3	3,680188	980,075	4D	1,480926	0,012893	Desconhecido	
ETOH 0,3	3,646902	994,0917	4D	1,604696	0,000395	Desconhecido	
ETOH 0,3	3,705141	1008,072	4D	1,415783	0,021503	Desconhecido	
ETOH 0,3	5,177162	1038,786	4D	1,588208	0,030971	Desconhecido	
ETOH 0,3	5,8905	1040,323	4D	-1,47887	0,009656	Desconhecido	

Todas as referências citadas aqui são incorporadas por referência. Além disso, a invenção não se destina a ser limitada às formas de realização descritas da invenção. Deve ser entendido que a descrição acima enfatiza algumas formas de realização específicas da invenção e que todas as 5 modificações e alternativas equivalentes à mesma estão dentro do espírito e escopo da invenção como especificada nas reivindicações anexas.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para identificar um ou uma pluralidade de metabólitos celulares tendo um peso molecular de cerca de 10 a cerca de 1500 Daltons que é diferencialmente produzido em células-tronco embriônicas humanas (hESCs) ou células específicas na linhagem derivadas de hESC contatadas com um composto de teste, caracterizado pelo fato de compreender as etapas de:

a) cultivar hESCs ou células específicas na linhagem derivadas de hESC na presença ou ausência de um composto de teste;

b) testar um ou uma pluralidade de metabólitos celulares tendo um peso molecular de cerca de 10 a cerca de 1500 Daltons em hESCs ou células específicas na linhagem derivadas de hESC cultivadas na presença e ausência do composto de teste; e

c) identificar pelo menos um produto metabólito tendo um peso molecular de cerca de 10 a cerca de 1500 Daltons que é diferencialmente produzido nas células na presença ou ausência do composto de teste.

2. Método de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelo fato de que pelo menos um dos metabólitos celulares é produzido em maiores quantidades na presença do composto de teste do que na ausência do composto de teste.

3. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que pelo menos um dos metabólitos celulares é produzido em maiores quantidades na ausência do composto de teste do que na presença do composto de teste.

4. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que os metabólitos celulares são secretados ou excretados das hESCs ou células específicas na linhagem derivadas de hESC.

5. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o metabólito celular é um produto de molécula pequena tendo um

peso molecular de cerca de 100 a cerca de 1000 Daltons.

6. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o composto de teste é um composto tóxico ou teratogênico.

5 7. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que um ou uma pluralidade de metabólitos celulares é testado usando um método de separação física.

10 8. Método de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o método de separação física é cromatografia de líquido/tempo de ionização por eletropulverização de espectrometria de massa por tempo de voo.

9. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que os metabólitos celulares são tetraidrofolato, diidrofolato ou outros metabólitos na via metabólica de folato, glutatona, ou glutatona oxidada.

15 10. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que os metabólitos celulares candidatos são quinurenina, 8-metoxiquinurenato, N'-formilquinurenina 7,8-diidro-7,8- diidroxiquinurenato, 5-hidroxitriptofano, N-acetil-D-triptofano, glutamato, ácido piroglutâmico ou outros metabólitos nas vias metabólicas de triptofano ou glutamato, histamina, dopamina, ácido 3,4-diidroxiбутírico, serotonina, ou ácido gama-aminobutírico (GABA)..

20 11. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que uma pluralidade de metabólitos celulares é identificada.

25 12. Método de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que a pluralidade de metabólitos celulares identificados compreende um perfil de biomarcador.

13. Método de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que um dos metabólitos celulares compreendendo um perfil de biomarcador é quinurenina.

14. Método de acordo com a reivindicação 11, caracterizado

pelo fato de que o composto de teste é um composto tóxico ou teratogênico.

15. Método de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que a pluralidade de metabólitos celulares identificados compreende um perfil de biomarcador característico de hESC ou resposta de
5 célula específica de linhagem derivada de hESC a um composto tóxico ou teratogênico.

16. Método para triar um composto de teste para identificar um efeito do composto em células-tronco embriônicas humanas (hESCs) ou células específicas na linhagem derivadas de hESC contatadas com o
10 composto de teste, caracterizado pelo fato de compreender as etapas de:

a) cultivar hESCs ou células específicas na linhagem derivadas de hESC na presença ou ausência de um composto de teste

b) testar hESCs ou células específicas na linhagem derivadas de hESC cultivadas na presença e ausência do composto de teste para
15 produção de um ou uma pluralidade de metabólitos celulares tendo um peso molecular de cerca de 10 a cerca de 1500 Daltons; e

c) identificar compostos de teste que produzem pelo menos um metabólito celular tendo um peso molecular de cerca de 10 a cerca de 1500 Daltons que é diferencialmente produzido nas células na presença ou ausência
20 do composto de teste.

17. Método de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que pelo menos um dos metabólitos celulares é produzido em maiores quantidades na presença do composto de teste do que na ausência do
composto de teste.

18. Método de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que pelo menos um dos metabólitos celulares é produzido em maiores quantidades na ausência do composto de teste do que na presença do
25 composto de teste.

19. Método de acordo com a reivindicação 16, caracterizado

pelo fato de que os metabólitos celulares são secretados ou excretados das hESCs ou células específicas na linhagem derivadas de hESC.

20. Método de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que pelo menos um dos metabólitos celulares é uma molécula pequena metabólito tendo um peso molecular de cerca de 100 a cerca de 1000 Daltons.

21. Método de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que o composto de teste é um composto tóxico ou teratogênico.

22. Método de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que a pluralidade de metabólitos celulares é testada usando um método de separação física.

23. Método de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que o método de separação física é cromatografia de líquido/tempo de ionização por eletropulverização de espectrometria de massa por tempo de voo.

24. Método de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que os metabólitos celulares candidatos são tetraidrofolato, diidrofolato ou outros metabólitos na via metabólica de folato, glutaciona, ou glutaciona oxidada.

25. Método de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que os metabólitos celulares candidatos são quinurenina, 8-metoxiquinurenato, N'-formilquinurenina, 7,8-diidro-7,8-10 diidroxiquinurenato, 5-hidroxitriptofano, N-acetil-D-triptofano, glutamato, ácido piroglutâmico ou outros metabólitos nas vias metabólicas de triptofano ou glutamato, histamina, dopamina, serotonina, ácido gama-aminobutírico (GABA) ou outras espécies de ácido butírico.

26. Método de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que uma pluralidade de metabólitos celulares é identificada.

27. Método de acordo com a reivindicação 26, caracterizado

pelo fato em que a pluralidade de metabólitos celulares identificados compreende um perfil de biomarcador.

28. Método de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que um dos metabólitos celulares compreendendo um perfil de biomarcador é quinurenina.

29. Método de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que o composto de teste é um composto tóxico ou teratogênico.

30. Método de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de que a pluralidade de metabólitos celulares identificados compreende um perfil de biomarcador característico de resposta de hESC a um composto tóxico ou teratogênico.

31. Método para testar um composto de teste para toxicidade ou teratogenicidade a células-tronco embrionárias humanas (hESCs) ou células específicas na linhagem derivadas de hESC contatadas com o composto de teste, caracterizado pelo fato de compreender as etapas de:

a) cultivar hESCs ou células específicas na linhagem derivadas de hESC na presença ou ausência de um composto de teste

b) testar hESCs ou células específicas na linhagem derivadas de hESC cultivadas na presença e ausência do composto de teste para identificar um ou uma pluralidade de metabólitos celulares tendo um peso molecular de cerca de 10 a cerca de 1500 Daltons produzidos por hESCs contatadas com um composto tóxico ou teratogênico; e

c) identificar compostos de teste em que hESCs ou células específicas de linhagem derivadas de hESC produzem um ou uma pluralidade de metabólitos celulares tendo um peso molecular de cerca de 10 a cerca de 1500 Daltons na presença ou ausência do composto de teste em que referidos metabólitos celulares são produzidos por hESCs ou células específicas na linhagem derivadas de hESC contatadas com um composto tóxico ou teratogênico.

32. Método de acordo com a reivindicação 31 caracterizado pelo fato de que pelo menos um dos metabólitos celulares é produzido em maiores quantidades na presença do composto de teste do que na ausência do composto de teste.

5 33. Método de acordo com a reivindicação 31 caracterizado pelo fato de que pelo menos um dos metabólitos celulares é produzido em maiores quantidades na ausência do composto de teste do que na presença do composto de teste.

10 34. Método de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de que os metabólitos celulares são secretados ou excretados das hESCs ou células específicas na linhagem derivadas de hESC.

35. Método de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de que o metabólito celular é um metabólito de célula pequena tendo um peso molecular de cerca de 100 a cerca de 1000 Daltons.

15 36. Método de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de que o composto de teste é um composto tóxico ou teratogênico.

37. Método de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de que metabólitos celulares são testados usando um método de separação física.

20 38. Método de acordo com a reivindicação 37, caracterizado pelo fato de que o método de separação física é cromatografia de líquido/tempo de ionização por eletropulverização de espectrometria de massa por tempo de voo.

25 39. Método de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de que os metabólitos celulares candidatos são tetraidrofolato, diidrofolato ou outros metabólitos na via metabólica de folato, glutatona, ou glutatona oxidada.

40 . Método de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de que os metabólitos celulares candidatos são quinurenina, 8-

metoxiquinurenato, N'-formilquinurenina 7,8-diidro-7,8- diidroxiquinurenato 5-hidroxitriptofano, N-acetil-D-triptofano, glutamato, ácido piroglutâmico ou outros metabólitos nas vias metabólicas de triptofano ou glutamato, histamina, dopamina, ácido 3,4-diidroxiбутírico, serotonina, ácido gama-aminobutírico (GABA) ou outras espécies de ácido butírico.

41. Método de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de que uma pluralidade de metabólitos celulares é identificada.

42. Método de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que a pluralidade de metabólitos celulares identificados compreendem um perfil de biomarcador.

43. Método de acordo com a reivindicação 42, caracterizado pelo fato de um dos metabólitos celulares compreendendo um perfil de biomarcador é quinurenina.

44. Método de acordo com a reivindicação 43, caracterizado pelo fato de que o composto de teste é um composto tóxico ou teratogênico.

45. Método de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de que uma pluralidade de metabólitos celulares identificados compreende um perfil de biomarcador característico de resposta de hESC a um composto tóxico ou teratogênico.

46. Perfil de biomarcador para identificar um composto de teste como um composto tóxico, caracterizado pelo fato de que o perfil de biomarcador compreende um ou uma pluralidade de metabólitos celulares tendo um peso molecular de cerca de 10 a cerca de 1500 Daltons os quais são diferencialmente produzidos em células-tronco embriônicas humanas (hESCs) ou células específicas nas linhagens derivadas de hESC contatadas com um composto tóxico ou compostos.

47. Perfil de biomarcador de acordo com a reivindicação 46, caracterizado pelo fato de compreender tetraidrofolato, diidrofolato ou outros metabólitos na via metabólica de folato, glutatona, ou glutatona oxidada.

48. Perfil de biomarcador de acordo com a reivindicação 46, caracterizado pelo fato de compreender quinurenina, 8- metoxiquinurenato, N'-formilquinurenina 7,8-diidro-7,8-diidroxiquinurenato 5- hidroxitriptofano, N-acetil-D-triptofano, glutamato, ácido piroglutâmico ou outros metabólitos nas vias metabólicas de triptofano ou glutamato, histamina, dopamina, ácido 3,4-diidroxibutírico, serotonina, ácido gama-aminobutírico (GABA) ou outras espécies de ácido butírico.

49. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de ainda compreender a etapa de comparar pelo menos um produto metabólito tendo um peso molecular de cerca de 10 a cerca de 1500 Daltons que é diferencialmente produzido nas células na presença ou ausência do composto de teste com um perfil de biomarcador compreendendo um ou uma pluralidade de metabólitos celulares tendo um peso molecular de cerca de 10 a cerca de 1500 Daltons os quais são diferencialmente produzidos em células-tronco embriônicas humanas (hESCs) ou células específicas na linhagem derivadas de hESC contatadas com um composto tóxico ou compostos.

50. Método de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de ainda compreender a etapa de comparar pelo menos um produto metabólito tendo um peso molecular de cerca de 10 a cerca de 1500 Daltons que é diferencialmente produzido nas células na presença ou ausência do composto de teste com um perfil de biomarcador compreendendo um ou uma pluralidade de metabólitos celulares tendo um peso molecular de cerca de 10 a cerca de 1500 Daltons os quais são diferencialmente produzidos em células-tronco embriônicas humanas (hESCs) ou células específicas na linhagem derivadas de hESC contatadas com um composto tóxico ou compostos.

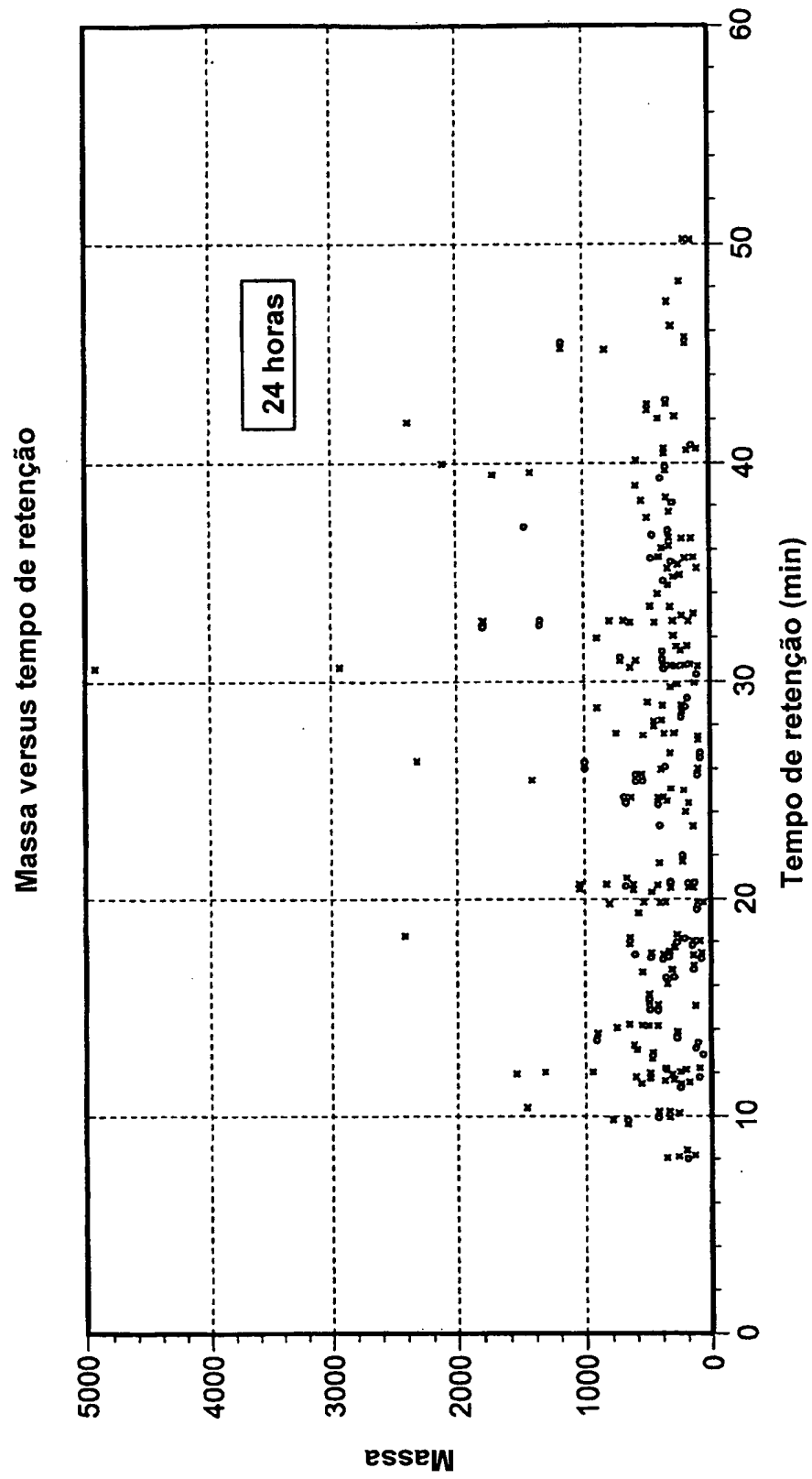
51. Método de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de ainda compreender a etapa de comparar pelo menos um produto metabólito tendo um peso molecular de cerca de 10 a cerca de 1500 Daltons que é diferencialmente produzido nas células na presença ou ausência do

composto de teste com um perfil de biomarcador compreendendo um ou uma pluralidade de metabólitos celulares tendo um peso molecular de cerca de 10 a cerca de 1500 Daltons os quais são diferencialmente produzidos em células-tronco embriônicas humanas (hESCs) ou células específicas na linhagem derivadas de hESC contatadas com um composto tóxico ou compostos.

52. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que pelo menos dois metabólitos celulares tendo um peso molecular de cerca de 10 a cerca de 1500 Daltons são diferencialmente produzidos nas células na presença ou ausência do composto de teste são detectados.

53. Método de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que pelo menos dois metabólitos celulares tendo um peso molecular de cerca de 10 a cerca de 1500 Daltons são diferencialmente produzidos nas células na presença ou ausência do composto de teste são detectados.

54. Método de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de que pelo menos dois metabólitos celulares tendo um peso molecular de cerca de 10 a cerca de 1500 Daltons são diferencialmente produzidos nas células na presença ou ausência do composto de teste são detectados.



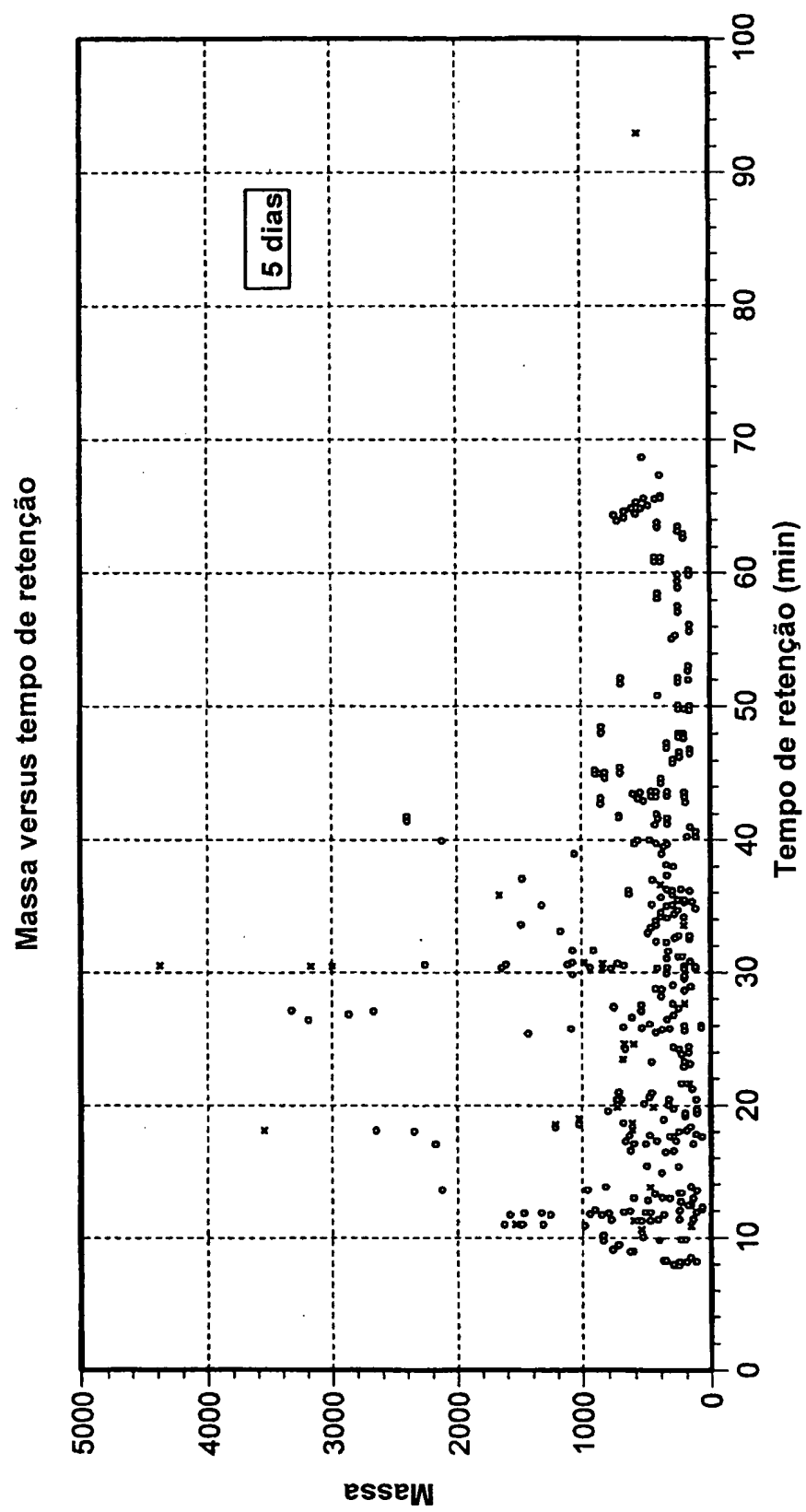
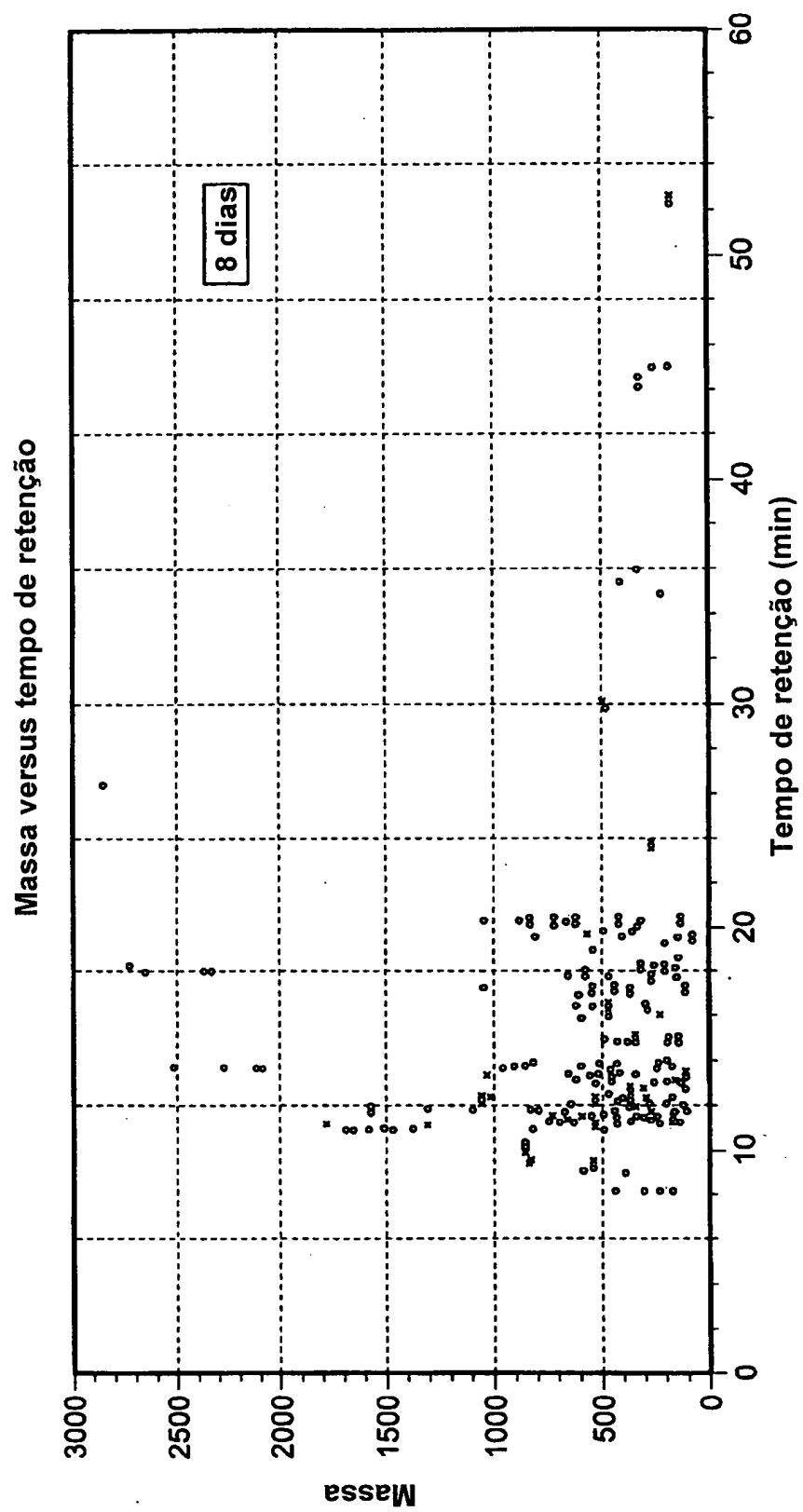
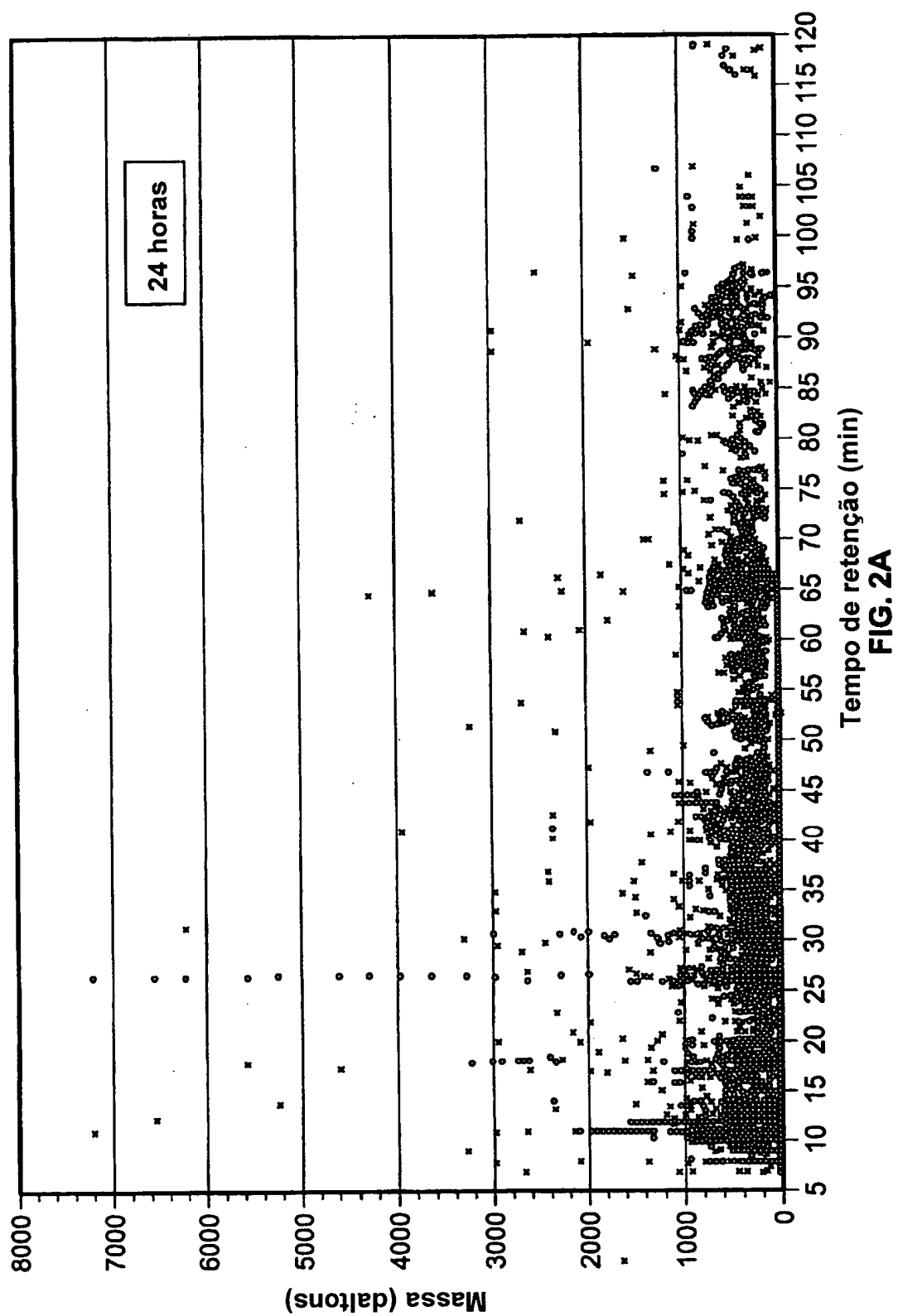


FIG. 1B





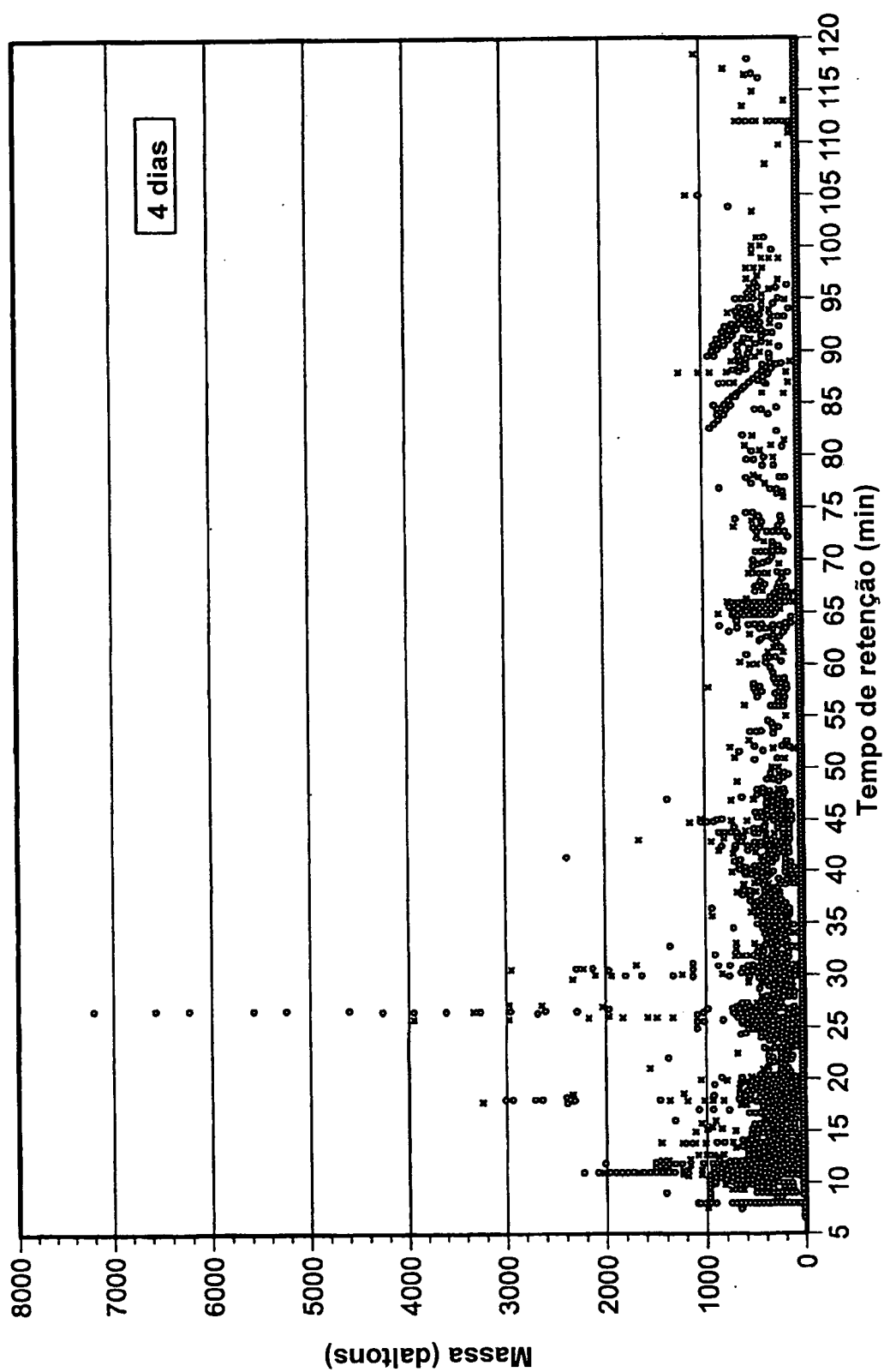
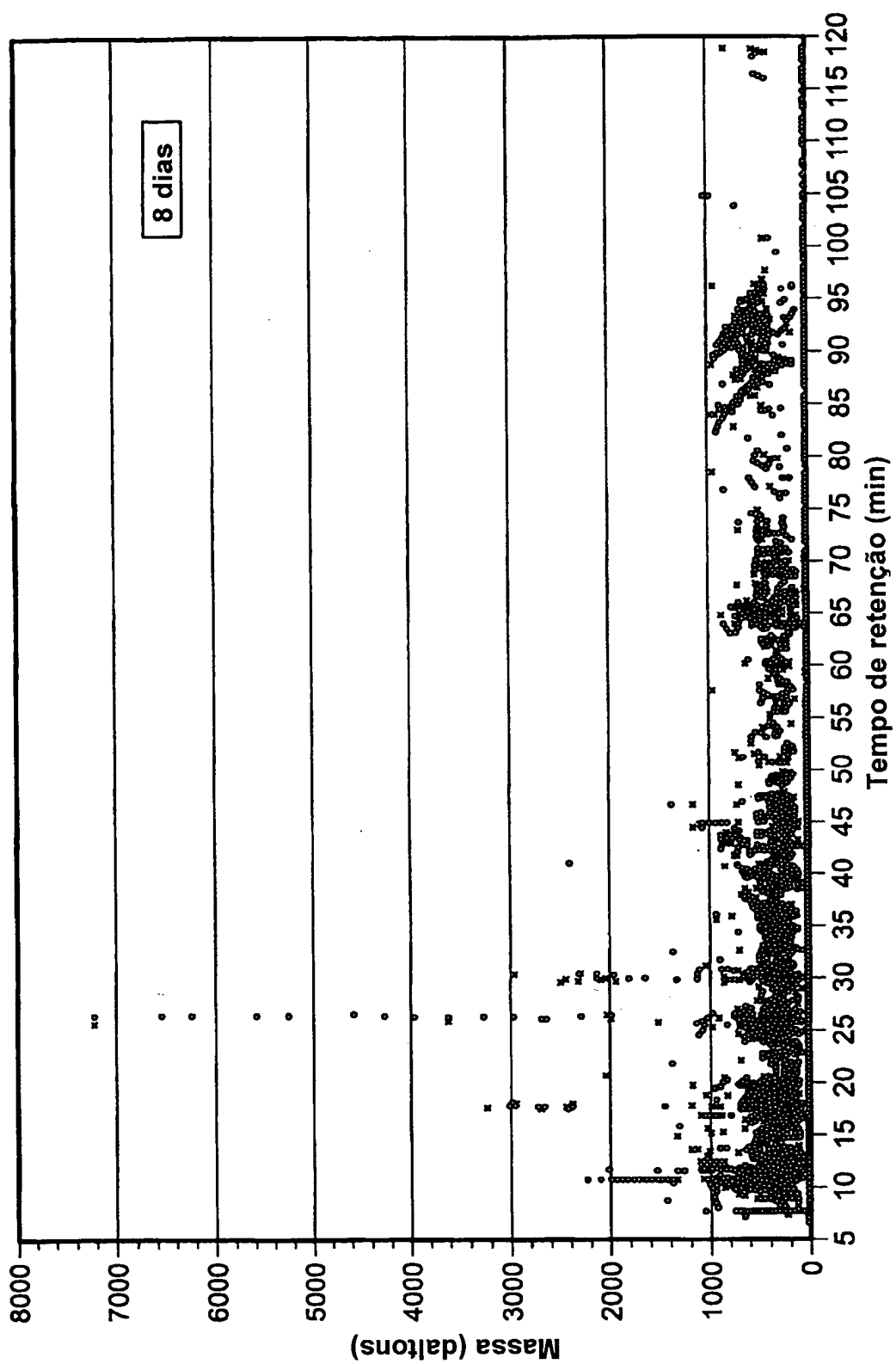


FIG. 2B



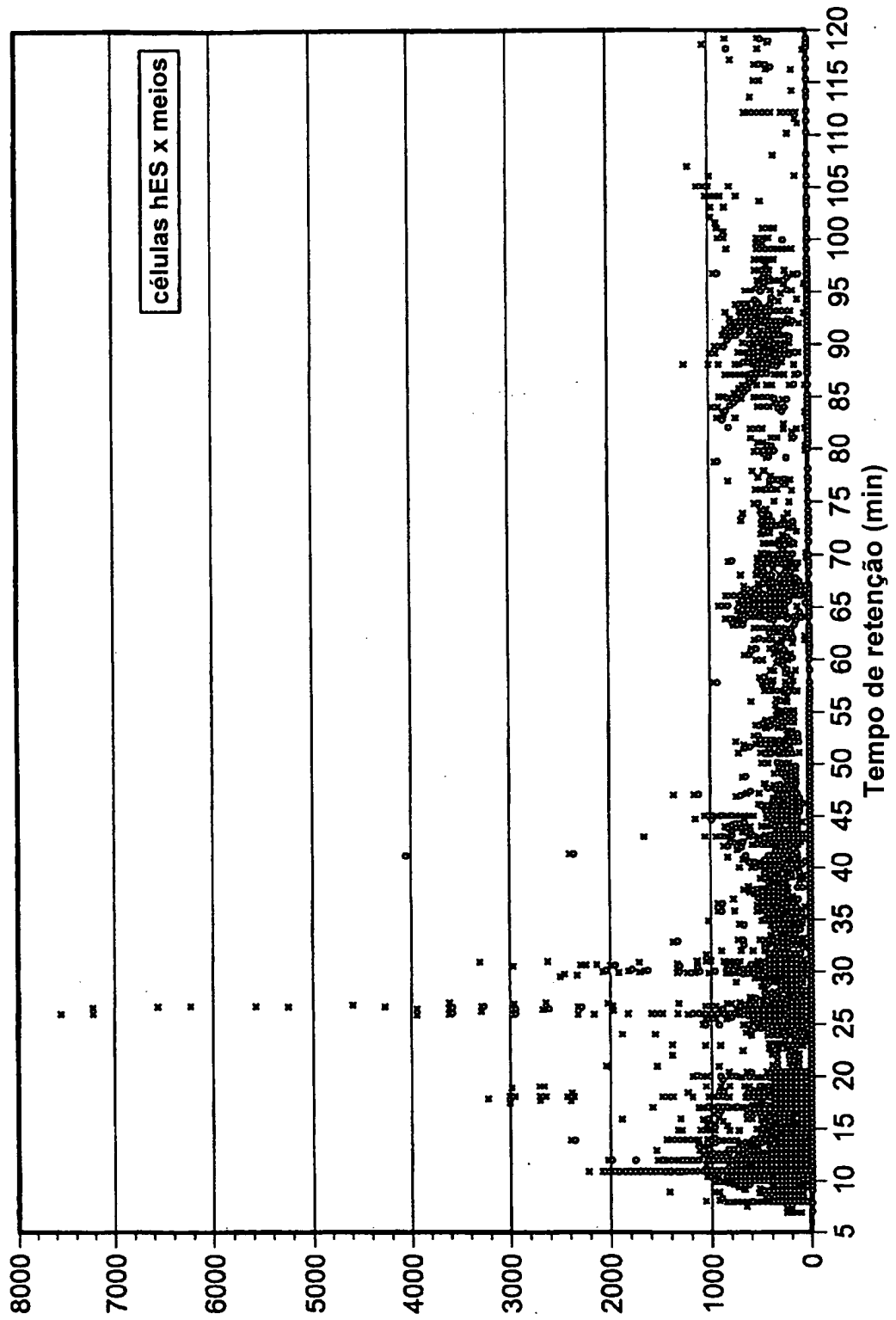


FIG. 2D

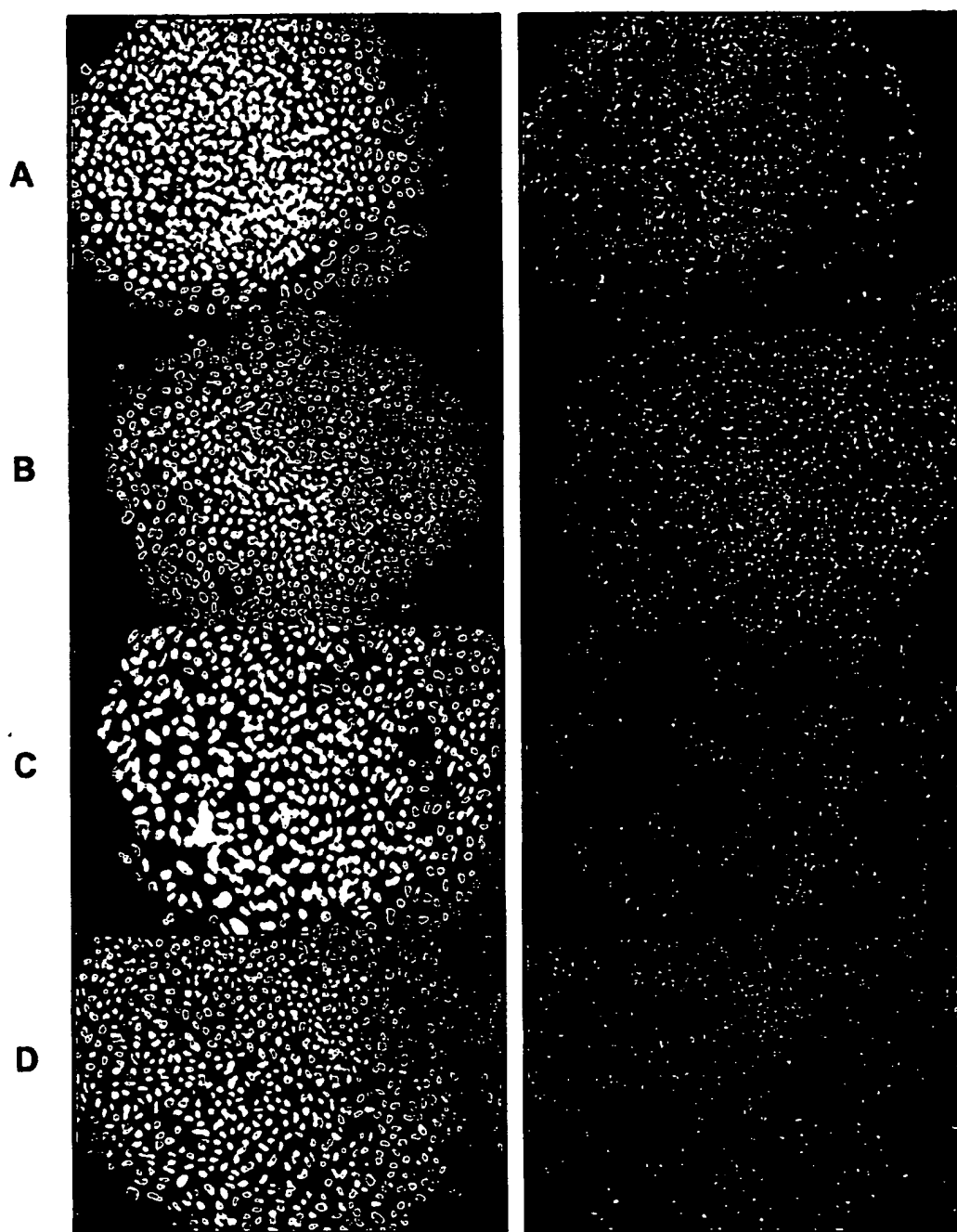


FIG. 3

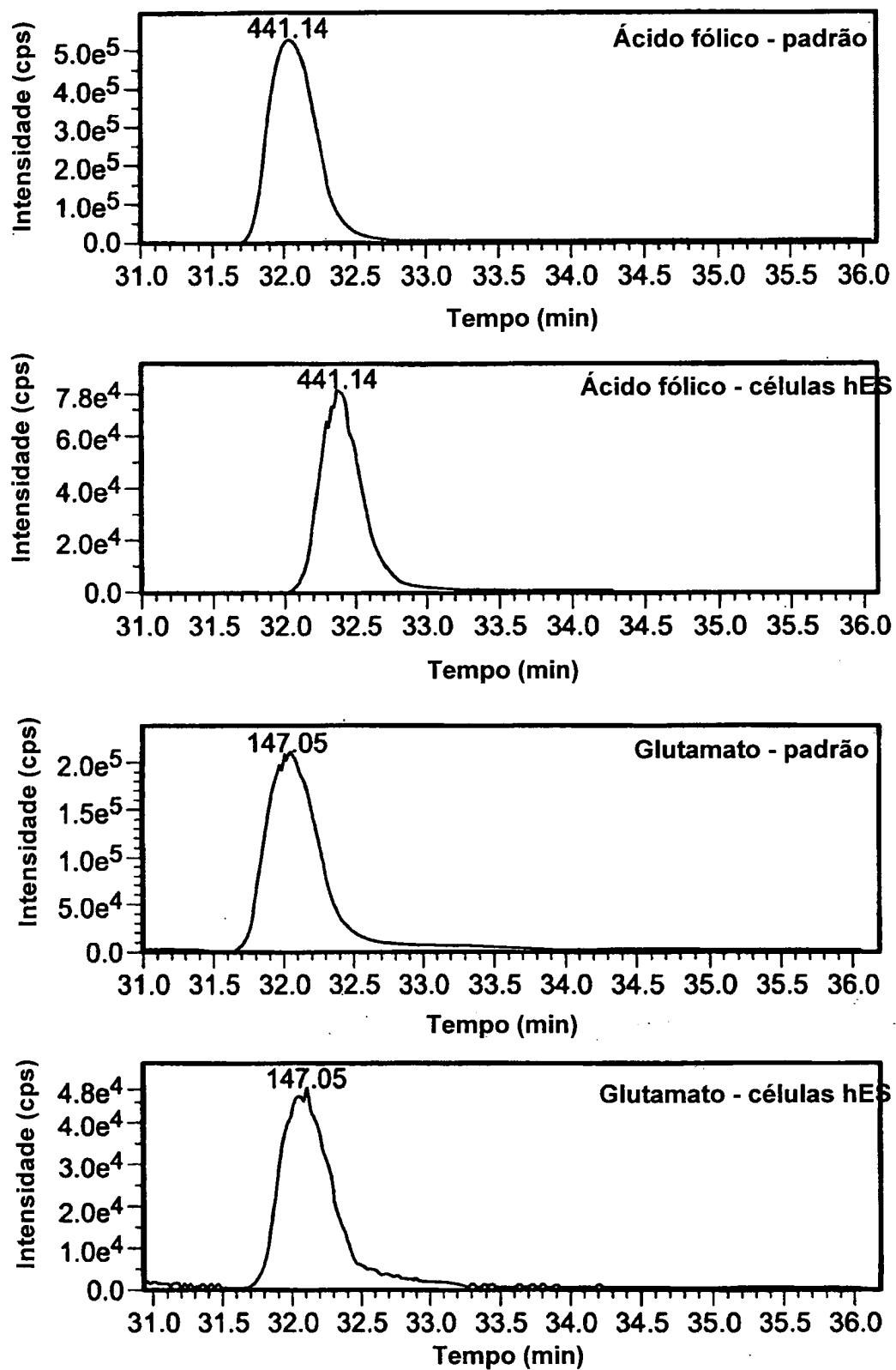


FIG. 4A

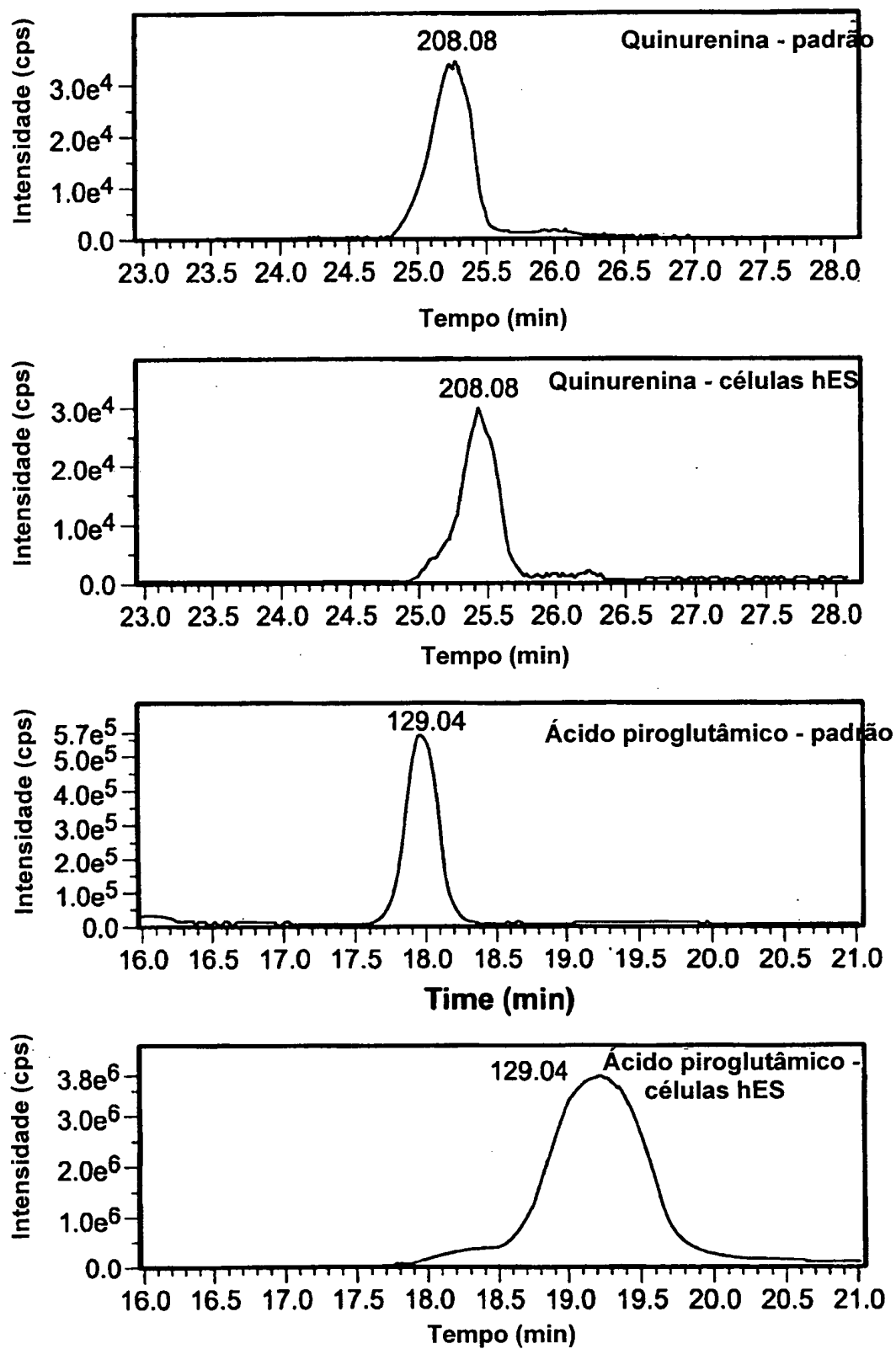


FIG. 4B

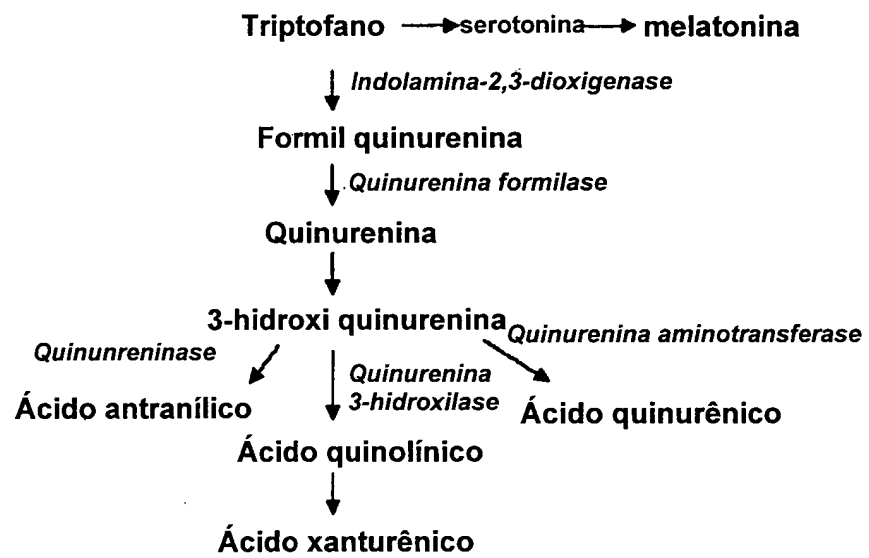


FIG. 5

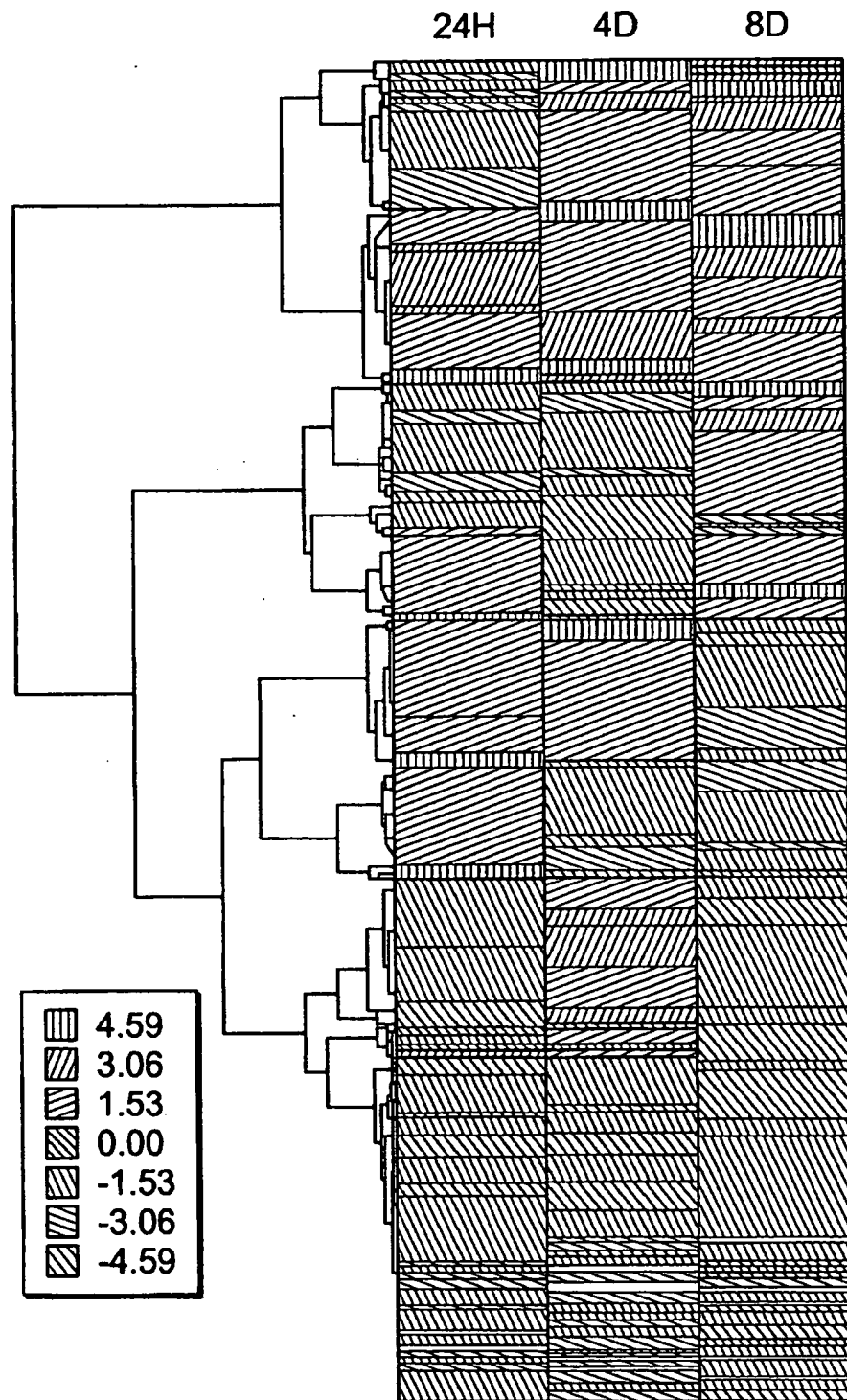


FIG. 6

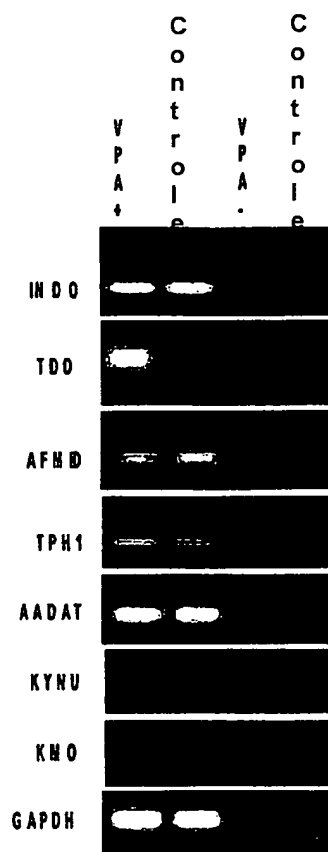


FIG. 7

RESUMO

PI 07-10054-0

5 “MÉTODOS PARA IDENTIFICAR UM OU UMA PLURALIDADE DE
METABÓLITOS CELULARES, PARA TRIAR UM COMPOSTO DE
TESTE E PARA TESTAR UM COMPOSTO DE TESTE, E, PERFIL DE
BIOMARCADOR PARA IDENTIFICAR UM COMPOSTO DE TESTE
COMO UM COMPOSTO TÓXICO”

10 A invenção provê perfis de biomarcador de metabólitos
celulares e métodos para triar compostos químicos incluindo agentes
farmacêuticos, compostos de fármacos de ponta e candidatos e outros
produtos químicos usando células-tronco embriônicas humanas (hESC) ou
células específicas de linhagem produzidas a partir das mesmas. Os métodos
da invenção são utilizáveis para testar a toxicidade, particularmente
toxicidade desenvolvimental, e detectar os efeitos teratogênicos destes
compostos químicos.