

THIAGO ANTONIO FEDELE

**Análise metabólica de animais portadores de melanoma murino
B16F10 por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)**

**Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências.**

Programa de Fisiopatologia Experimental

Orientador: Prof.Dr. Durvanei Augusto Maria

São Paulo

2012

THIAGO ANTONIO FEDELE

**Análise metabólica de animais portadores de melanoma murino
B16F10 por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)**

**Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências.**

Programa de Fisiopatologia Experimental

Orientador: Prof.Dr. Durvanei Augusto Maria

São Paulo

2012

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

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, Eliana R. Fedele, Ferdinando Fedele e Barbara A. Fedele, que sempre fizeram tudo por mim.

À minha esposa Andreia Regina S.M. Fedele e aos meus filhos, Dimitri M. Fedele e Nicolas M. Fedele, pelo apoio nesta luta travada diariamente.

Agradecimentos

À Deus sobre todas as coisas.

Aos meus pais e esposa que sempre me incentivaram e dividiram comigo todos os momentos desta caminhada.

Ao Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria pelos grandes ensinamentos, atenção, incentivo e carinho.

À minha irmã Barbara, sogra Regina e amiga Elisabete que sempre me apoiaram e cuidaram dos meus filhos na minha ausência.

Aos grandes amigos que ganhei durante esta caminhada Adilson Kleber, Alvaro e a toda a equipe do laboratório.

Ao Prof. Dr. Alvicler Magalhães e ao Prof. Dr. Luiz A. Colnago pelo exemplo de profissionalismo e por me ensinarem os princípios de uma das tecnologias mais complexas já desenvolvidas pela humanidade: a Ressonância Magnética Nuclear.

Ao amigo e Prof.Dr. Homero Farias pelos valiosos ensinamentos e pela avaliação estatística.

Um trabalho e uma carreira não se constroem sozinhos, são necessários muitos e muitos parceiros nesta longa caminhada; ganhei muito mais que parceiros, são verdadeiros amigos, entre professores, alunos e amigos, que estarão no meu coração para sempre. Seria impossível elencar todos aqui, então a todo meu muito obrigado!

À banca de qualificação pelas valiosas sugestões.

À Faculdade de Medicina da USP. Tenho muito orgulho de fazer parte da pós-graduação de uma das melhores instituições deste país.

À FAPESP pelo financiamento e concessão da bolsa MS processo número 08/5611-6.

“PRECE DE CARITAS

Deus, nosso Pai, que sois todo Poder e Bondade, dai a força àquele que passa pela provação, dai a luz àquele que procura a verdade; ponde no coração do homem a compaixão e a caridade!

Deus, Dai ao viajor a estrela guia, ao aflito a consolação, ao doente o repouso.

Pai, Dai ao culpado o arrependimento, ao espírito a verdade, à criança o guia, e ao órfão o pai!

Senhor, que a Vossa Bondade se estenda sobre tudo o que criastes. Piedade, Senhor, para aquele que vos não conhece, esperança para aquele que sofre. Que a Vossa Bondade permita aos espíritos consoladores derramarem por toda a parte, a paz, a esperança, a fé.

Deus! Um raio, uma faísca do Vosso Amor pode abrasar a Terra; deixai-nos beber nas fontes dessa bondade fecunda e infinita, e todas as lágrimas secarão, todas as dores se acalmarão.

E um só coração, um só pensamento subirá até Vós, como um grito de reconhecimento e de amor.

Como Moisés sobre a montanha, nós Vos esperamos com os braços abertos, oh Poder!, oh Bondade!, oh Beleza!, oh Perfeição!, e queremos de alguma sorte merecer a Vossa Divina Misericórdia.

Deus, dai-nos a força para ajudar o progresso, a fim de subirmos até Vós; dai-nos a caridade pura, dai-nos a fé e a razão; dai-nos a simplicidade que fará de nossas almas o espelho onde se refletirá a Vossa Divina e Santa Imagem.

Assim Seja.”

Mme. W. Krill.

Ditado pelo Espírito Cáritas.

25 de dezembro de 1873.

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Lista de Figuras	
Lista de Tabelas	
Lista de Abreviaturas	
Lista de Símbolos	
Lista de Siglas	
Resumo	
Summary	
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Melanoma	1
1.2 Metaboloma	3
1.3 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (ERMN)	5
2 JUSTIFICATIVA	27
3 OBJETIVO	28
4 MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1 Manutenção e cultivo das linhagens celulares de melanoma B16F10	29
4.2 Implantações das células tumorais	29
4.3 Necropsias dos animais	30
4.4 Análises das Fases do Ciclo Celular por Citometria de Fluxo	30
4.5 Potenciais de membrana mitocondrial por citometria de fluxo	31
4.6 Análise da expressão de marcadores das vias de morte celular e de checagem do ciclo celular por citometria de fluxo	31
4.7 Ensaios de proliferação celular	32
4.8 Análises histopatológicas e imunohistoquímicas	33
4.9 Padronizações de armazenamento e transporte das amostras	34
4.10 Congelamentos das células	34
4.11 Ensaios colorimétricos de redução do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) por desidrogenase mitocondriais ..	35
4.12 Aquisições de espectros por RMN de ^1H e ^{13}C , ^{31}P	35
5 RESULTADOS	40
5.1 Aspectos citológicos do crescimento da linhagem tumoral de melanoma B16F10	40
5.2 Análises das Fases do Ciclo Celular por Citometria de Fluxo	41
5.3 Análises dos parâmetros tumorais do crescimento dorsal dos camundongos portadores de Melanoma B16F10	42

5.4 Análises do índice proliferativo do crescimento dorsal dos camundongos portadores de Melanoma B16F10 por citometria de fluxo pelo método CSFE.	47
5.5 Análises histopatológicas e imunohistoquímica das biopsias obtidas dos tumores dorsais de melanoma B16F10 implantado em camundongos C57BL/6J após 5°, 15° e 25° dias de experimentação.....	50
5.6 Análises do potencial elétrico da membrana mitocondrial das células de melanoma B16F10, utilizando a sonda Rodamina - 123 por citometria de fluxo.....	53
5.7 Análises da expressão de marcadores das vias de morte celular a caspase-3 fosforilada e de checagem do ciclo celular ciclina D1.....	55
5.8 Análises da expressão dos receptores CD34 e VEGF-R1 por citometria de fluxo dos tumores dorsais de melanoma B16F10 implantado em camundongos C57BL/6J após 5°, 15° e 25° dias de experimentação.	57
5.9 Aquisições de espectros por RMN de ¹ H.....	58
5.10. Análise e identificação dos espectros de amostras de células e tecidos de tumores de melanoma murino B16F10 por RMN de ¹ H.....	61
5.11 Análise estatística do perfil diferencialmente expressos identificados nas amostras de tecidos de tumores de melanoma murino B16F10 por RMN 2D de ¹ H.....	80
6 DISCUSSÃO.....	86
7 CONCLUSÃO.....	113
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	115
9 ANEXOS.....	115

Lista de Figuras

- Figura 1 - Representação esquemática da amostra girando no ângulo mágico. 11
- Figura 2 - Representação de um rotor (porta amostra) utilizado nas medidas de RMN HR-MAS..... 12
- Figura 3 - Espectros de RMN de ^1H de uma amostra de células de melanoma B16F10 obtidos com e sem giro no ângulo mágico... 12
- Figura 4 - Espectros de prótons de ^1H (400 MHz) de uma cultura de células de melanoma B16F10..... 14
- Figura 5- Representação da sequência de pulsos zg (1D sequência de pulso básica). 16
- Figura 6 - Representação da sequência de pulsos zgpr (supressão de solventes)..... 16
- Figura 7 - Representação da sequência de pulsos zgf2pr (supressão dupla de solventes nas posições 4.7ppm e 2.6ppm) 17
- Figura 8 - Representação da sequência de pulsos CPMG (Filtro de T2)..... 18
- Figura 9 - Representação da relaxação transversal ocorrida durante a aplicação da sequência de pulsos CPMG..... 18
- Figura 10 - Comparação entre espectros de RMN de ^1H de amostras de cultura celular de melanoma B16F10 adquiridos com a sequência zgf2pr (Superior) e CPMG (Inferior)..... 19
- Figura 11 - Instrumentação em HRMAS-NMR, esquema de preparo da amostra e aquisição dos espectros..... 39
- Figura 12 - Fotomicroscopia obtida em microscópio invertido de culturas de melanoma murino B16F10 mostrando a progressão do crescimento celular nos períodos de 5°, 15° e 25° dias até atingirem a linha de confluência. Aumento de 20 e 40X. 40
- Figura 13 - Aspecto macroscópico de camundongos C57BL/6J do 5°, 15°, 25° e 30° períodos pós-implantação de células de melanoma murino B16F10. 43
- Figura 14 - Aspecto macroscópico das lesões internas observadas após a necropsia de camundongos C57BL/6J portadores de melanoma murino dorsal B16F10 entre os períodos de 25° e 30°. 44
- Figura 15 - Curva de crescimento do volume tumoral entre o 5° e 15° dia do implante tumoral 5×10^4 células de melanoma B16F10 em camundongos C57BL/6J..... 45
- Figura 16 - Gráfico de barra e histograma representativo do programa WIN-MDI da média e desvio padrão das populações celulares nas fases do ciclo celular dos tumores dorsais melanoma B16F10 após 5° dias. 46

Figura 17 - Curva de proliferação de linfócitos normais de camundongos C57BL/6J estimulados com fitohemaglutinina (controle positivo)	47
Figura 18 - Curva da distribuição do marcador CSFE em células do tumor dorsal melanoma B16F10 do histograma analisado pelo programa <i>Proliferation Wizard</i>	49
Figura 19 - Gráfico de barras representando a média e desvio padrão das diferentes índices proliferativos dos tumores dorsais após 5°, 15° e 25° dias de experimentação.....	50
Figura 20 - Fotomicrografias representativas dos cortes histológicos dos tumores dorsais de melanoma B16f10 após 5°, 15° e 25° dias de crescimento em camundongos C57BL/6J.....	52
Figura 21 - Histograma (A) e Gráfico de barra (B) representando a média e desvio padrão das populações celulares com baixo metabolismo (M1) e alto metabolismo (M2) do potencial elétrico mitocondrial adquirido por citometria de fluxo, nos diferentes períodos após a implantação das células tumorais 5°, 15° e 25° dias.	54
Figura 22 - Gráfico de barras representando a média e desvio padrão da expressão do marcador de checagem do ciclo celular, ciclina D-1 em células tumorais obtidas dos tumores dorsais após 5°, 15° e 25° dias da implantação dorsal em camundongos C57BL/6J....	55
Figura 23- Gráfico de barras representando a média e desvio padrão da expressão do marcador de morte celular programada, caspase-3 fosforilada efetora, em células tumorais obtidas dos tumores dorsais após 5°, 15° e 25° dias da implantação dorsal em camundongos C57BL/6J.....	56
Figura 24- Gráfico de barras representando as médias \pm dp da expressão dos marcadores da progressão do ciclo celular no melanoma B16F10 após 5°, 15° e 25° dias do crescimento dorsal.	57
Figura 25 - Espectro utilizado na sequência de pulso 1D ZGPR com excitação e supressão de água (região 4.7 ppm) de células de melanoma B16F10.....	59
Figura 26 - Espectro utilizado na sequência de pulso 1D ZGF2PR com excitação e supressão de água (4,7ppm) de células de melanoma B16F10 e supressão seletiva do crioprotetor DMSO (2,6ppm) ...	59
Figura 27 - Comparação entre espectros de RMN de ^1H de amostras de cultura celular de melanoma B16F10 adquiridos com a sequência ZGF2PR (Superior) e CPMG (Inferior).....	60
Figura 28 - Espectros 1D de ^1H por método de aquisição CPMG de amostras de células linhagem melanoma B16F10 em RMN-HRMAS-400Hz.	63

Figura 29 - Espectros 1D de ^1H por método de aquisição CPMG de amostras de biópsias de melanoma B16F10 em RMN-HRMAS-400Hz do 5° dia pós-implante.....	64
Figura 30 - Espectros 1D de ^1H por método de aquisição CPMG de amostras de biópsias do tecido colateral de animais portadores de melanoma B16F10 em RMN-HRMAS-400Hz do 5° dia pós-implante.	65
Figura 31 - Espectros 1D de ^1H por método de aquisição CPMG de amostras de biópsias de melanoma B16F10 em RMN-HRMAS-400Hz do 15° dia pós-implante.	66
Figura 32 - Espectros 1D de ^1H por método de aquisição CPMG de amostras de biópsias do tecido colateral de animais portadores de melanoma B16F10 em RMN-HRMAS-400Hz do 15° dia pós-implante.	67
Figura 33 - Espectros 1D de ^1H por método de aquisição CPMG de amostras de biópsias de melanoma B16F10 em RMN-HRMAS-400Hz do 25° pós-implante.....	68
Figura 34 - Análise espectral H 1D RMN demonstrando a carga lipídica (CH_2 e CH_3) em comparação com diferentes tempos da implantação tumoral 5° dia (verde), 15° dia (vermelho) e 25°- 30° dia (azul)....	69
Figura 35 - Análise espectral H 1D RMN demonstrando a presença dos metabólitos fosfolipídicos (Cho, PCho e GPCho) e o poliálcool cíclico Mio-Inositol em comparação com diferentes tempos da implantação tumoral 5° dia (verde), 15° dia (vermelho) e 25°- 30° dia (azul).....	70
Figura 36 - Análise espectral H 1D RMN demonstrando a carga do metabólito Mio-Inositol em comparação com diferentes tempos da implantação tumoral 5° dia (verde), 15° dia (vermelho) e 25°- 30° dia (azul).....	71
Figura 37- Análise espectral H 1D RMN demonstrando a carga lipídica (Glicerol) em comparação com diferentes tempos da implantação tumoral 5° dia (verde), 15° dia (vermelho) e 25°- 30° dia (azul)....	72
Figura 38- Análise espectral H 1D RMN demonstrando a carga do metabólito Lactato em comparação com diferentes tempos da implantação tumoral 5° dia (verde), 15° dia (vermelho) e 25°- 30° dia (azul).....	73
Figura 39 - Análise espectral H 2D RMN identificando os principais metabólitos presentes nas amostras de biópsia dos animais portadores de melanoma B16F10 A,B E C. (15° dia pós-implante).	76
Figura 40 - Distribuição porcentual da quantidade dos metabólitos obtidos nos diferentes períodos de crescimento do tumor dorsal	

	melanoma B16F10, obtido pela análise da derivação da integral do pico do perfil 2D do HRMAS RMN.	77
Figura 41	- Análise diferencial dos metabólitos totais produzidos pelo melanoma B16F10 nos diferentes períodos de crescimento tumoral.....	78
Figura 42	- Análise diferencial dos metabólitos diferencialmente produzidos pelo melanoma B16F10 nos diferentes períodos de crescimento tumoral, utilizando como valor de referência a fosfocreatina.	79
Figura 43	- Gráfico de barra dos valores das médias± dp das concentrações em ppm dos Lipídios Totais das amostras dos tumores de melanoma B16F10, nos períodos de 5 ^o , 15 ^o e 25 ^o dias.....	80
Figura 44	- Gráfico de barra dos valores das médias± dp das concentrações em ppm do metabólito Glicerol das amostras dos tumores de melanoma B16F10, nos períodos de 5 ^o , 15 ^o e 25 ^o dias.....	81
Figura 45	- Gráfico de barra dos valores das médias± dp das concentrações em ppm do metabólito Colina das amostras dos tumores de melanoma B16F10, nos períodos de 5 ^o , 15 ^o e 25 ^o dias.....	81
Figura 46	- Gráfico de barra dos valores das médias± dp das concentrações em ppm do metabólito Fosfocolina das amostras dos tumores de melanoma B16F10, nos períodos de 5 ^o , 15 ^o e 25 ^o dias.....	82
Figura 47	- Gráfico de barra dos valores das médias± dp das concentrações em ppm do metabólito Lactato das amostras dos tumores de melanoma B16F10, nos períodos de 5 ^o , 15 ^o e 25 ^o dias.....	82
Figura 48	- Gráfico de barra dos valores das médias± dp das concentrações em ppm do metabólito Aspartato das amostras dos tumores de melanoma B16F10, nos períodos de 5 ^o , 15 ^o e 25 ^o dias.....	83
Figura 49	- Gráfico de barra dos valores das médias± dp das concentrações em ppm do metabólito Alanina das amostras dos tumores de melanoma B16F10, nos períodos de 5 ^o , 15 ^o e 25 ^o dias.....	83
Figura 50	- Gráfico de barra dos valores das médias± dp das concentrações em ppm do metabólito Mioinositol das amostras dos tumores de melanoma B16F10, nos períodos de 5 ^o , 15 ^o e 25 ^o dias.....	84
Figura 51	- Gráfico de barra dos valores das médias± dp das concentrações em ppm do metabólito Acetato das amostras dos tumores de melanoma B16F10, nos períodos de 5 ^o , 15 ^o e 25 ^o dias.....	84
Figura 52	- Gráfico de barra dos valores das médias± dp das concentrações em ppm do metabólito Taurina das amostras dos tumores de melanoma B16F10, nos períodos de 5 ^o , 15 ^o e 25 ^o dias.....	85
Figura 53	- Gráfico de barra dos valores das médias± dp das concentrações em ppm do metabólito Creatina das amostras dos tumores de melanoma B16F10, nos períodos de 5 ^o , 15 ^o e 25 ^o dias.....	85

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Parâmetros de aquisição de uma sequência 1D ZGF2PR (dupla supressão de sinal) para obtenção de espectros de H de amostras de células de melanoma B16F10.....	36
Tabela 2 - Parâmetros de aquisição de uma sequência 1D CPMG (t2*) para obtenção de espectros de H de amostras de células de melanoma B16F10.	37
Tabela 3 - Fases do ciclo celular das células de melanoma murino B16F10 obtidas por citometria de fluxo. Expresso em média \pm desvio padrão n=05 animal/grupo.	41
Tabela 4 - Porcentagem de expressão dos marcadores CD34 e VEGF-R, expresso em média \pm dp em células obtidas do tumor dorsal de melanoma B16F10 implantado em camundongos C57BL/6J após 5 ^o , 15 ^o e 25 ^o dias de experimentação	58

Lista de Abreviaturas

col.	colaborador(es)
ed.	edição
eq.	equação
et al.	e outros
prof.	professor
Dr.	doutor

Lista de Símbolos

γ	momento magnético nuclear
δ	delta
λ	lambda
μ	micro
μmol	micromolar
Rho	rodamina
CdK	quinase(s) dependente(s) de ciclinas
1D	unidimensional
2D	bidimensional
B_0	campo magnético principal ou estático
B_1	campo oscilatório de radiofrequência
C	Celsius
cm	centímetro(s)
D	acoplamento dipolar
g	grama
h(s)	hora(s)
Hz	Hertz
k	Kelsey
L	litro
M	mega
mM	milimolar
mm	milímetro
PCr	fosfocreatina
pH	potencial hidrogeniônico
Pi	fosfato
ppm	partes por milhão
rf	radiofrequência
rpm	rotações por minuto
T1	tempos de relaxação spin-rede
T2	tempos de relaxação spin-spin
TF	transformada de Fourier

Lista de Siglas

ATCC	<i>American Type Culture Colletion</i>
ATP	Adenosina trifosfato
ADP	Adenosina difosfato
CENU	cloroetil nitrosourea
CFSE	Carboxy-fluorescein diacetate succinimidyl ester
CPMG	Carr, Purcell, Meiboom and Gill
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
ERMN	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FGF ₂	fator de crescimento de fibroblastos
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HR-MAS	<i>Higth Resolution Magic Angle Sppining</i>
IR	Inversão Recuperação
LND	Ionidamine
MAS	alta resolução com rotação segundo ao ângulo mágico
MRI	Ressonância Magnética por Imagem
NAD	nicotinamida-adenina dinucleotídeo
NCI	<i>National Cancer Institute</i>
PDE	fosfodiéster
PME	fosfomonoéster
PVC	porcentagem da viabilidade celular
RF	radiofrequência(s)
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SFB	soro fetal bovino
VEGFR	receptores do tipo tirosina-quinase

Resumo

Fedele TA. *Análise metabolômica de animais portadores de melanoma murino B16F10 por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012, 126 p.

O metaboloma é definido como a coleção qualitativa e quantitativa de todos os metabólitos de baixa massa molecular presentes nas células, os quais participam de reações bioquímicas necessárias para a manutenção, crescimento e fisiologia celular. A avaliação metabolômica permite o delineamento do processo bioquímico de sistemas a fim de ampliar o entendimento de como as patologias se manifestam. A Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é usada para investigar uma variedade de processos biológicos em diversos sistemas. A magnética aplicada a células e biópsias de tecido intacto de melanoma murino B16F10 contribuiu para a caracterização bioquímica de biomarcadores das diferentes fases de progressão tumoral do melanoma murino B16F10. Os resultados obtidos neste estudo permitiram a identificação de 33 metabólitos possíveis, envolvidos na carga lipídica e no metabolismo secundário da via glicolítica, que favorecem o crescimento e a progressão tumoral. A presença da taurina, prolina, serina, fenilalanina, que aumentaram quantitativamente, são possíveis marcadores da invasão, progressão e metastatização. A análise quantitativa desses metabólitos mostrou diferença significativa em 11 compostos, dos quais 9 estão diretamente envolvidos na expressão das respostas proliferativas, de morte celular e angiogênese, nos diferentes períodos de crescimento do melanoma B16F10, avaliados neste estudo. Desta forma, os achados obtidos neste estudo, quando associados no futuro a outros fatores, poderão ser úteis no diagnóstico e auxiliar na escolha terapêutica alvo com maior especificidade e menores efeitos colaterais. RMN pode ter um importante impacto na monitorização de metabólitos em células e tecidos tumorais, possibilitando a detecção mais precoce de tumores malignos, em suma, através da combinação de métodos de ressonância magnética.

Descritores: Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN); Metabolômica; Proliferação de Células; Apoptose; Melanoma; Murinos

Summary

Fedele TA. *Metabolomic analyzes of animals with murine melanoma B16F10 spectroscopy Nuclear Magnetic Resonance (NMR)* [dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2012, p126.

The metabolome is defined as the qualitative and quantitative collection of all low weight molecular metabolites in cells that participate in biochemical reactions necessary for the maintenance, growth and physiology of cell. The metabolomic evaluation allows the design of systems of biochemical process in order to broaden the understanding of how diseases manifest. The Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR) is used for investigating a variety of biological processes in several systems. The magnetics applied to cell and tissue biopsies intact murine melanoma B16F10 contributed to the biochemical characterization of biomarkers of different stages of tumor progression of murine melanoma B16F10. The results obtained in this study allowed the identification of 33 potential metabolites involved in lipid content in the secondary metabolism of the glycolytic pathway, which promote growth and tumor progression. The presence of taurine, proline, serine, phenylalanine, which quantitatively increased, is possibly markers of invasion and metastasis progression. Quantitative analysis of these metabolites showed a significant difference in 11 compounds, of which 9 are directly involved in the expression of proliferative responses, cell death and angiogenesis in different periods of growth of B16F10 melanoma, evaluated in this study. Thus, the findings from this study, when associated in the future with other factors, may be useful in the diagnosis and may assist in choosing therapeutic target with greater specificity and fewer side effects. NMR may have a significant impact on monitoring metabolites in tumor cells and tissues, allowing for earlier detection of malignant tumors; in short, by combining MRI methods.

Descriptors: Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR)
Metabolomics; Cell Proliferation, Apoptosis; Melanoma; Murine

1 INTRODUÇÃO

1.1 Melanoma

A homeostase da pele é mantida pelas interações dinâmicas entre os diversos tipos celulares: melanócitos, queratinócitos, fibroblastos, endoteliais, células apresentadoras de linfócitos, imunocompetentes e os elementos proteicos e glicoproteicos da matriz extracelular. Entre estes, os melanócitos são as células pigmentares de origem neuroectodérmica, contêm melanina e se localizam nas camadas basais e espinhosas mais profundas da epiderme.¹

O melanócito é uma célula dendrítica, que surge a partir da crista neural no período embrionário. É encontrado na pele (camada basal da epiderme), no olho (epitélio pigmentar da retina, trato uveal), nos pelos das orelhas (estria vascular), nas mucosas e no sistema nervoso central (meninges)². Na pele, os melanócitos estão ocasionalmente presentes na derme, além de na camada basal da epiderme. Na epiderme dos vertebrados, os melanócitos estão em estreito contato com os queratinócitos circundantes através dos seus processos dendríticos. Essa estreita associação permite que os melanócitos realizem sua função primária de produzir e distribuir a melanina para os queratinócitos, proporcionando assim a pigmentação da pele, do cabelo e dos pelos. A síntese de melanina ocorre dentro de organelas intracelulares de melanócitos denominadas de melanossomas. Esta síntese resulta na geração de peróxido de hidrogênio e quinonas intermediárias.^{2,3}

A densidade de melanócitos varia de acordo com os diferentes locais do corpo. Há mais de dois mil melanócitos epidérmicos por milímetro quadrado de pele da cabeça e antebraço e cerca de mil, no restante do corpo, em todas as raças. A regulação exata do número de melanócitos na epiderme parece ser mediada pelos queratinócitos e por mediadores

específicos como o fator de crescimento de fibroblastos (FGF2)⁴. O número de melanócitos diminui com a idade, em áreas não expostas, na proporção de 6 a 8% por década. As diferenças raciais na pigmentação não se devem a uma marcante variação no número de melanócitos, mas, sim, no seu grau de atividade, na proporção dos subtipos de melanina feomelanina e eumelanina, nas suas distribuições e no envolvimento de fatores ambientais como a exposição solar, já que estimulam diretamente a síntese de melanina.⁴⁻⁸

A melanina é um biopolímero heterogêneo de estrutura complexa¹², composta por muitos tipos diferentes de monômeros conectados através de fortes ligações carbono-carbono. Isto torna a caracterização sistemática das melaninas muito difícil.¹³⁻¹⁵ A melanina é um cromóforo extremamente denso e insolúvel de alto peso molecular, sintetizada a partir da tirosina, apresentando-se como a eumelanina e a feomelanina.¹⁶ Eumelanina é um pigmento nitrogenado insolúvel altamente reticulado, variando do castanho-escuro ao preto. Este pigmento é predominantemente responsável pela pigmentação da pele, mas também pode ser encontrado em grandes quantidades no cabelo. A feomelanina é um cromóforo de coloração amarelo-avermelhado, alcalino-solúvel derivado da tirosina, que pode ser combinada com dopaquinona-glutationa ou cisteína para formar a cisteinil-dopa. Os níveis intracelulares de cisteína desempenham um papel na estimulação da eumelanogênese e feomelanogênese.¹⁷ A feomelanina é responsável pela cor dos pelos e de alguns tons de cabelos, particularmente os tons castanho-avermelhado ou vermelho. Uma vez produzida a melanina, os melanossomas são transferidos para os queratinócitos vizinhos. Após a transferência do pigmento, os melanossomas são degradados e descartados no estrato córneo. Em humanos, a pigmentação da pele e do cabelo depende do tamanho, número e distribuição dos melanossomas, bem como da natureza química da melanina.¹⁸⁻²⁰

O conceito de marcadores moleculares do melanoma está relacionado a fatores e/ou substâncias que podem identificar a presença ou a predisposição a esse câncer. Esses marcadores podem estar associados

a alterações em determinadas regiões genômicas, como mutações em genes de predisposição, e também podem estar relacionados à expressão de alguns antígenos tumorais.^{21,22} A cirurgia continua a ser o principal tratamento, mas as técnicas de diagnóstico por imagem desempenham um papel importante no acompanhamento da patologia e na avaliação do estadiamento e da resposta terapêutica.^{23,24}

1.2 Metaboloma

Um dos desafios da biologia de sistemas é a integração das técnicas de análise (proteoma, transcriptoma e metaboloma) na busca por informações mais completas dos organismos vivos e seus sistemas. O estudo de metaboloma está relacionado a:

Avaliação Toxicológica: perfis metabólicos provenientes de amostras de urina, sangue e plasma podem ser usados para detectar as alterações fisiológicas causadas por uma substância química. Em muitos casos, as alterações observadas podem estar relacionadas com síndromes específicas, por exemplo, uma lesão específica no fígado ou nos rins;²⁵

Genômica funcional: a metabolômica possui uma perspectiva de prever a função de genes desconhecidos em comparação com as perturbações causadas pela eliminação metabólica / inserção de genes conhecidos;^{26,27}

Nutrigenômica: é um termo geral que liga a genômica, o transcriptoma, a proteômica e a metabolômica, relacionando-as à alimentação humana. Em geral, o metaboloma, em um determinado fluido corporal, é influenciado por fatores como a dieta, as drogas, a idade, o sexo, a composição corporal e a genética, bem como por patologias subjacentes, representando um método de determinação do equilíbrio destes fatores no metabolismo;²⁸⁻³⁰

Metaboloma tumoral: o termo descreve as características dos metabólitos das células tumorais. A comparação das características metabólicas de

diferentes linhagens celulares tumorais e tumores revelam que, durante a tumorigênese, as mesmas alterações sempre ocorrem em diferentes parâmetros metabólicos de base, independentemente tanto do metabolismo dos tecidos a partir do quais os tumores são desenvolvidos quanto do mecanismo molecular pelo qual a tumorigênese foi induzida.³⁰⁻³³

O metaboloma, principal método de estudo neste projeto, é definido como a coleção qualitativa e quantitativa de todos os metabólitos de baixa massa molecular presentes nas células, os quais participam de reações metabólicas necessárias para a manutenção, crescimento e fisiologia celular.²⁵ A metabolômica trata-se do delineamento do processo bioquímico de sistemas a fim de ampliar o entendimento de como as doenças se manifestam.²⁵ Esta abordagem teve origem no *Imperial College*, em Londres, e têm sido utilizados em toxicologia, diagnósticos e uma série de outros campos.²⁶ A metabolômica fornecem ferramentas originais para aprimorar as informações biológicas relacionadas ao metaboloma e, mais usualmente, à genômica funcional.²⁷ O metaboloma inclui análises de aminoácidos, ácidos graxos, carboidratos, vitaminas e lipídios. O tamanho do metaboloma varia de acordo com o organismo estudado, o *Saccharomyces cerevisiae*, por exemplo, contém aproximadamente 600 metabólitos²⁸, as plantas têm, numa estimativa, 200 mil metabólitos primários e secundários²⁹; dessa forma, o metaboloma humano deve ser ainda maior.

O futuro da metabolômica é a capacidade de monitorar mudanças sutis no metaboloma que ocorrem antes da detecção de uma mudança fenotípica refletida da doença. A análise integrada da metabolômica e outras «ômicas» podem prever formas mais sensíveis para detecção de alterações relacionadas com a doença, assim como pode descobrir novos biomarcadores. O conhecimento sobre estas características metabolômicas é fundamental para o estabelecimento e validação de modelos preditivos para a prevenção do câncer. Compreender o metaboloma irá ajudar na identificação de novos biomarcadores para câncer e no estabelecimento da prevenção e terapêutica da doença.³⁴

Este novo estudo difere dos estudos clássicos de metabólitos por sua maior amplitude, profundidade e velocidade adquiridas pelos enormes avanços na instrumentação analítica, em especial, a ressonância magnética nuclear e a espectrometria de massa, ao longo das duas últimas décadas. Várias vias metabólicas podem agora ser rastreadas pelo fluxo de átomos através dos metabólitos. Neste momento, existem poucos estudos relacionando o metaboloma com o câncer, apesar de possuir grande potencial.³⁵⁻⁴²

1.3 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (ERMN)

Uma das técnicas empregadas em estudos do metaboloma é a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (ERMN). A ERMN é utilizada na detecção de metabólitos primários e secundários, sem a destruição da mostra. Todos os tipos de moléculas e metabólitos podem ser medidos simultaneamente. Dessa forma, a ERMN possui uma potencial função como detector universal.

A ERMN tem sido utilizada como método rápido e não destrutivo para análise de amostras *in natura*, sendo, atualmente, uma importante ferramenta para a elucidação de estruturas a nível atômico, além de propiciar estudos sobre a dinâmica dos mecanismos químicos e bioquímicos. Avanços tecnológicos têm mostrado que, cada vez mais, esta técnica torna-se indispensável nos estudos envolvendo o metaboloma. Desde os primeiros experimentos nos anos 40 até os dias de hoje, a RMN tem mostrado uma enorme variabilidade de aplicações e possui, sem dúvida, um lugar na ciência moderna.⁴²⁻⁴⁷

Em 1924, após a constatação da existência do momento magnético do elétron, o spin do elétron, por Stern e Gerlach, vários grupos de pesquisa procuravam verificar se esta propriedade estendia-se para os prótons nucleares. Finalmente, em 1938, Rabi⁴⁸ e colaboradores, em duas breves comunicações ao editor do jornal *Physical Reviews*, diziam ter desenvolvido um novo método para a determinação mais precisa do momento magnético nuclear (γ) de várias espécies. Em 1939, estes mesmos autores publicaram

uma descrição mais detalhada desta metodologia, que consistia em medir a uma frequência (ν) proveniente de uma amostra acondicionada em um campo magnético conhecido (B_0). Neste momento, nascia a definição da equação fundamental da RMN:

$$\nu = \gamma B_0 / 2\pi \quad (1).$$

Após estes experimentos, concluiu-se que um feixe de átomos contendo núcleos magnéticos, quando submetido a um campo magnético externo aplicado em uma dada direção (z), mostra uma absorção de energia, com frequências dentro do espectro de radiofrequências (RF). Posteriormente, deu-se início a uma série de pesquisas relacionadas à RMN, nas quais o feixe de átomos foi substituído por amostras macroscópicas, tais como as que usamos atualmente.⁴⁹

Em 1945, Purcell, Pond e Torrey⁵⁰, estudando a parafina sólida, descreveram uma relação entre as populações dos dois estados energéticos relacionados $h\nu/kT$, sendo h a constante de Planck, k a constante de Boltzmann e T a temperatura. Notou também que, após um determinado tempo sob a ação da radiofrequência satisfazendo a equação (1), a amostra atingia o equilíbrio entre os estados populacionais, estado conhecido como saturação; neste ponto o sinal não era mais notado e a saturação poderia permanecer por muitas horas até que o sistema relaxasse, voltando ao estado inicial.⁴⁸

Em 1946, Bloch, Hansey e Packard⁴⁹⁻⁵¹ utilizaram RF para medir o momento magnético de uma amostra de água e, além disso, adicionaram compostos paramagnéticos a esta amostra, o que diminuía o tempo para o retorno da amostra ao equilíbrio térmico. Em 1947 Bloomberg, Pound e Purcell⁵² mostraram que, em um campo magnético estático sob a ação da RF obedecendo a eq. (1), as transições de um dado núcleo obedecem a uma regra de transição:

$$\Delta m_i = \pm 1 \text{ para } -I \leq m_i \leq +I \quad (2);$$

sendo I o número quântico de spin nuclear. Também estabeleceram que no equilíbrio térmico existem $2I+1$ níveis de energia e que a distribuição

populacional deste seria governada pela distribuição de Boltzmann, conforme:

$$E_i = \exp(\gamma B_{\text{omi}} / kT) \quad (3).$$

Este efeito de desdobramento energético dos núcleos em $2I+1$ estados, quando submetidos a um campo magnético estático em uma dada direção, ficaria mais tarde conhecido como efeito Zeeman. A ordem de magnitude dos tempos de relaxação medidos até aquele momento era entre 10² e 10⁴ segundos. Os autores desconfiavam que tempos tão grandes não pudessem ser associados a processos atômicos, tornando-se óbvio que um modelo onde os spins não interagem entre si não poderia ser correto, o que mais tarde – e pela primeira vez – leva à introdução do conceito de campo local (**B local**), fato que agrega mais um termo à equação (1), transformando-a na equação (4), agora levando-se em conta as interações dos spins nucleares:

$$\nu = \gamma(\mathbf{B}_0 + \mathbf{B}_{\text{local}}) / 2\pi \quad (4).$$

Uma vez agregado ao modelo experimental a existência de interações do tipo Spin-Spin e Spin-Rede os autores iniciavam estudos de tempos de relaxação spin-rede (T₁). Também começava nesta época a descrição mais formal da energia envolvida nestes processos, através de Hamiltoneanos. A equação (5) mostra o Hamiltoneano relativo ao momento magnético nuclear de um dado conjunto de núcleos (i) quando submetidos a um campo magnético, levando-se em conta a energia relativa ao efeito Zeeman (1^o termo) e a relativa às interações do tipo dipolo-dipolo (2^o termo também conhecido como B local).

$$H_{\text{tot}} = \sum_i \gamma_i \hbar I_i B_0 + \sum_i \gamma_i \hbar I_i \cdot \sum_j \{ (\gamma_j \hbar I_j / r_{ij}^3) - (3\gamma_j \hbar r_{ij} I_j / r_{ij}^5) \} \quad (5).$$

A energia do tipo Zeeman (1^o termo) é da ordem de dezenas a centenas de megaHertz (MHz) para campos entre unidades a dezenas de Teslas; a das interações dipolo-dipolo (2^o termo), da ordem de centenas a dezenas de kiloHertz (KHz). Com o auxílio da mecânica quântica, Bloch e colaboradores reescrevem o 2^o termo da equação (5), dependendo explicitamente do fator C ($3\cos 2\theta - 1$), sendo (θ) correspondente ao ângulo entre o vetor distância que liga dois pares de núcleos e o campo magnético

e C uma constante que depende dos fatores giromagnéticos dos spins que estão interagindo e da distância entre eles. Ainda neste mesmo estudo, os autores estabeleceram uma relação entre o tempo de relaxação da mistura água-glicerina e do álcool etílico com a viscosidade, na qual notam que o aumento da viscosidade aumentava a taxa em que o sistema retornava ao estado inicial. Os autores obtiveram relações entre os tempos de relaxamento T1 e T2 em função do tempo de correlação (τ_c), mostrando ainda neste trabalho um cálculo sobre as populações para os níveis energéticos $+m$ e $-m$ para um núcleo de **spin (I) = 1/2**.

Novos conceitos em RMN foram continuamente descobertos e acompanhados pelo avanço tecnológico dos espectrômetros, por exemplo, o desenvolvimento de magnetos supercondutores e a aplicação da transformada de Fourier (TF). Esses avanços propiciaram, a partir dos anos 60, os estudos de RMN multinuclear, com particular ênfase na RMN de ^{13}C , estudos de estruturas de proteínas e outras moléculas biológicas. Nos anos 70 e 80, as técnicas bidimensionais, inicialmente propostas por Jeener e Ernst^{100, 101}, possibilitaram análises estruturais mais apuradas e estudos detalhados da dinâmica molecular. Em 70, foram realizadas as primeiras aplicações de RMN para o estudo do metabolismo em sistemas biológicos.⁷⁵⁻⁵⁴ Na mesma época, foi demonstrado que o gradiente e o campo magnético poderiam ser utilizados para RMN codificar sinais espacialmente.⁵⁵ A partir desse conceito nasceu a Ressonância Magnética por Imagem (MRI). Pouco tempo depois, foram obtidas as primeiras imagens do corpo humano.^{56,57} Em 1980, as imagens de RMI tornaram-se clinicamente úteis. Atualmente, o avanço tecnológico de campos magnéticos e gradientes potencializou as técnicas em RMN. A espectroscopia e as imagens podem ser usadas para investigar uma ampla variedade de processos biológicos em sistemas tão diversos como células, órgãos e tecidos.

A informação espectral de amostras sólidas e/ou semissólidas obtida através de sondas convencionais é severamente limitada, devido ao grande alargamento dos sinais. Esse alargamento deve-se ao movimento molecular restrito de tais amostras, o qual é ocasionado principalmente por três fatores:

acoplamentos dipolares, deslocamentos químicos anisotrópicos e diferenças na susceptibilidade magnética da amostra.

O acoplamento dipolar consiste na interação magnética dos spins nucleares através do espaço sem o intermédio de átomos ou elétrons. O efeito do acoplamento dipolar depende da posição relativa entre dois núcleos e, portanto, é bastante pronunciado em amostras sólidas, em que, devido ao movimento lento das moléculas, há tempo suficiente para que ocorra. Assim, o campo magnético gerado por um dado nuclídeo pode influenciar aumentando ou diminuindo o campo magnético sentido por uma nuclídeo vizinho, fazendo com que este apresente uma extensa banda de frequências. Em amostras tais como soluções não viscosas, o rápido movimento molecular diminui a interação espacial entre os spins e, conseqüentemente, a influência do acoplamento dipolar.⁵⁸

O deslocamento químico anisotrópico consiste em diferentes deslocamentos químicos dos núcleos produzidos pelas diversas orientações das moléculas em relação ao campo magnético principal (B_0), gerado pelo equipamento. Como a distribuição eletrônica nas moléculas não é esférica, o campo magnético sentido por um núcleo e, portanto, o deslocamento químico dependem das orientações das ligações em relação a B_0 .⁸¹ Em moléculas como o benzeno, por exemplo, o deslocamento químico de ^{13}C pode variar de duas a três centenas de ppm, conforme a molécula se posicione em relação a B_0 .⁵⁹ Em amostras em soluções não viscosas, contendo moléculas de massa molecular média e baixa, devido à rápida reorientação molecular, observa-se uma única frequência de ressonância para cada nuclídeo distinto quimicamente, referido como deslocamento químico isotrópico, correspondente à média dos deslocamentos químicos referentes a todas as orientações que a molécula pode assumir.⁵⁸

As diferenças na susceptibilidade magnética devem-se à falta de homogeneidade física nas amostras sólidas; conseqüentemente, nuclídeos quimicamente idênticos podem apresentar várias frequências de ressonância dependendo da posição em que este se encontra na amostra,

gerando novamente deslocamentos químicos anisotrópicos, o que ocasiona alargamento dos sinais.

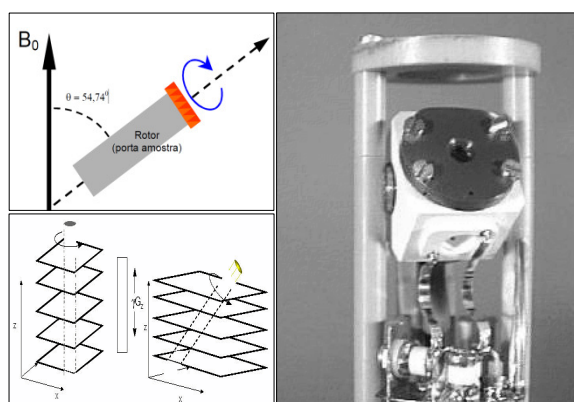
Existe ainda outra diferença significativa entre a RMN para amostras em solução e as sólidas, com relação aos tempos de relaxação spin-rede (T1) e spin-spin (T2). Novamente, o movimento molecular restrito faz com que, em amostras sólidas, o tempo de relaxação spin-rede seja longo, necessitando de longa espera entre os acúmulos, ao passo que o spin-spin seja curto, ocasionando o alargamento dos sinais.⁵⁸ Estes fenômenos são observados devido à velocidade de relaxação spin-rede estar relacionada com a transferência de energia para moléculas próximas espacialmente. Desta forma, restringindo-se ao movimento molecular, a constante de velocidade diminui ocasionando um aumento no tempo de relaxação spin-rede. Por outro lado, a relaxação spin-spin ocorre pela transferência de energia para núcleos vizinhos, ou seja, a interação entre os spins é mais eficiente quando o movimento molecular é restrito, resultando na diminuição do tempo de relaxação spin-spin. Os efeitos que provocam o alargamento dos sinais, com exceção dos fenômenos de relaxação, são quase que totalmente eliminados, se não bastante minimizados, quando os espectros de amostras sólidas ou semissólidas são obtidos girando-as a altas velocidades no ângulo mágico. O efeito de alargamento das linhas de ressonância causado pelo acoplamento dipolar (D) é significativamente reduzido, inclinando-se a amostra a exatamente $54,74^{\circ}$ em relação ao campo magnético principal (B_0) (Figura 1) uma vez que este possuiu uma dependência angular segundo a equação:

$$D \text{ proporcional a } \pm\mu_B r_{AB}^{-3} (3\cos 2\theta - 1) \quad (6)$$

em que: μ_B é o momento magnético do nuclídeo B; r_{AB} é a distância internuclear entre os nuclídeos A e B; θ é o ângulo entre o vetor internuclear e o campo magnético aplicado (B_0). O sinal \pm significa que os spins podem estar orientados a favor ou contra o campo aplicado. Desta forma, quando a amostra é inclinada a exatamente $54,74^{\circ}$ em relação a B_0 , o termo $3\cos 2\theta - 1$ da equação torna-se zero, anulando o acoplamento dipolar e é, por este motivo, chamado de “ângulo mágico”.⁵⁸⁻⁶⁰ O efeito de alargamento dos

sinais causado por deslocamentos químicos anisotrópicos é resolvido girando-se a amostra a altas velocidades (Figura 1). A alta rotação supera os efeitos dos deslocamentos químicos anisotrópicos, desde que a frequência de rotação seja ao menos equiparável ao deslocamento por anisotropia. Assim, da mesma forma que nas amostras em solução, observa-se um único sinal, que é a média de todos os deslocamentos químicos referentes a todas as possíveis orientações em relação a B_0 . A velocidade de rotação mínima necessária varia de acordo com o campo magnético aplicado: quanto maior o campo maior será a velocidade de giro necessária para tornar os deslocamentos químicos isotrópicos. Por exemplo, em um equipamento de 9,4 Teslas (400 MHz), uma velocidade de giro superior a 5000 Hz é suficiente.^{61, 62}

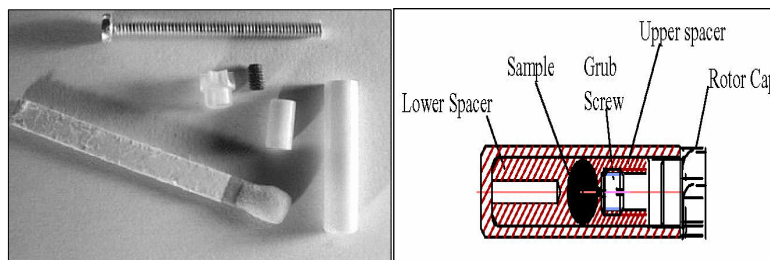
Nos experimentos com giro no ângulo mágico, a amostra é contida num rotor de cerâmica, o qual é posicionado exatamente no ângulo mágico e girado ao redor do próprio eixo com auxílio de ar comprimido ou N_2 gasoso (Figura 1).



Fonte: <http://www.bruker-nmr.de/guide/>

Figura 1 - Representação esquemática da amostra girando no ângulo mágico.

O efeito de alargamento dos sinais causado pelas diferenças na susceptibilidade magnética das amostras pode ser minimizado através da fina moagem das amostras e pela disposição esférica que estas ocupam dentro do rotor (porta amostra da sonda de HR-MAS) conforme mostra a Figura 2.



FONTE: <http://www.bruker-nmr.de/guide/>

Figura 2 – Representação de um rotor (porta amostra) utilizado nas medidas de RMN HR-MAS. Rotor de zircônio com Kel F-tampão, espaçador superior, parafuso com cabeça do cilindro e parafuso sem cabeça de vedação para fornecer um volume de amostra esférica.

Entretanto, os resultados somente são alcançados quando todas as condições são empregadas em conjunto. A simples inclinação da amostra no ângulo mágico, mas sem girar a amostra a altas velocidades, não traduz nenhum efeito sobre a redução do alargamento das linhas de ressonância, como pode ser observado na Figura 3. Porém, quando esta é submetida também ao giro, o ganho na resolução dos espectros é considerável (Figura 3 e 4)⁵⁸, assemelhando-se muito aos de amostras em solução (Figura 3 e 4)⁶⁰⁻⁶³. Por este motivo, a técnica é conhecida como HR-MAS (*High Resolution – Magic Angle Spinning*).

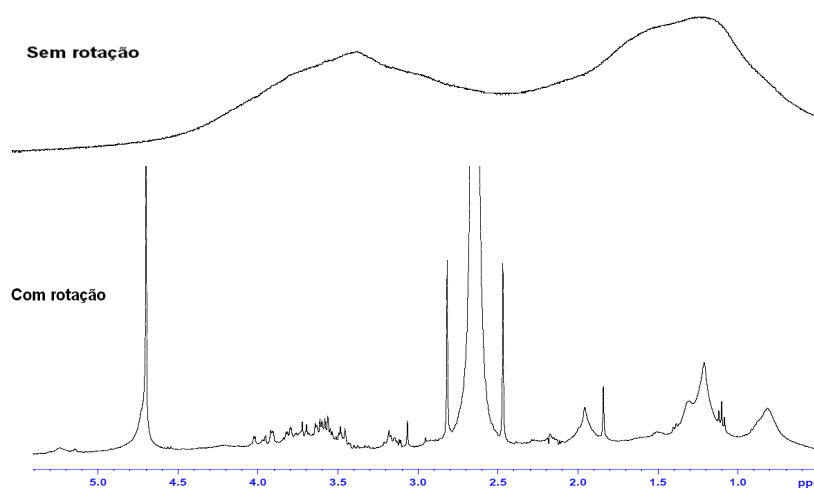


Figura 3 - Espectros de RMN de ^1H de uma amostra de células de melanoma B16F10 obtidos com e sem giro no ângulo mágico

A grande vantagem da técnica de RMN HR-MAS é a possibilidade da análise direta de materiais intactos sem necessidade de nenhuma etapa de pré-tratamento de amostra, as quais consomem tempo e reagentes, além de poderem provocar alterações na composição química das amostras, por exemplo, em processos de extração. O principal requisito para que uma amostra seja analisada por esta técnica é que as moléculas apresentem algum grau de mobilidade, ou seja, que não se apresentem em forma cristalina, consideradas como semissólidas, condição já satisfeita nas amostras de tecidos animais e vegetais⁶⁰. A técnica também é muito sensível, pois requer somente alguns miligramas de amostra e alguns minutos para se adquirir um espectro de RMN de ^1H ^{63, 64}, possibilitando assim detectar componentes em concentrações inferiores a um micromolar em uma mistura.⁶⁰⁻⁶³ Além disso, as sondas de HR-MAS permitem o ajuste da homogeneidade do campo magnético (*shimming*), resultando em ganhos na resolução dos espectros obtidos.⁶³ As sequências de pulsos empregadas são as mesmas utilizadas na RMN de amostras em solução e não requerem alta potência de desacoplamento ou técnicas especiais, comumente empregadas para sólidos verdadeiros.⁶⁴ Estas sondas também possibilitam realizar experimentos bidimensionais, tais como COSY, HSQC e HMBC, extremamente úteis na identificação de compostos orgânicos, como tem sido demonstrado por Broberg e colaboradores¹⁰² e Gil e col.⁴⁹, o que possibilitou a identificação de uma grande quantidade de compostos em diferentes materiais *in natura* sem quaisquer processos de extração e/ou purificação. Métodos de análise direta que dispensam a necessidade de isolamento dos componentes são muito desejáveis e, por esta razão, o interesse da aplicação técnica de RMN HR-MAS é crescente.⁶⁵⁻⁶⁸

Por outro lado, tem sido extensivamente utilizada na análise de tecidos animais, principalmente na identificação de tumores malignos.^{69,70} Por exemplo, as classificações de lipossarcoma humano e lipoma (tecidos tumorais malignos) tornaram-se possíveis através de diferenças espectrais observadas nos espectros de RMN HR-MAS de ^1H obtidos de tecidos *ex*

vivo, demonstrando que a técnica pode ser utilizada no prognóstico de doenças.^{71,72}

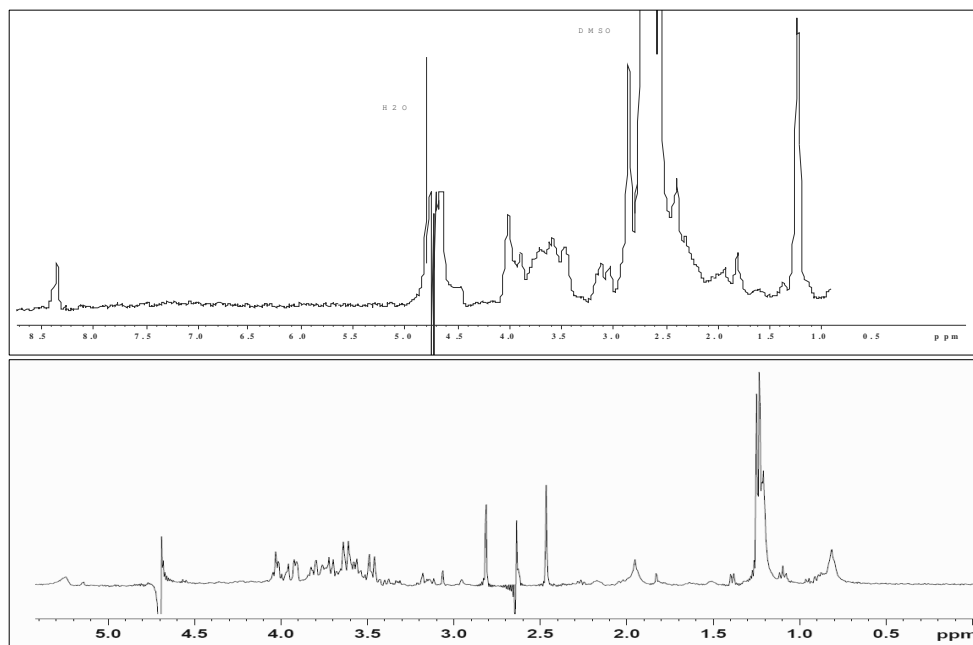
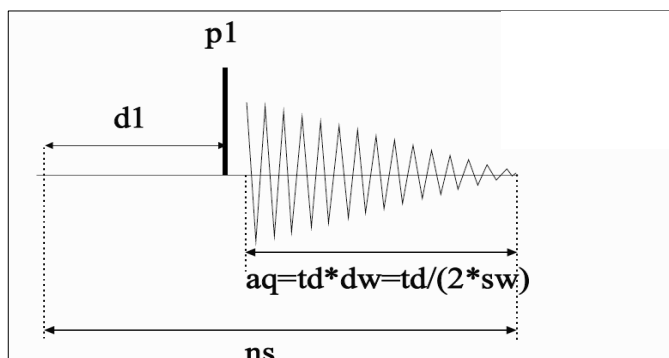


Figura 4- Espectros de prótons de ^1H (400 MHz) de uma cultura de células de melanoma B16F10. O espectro do topo é adquirido em uma sonda de alta resolução convencional para análise de líquidos (girando a 20 Hz / B_0), enquanto a parte inferior do espectro é adquirida em uma sonda HR-MAS (girando em 4 kHz).

A supressão do sinal do solvente é necessária quando se utilizam soluções aquosas ou quando possui uma alta concentração de H_2O , como as amostras de cultura celular, nas quais a quantidade de água é muito superior à das outras substâncias presentes. Na supressão do sinal do solvente, geralmente não é possível manipular esse sinal independentemente dos demais sinais. Por exemplo, a observação de um sinal que se apresenta próximo ou sob o da água, ou de um núcleo que troca quimicamente com a água, pode ser afetada pela supressão. Além disso, a falta de homogeneidade do campo magnético estático (B_0), do campo oscilatório de radiofrequência (B_1) e as imperfeições no pulso podem diminuir a seletividade e o grau de supressão de uma dada sequência.⁷³ Para a supressão do sinal do solvente aplica-se uma irradiação de radiofrequência (rf) fraca e contínua na frequência do solvente, antes da excitação dos spins

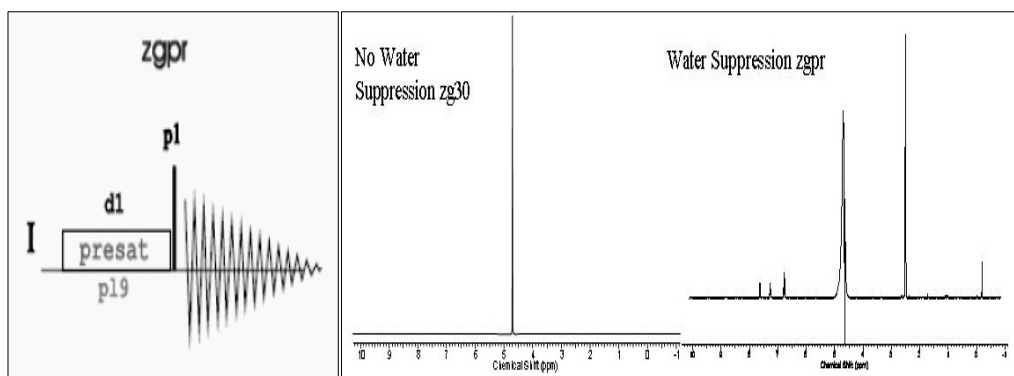
de todos os núcleos e aquisição dos dados, tornando os spins do solvente saturados⁷⁴ e, portanto, não observáveis. Invariavelmente, os sinais próximos à frequência do solvente também experimentam alguma perda na intensidade, pois também são afetados pela irradiação contínua. Um desempenho satisfatório na supressão requer uma alta homogeneidade tanto do campo magnético estático (B_0) como da frequência de B_1 . Uma homogeneidade adequada do campo B_0 (*shimming*) assegura que todos os núcleos do solvente ressoarão dentro de uma faixa de frequência pequena, pois a largura de linha do sinal medida em sua base é pequena. Uma homogeneidade satisfatória de B_1 significa que os núcleos do solvente em todas as regiões da amostra experimentarão uma potência de rf semelhante e, então, serão suprimidos igualmente.⁷⁵ Para a realização da supressão do sinal dos hidrogênios da água nas amostras de células e biópsias de tecido testaram-se duas sequências de pulsos, que estão descritas a seguir:

Sequência de pulsos ZGPR: é a mais simples e mais usada na supressão do sinal do solvente. A pré-saturação é efetuada irradiando-se o sinal a ser suprimido com uma potência de rf fraca e contínua (*Continuous Wave – CW*)⁷⁶⁻⁷⁷, durante um tempo longo o suficiente para eliminar as diferenças de populações entre os estados de spins α e β dos hidrogênios do solvente⁷⁷, fazendo com que haja a saturação desses estados de spins. A irradiação é desligada imediatamente antes da aplicação do pulso de 90° , que é utilizado para transferir as magnetizações não saturadas para o plano x-y. A aquisição do espectro é feita após um intervalo de tempo pequeno, necessário para evitar que o sinal apresente ruídos que são oriundos do pulso de 90° (Figura 5 e 6).



Fonte: <http://www.bruker-nmr.de/guide/>

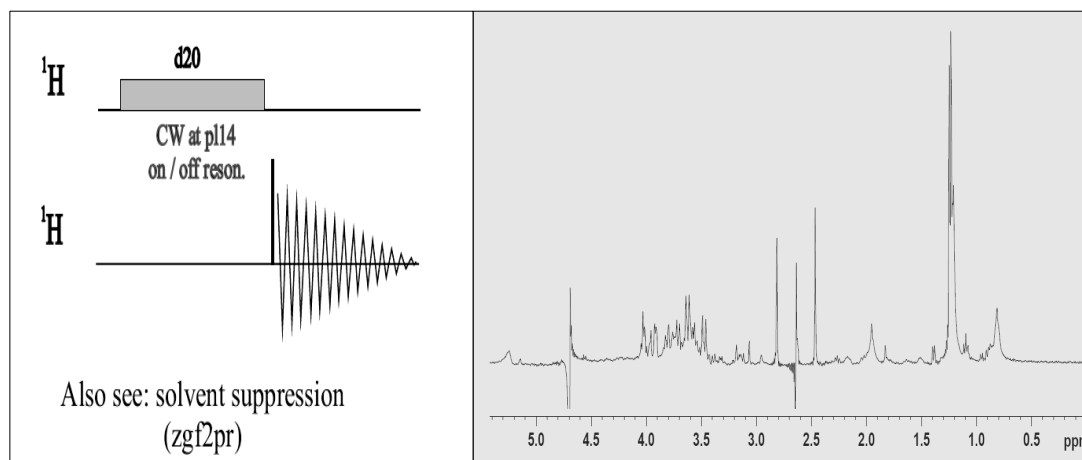
Figura 5– Representação da sequência de pulsos zg (1D sequência de pulso básica).



Fonte: <http://www.bruker-nmr.de/guide/>

Figura 6 - Representação da sequência de pulsos zgpr (supressão de solventes).

Sequências de pulso ZGF2PR: 1D-sequência, com pré-saturação em F2. A pré-saturação dos diferentes sinais e posterior construção das diferenças (subtração de espectros: um com pré-saturação fora e outra com pré-saturação de um sinal de interesse) dá informações sobre o NOE. A sequência utiliza dois canais F1 (^1H) e F2 (^1H) determinando dois pontos de aplicação da irradiação, uma coerente não específica e outra coerente específica. O1: saturação $\text{H}_2\text{O} + \text{D}_2\text{O}$ / O2: saturação DMSO (Figura 7).

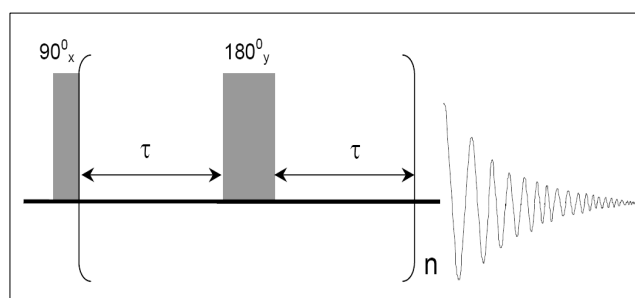


Fonte: <http://www.bruker-nmr.de/guide/>

Figura 7– Representação da sequência de pulsos zgfg2pr (supressão dupla de solventes nas posições 4.7ppm e 2.6ppm)

No ângulo mágico, os espectros de RMN de ^1H de amostras de tecidos vegetais ou animais apresentam frequentemente sinais alargados. Estes sinais são provenientes de moléculas de alta massa molecular, tais como os componentes das membranas da parede celular. Devido ao fato destes componentes serem rígidos, ou seja, apresentarem baixa mobilidade molecular, também possuem T2 curtos, ocasionando o alargamento dos seus sinais, que por sua vez causam a sobreposição de outros sinais, como o das moléculas de baixa massa molecular, dificultando a interpretação dos dados. Além disso, contribuem para diminuir a quantidade de informações contidas nos espectros, prejudicando assim as análises quimiométricas.⁷⁸ Por outro lado, Carr, Purcell, Meiboom e Gill⁵⁰ desenvolveram uma sequência de pulsos que se aproveita do T2 curto de moléculas de alta massa molecular em relação às de baixa massa molecular, para eliminar os sinais alargados destas moléculas dos espectros.⁵⁸⁻⁶³ Esta sequência, conhecida como CPMG ou filtro de T2, faz com que, após a transferência da magnetização para o plano xy, pela aplicação inicial de um pulso de 90° na direção x, esta seja mantida neste plano através da aplicação de sucessivos pulsos de 180° na direção y. Nesta etapa, um curto período de tempo (τ) é permitido entre os pulsos de 180° , o qual é ajustado para permitir que ocorra

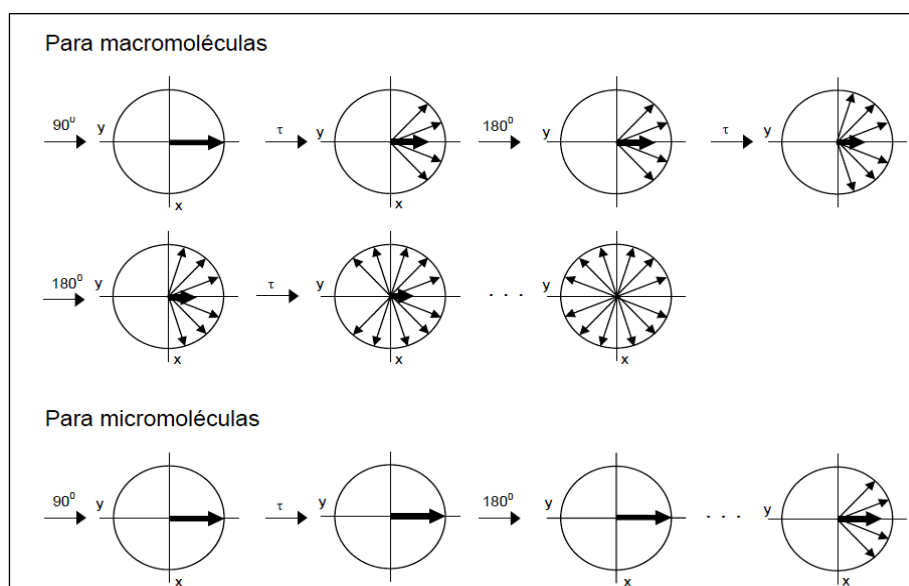
a relaxação transversal principalmente de moléculas com T2 curto (Figura 8). Desta forma, os sinais referentes às macromoléculas não são observados devido à perda de coerência dos vetores magnetização destas no plano xy (Figura 9). O mesmo ocorre com o vetor magnetização das moléculas de baixa massa molecular (com T2 longo), porém, em uma proporção muito menor⁵⁸⁻⁶⁶ (Figura 9).



Fonte: <http://www.bruker-nmr.de/guide/>

Figura 8– Representação da sequência de pulsos CPMG (Filtro de T2)

Em que n significa o número de repetições e τ o tempo de espera entre os pulsos de 180°. A Figura 10 mostra um exemplo prático do emprego da sequência de pulsos CPMG, em uma amostra de cultura de células de melanoma B16F10, demonstrando a utilidade desta sequência nos estudos de amostras intactas como sementes e tecidos vegetais.



Fonte: <http://www.bruker-nmr.de/guide/>

Figura 9– Representação da relaxação transversal ocorrida durante a aplicação da sequência de pulsos CPMG.

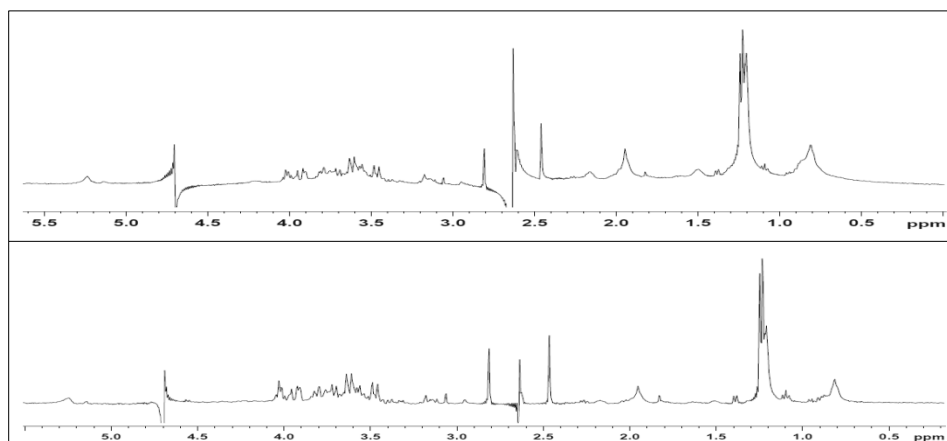


Figura 10– Comparação entre espectros de RMN de ^1H de amostras de cultura celular de melanoma B16F10 adquiridos com a sequência zgpg30 (Superior) e CPMG (Inferior).

Baseada na identificação de alterações específicas de tumores, as principais limitações para esta abordagem geralmente resultaram da dificuldade de transferência de resultados obtidos de experiências com células em condições heterogêneas de oxigenação, nutrientes, exposição de hormônios e fatores imunológicos sobre os bem definidos modelos *in vitro* e *in vivo* de tumores. Apesar destas limitações, algumas alterações bioquímicas foram identificadas em tumores, especialmente utilizando modelos adequados de carcinogênese e/ou de diferentes taxas de crescimento e níveis de diferenciação de linhas celulares.⁷⁷⁻⁷⁹ Como descrito originalmente por Warburg⁶¹, os fenômenos das células tumorais como a mudança da via glicolítica, glicólise aeróbia em glicólise anaeróbia, reforçada Pasteur pelo efeito inverso, representam alterações bioenergéticas pelas quais as células cancerígenas podem compensar por deficiências nas mitocôndrias, nas cadeias de transportes e de defeitos na capacidade respiratória.⁸⁰ Outra classe de alterações bioquímicas, principalmente identificadas no crescimento rápido de hepatocarcinomas, são as alterações na composição lipídica (por exemplo, diminuição de ácidos graxos poli-insaturados e/ou aumento do colesterol) cujas consequências estão relacionadas com as alterações da fluidez da membrana e da atividade enzimática, especialmente a nível mitocondrial e das membranas microssomais⁸¹⁻⁹¹. Pouco se sabe sobre as alterações específicas nos

tumores em nível dos mecanismos bioquímicos e dos mecanismos de compartimentalização intracelular responsável pela biossíntese.⁸¹

A ERMN e a ERMI permitem detectar e quantificar *in vitro* e *in vivo*, respectivamente, em condições controladas (temperatura e microambiente), por exemplo, nos estudos *in vitro*, alguns dos metabólitos endógenos circulantes e infinitos componentes celulares. Os estudos metabólicos por RMN não só caracterizam o estado do tecido a partir de certas características do espectro, como também podem analisar a cinética das enzimas que catalisam as diversas vias metabólicas. Constitui-se um método não invasivo (estudos *in vivo* utilizando a RMI) e não destrutivo (estudos *in vitro* e *in vivo*) de investigar o metabolismo em células, tecidos e órgãos isolados. A recente aplicação da ERMN em amostras biológicas demonstrou aplicabilidade como método diagnóstico clínico.⁸⁵ Nas investigações dos metabólicos utilizando a ERMN foram observados diversos núcleos como ^{31}P , ^{13}C , ^1H e menos frequentemente o ^{19}F , ^{23}Na , ^{15}N , entre outros.

Na ERMN em sistemas biológicos, a posição de cada pico ao longo da linha central horizontal, também chamada de linha química do deslocamento ou linha central da frequência, é governada pelo campo magnético principal. Assim, os ^1H , ^{13}C e ^{31}P entre outros núcleos, em grupos moleculares diferentes de moléculas distintas, fazem com que seus picos correspondentes apareçam em posições diferentes na linha central da frequência, ou seja, cada metabólito ressona em uma frequência diferente, de acordo com o campo magnético gerado pelos agrupamentos moleculares de seus prótons.

A amplitude do pico determina a quantidade de metabólito. A concentração de um determinado metabólito é calculada através da área do pico. A área do pico é usada por não ser tão influenciado por alguns fatores físicos como a homogeneidade do campo magnético, nível de ruído e o tempo de relaxação.⁷⁹ A quantificação absoluta do espectro, isto é, a interpretação das áreas dos picos, comporta certo grau de dificuldade. A simples calibração das áreas dos picos usando soluções padrão de

concentrações conhecidas é especialmente difícil pelo fato de a sensibilidade das bobinas mudarem com a carga. Além disso, a dependência do efeito T2 nos sinais dos metabólitos influencia a quantificação metabólica absoluta.⁷⁹

Na medicina, a ERMI é uma técnica não invasiva e livre de riscos potenciais com a qual podem monitorar os estágios, agudo ou crônico, de uma doença. O desenvolvimento de métodos de localização espacial de amostras, com níveis relativos de metabólitos móveis em um volume definido a partir de imagens por RM, é a base para a integração das informações obtidas por esta técnica. A associação das informações anatômicas e patológicas obtidas, com as imagens por RM, proporciona uma nova forma de se entender as origens e a evolução das patologias.⁸⁶

Em muitas doenças, as alterações metabólicas podem preceder as alterações anatômicas. A espectroscopia se apresenta, pois, como um método de detecção precoce destas alterações, por ser potencialmente sensível a estas mudanças. No entanto, a ERMI é uma forma de espectroscopia inerentemente fraca. Requer que as substâncias químicas ou metabólitos estejam presentes em concentrações maiores que 1mM e, portanto, a detecção de concentrações menores é possível somente em circunstâncias especiais, o que prejudica a sua aplicação sistemática. Outro, a sensibilidade de detecção está diretamente relacionada com o valor do campo magnético e o valor dos magnetos utilizados em medicina não ultrapassa 3 Tesla. Assim, ainda que a ERMI seja um poderoso recurso na obtenção não invasiva de informações bioquímicas *in vivo*, existe uma limitação em termos dos metabólitos que se podem monitorar.

A ERMN utiliza campos magnéticos superiores a 10 Teslas e técnicas espectroscópicas mais complexas, mas, nos últimos anos, o desenvolvimento de uma técnica chamada de alta resolução com rotação segundo ao ângulo mágico (MAS) tornou possível a aquisição em alta resolução de dados sobre as biópsias de tecidos intactos sem qualquer tratamento prévio.⁹⁷ A rápida rotação da amostra (normalmente em 5,0 kHz) em um ângulo de 54,7° em relação ao campo magnético aplicado, serve

para reduzir a perda de informações causadas pelos efeitos de largura de linha ampliados e acoplamentos indesejados observados em amostras não líquidas, por exemplo: os tecidos. Estes efeitos são comumente causados por alargamentos de base e heterogeneidade residual anisotrópica da amostra. Na MAS-ERMN podem ser utilizadas as diversas técnicas aplicadas em ERMN, como pulsos comuns ou mais complexos, para o estudo metabólico elucidar as mudanças da dinâmica e estrutura molecular.

O estudo de processos metabólicos em sistemas biológicos, baseado na utilização de, MAS ^1H -ERMN e estatísticas multivariadas para geração e interpretação de dados bioquímicos, foram utilizadas para diferenciar plasmas sanguíneos de mulheres portadoras de câncer de ovário epitelial (COE) de mulheres saudáveis. A análise ^1H -ERMN foi realizada no plasma sanguíneo de 38 pacientes portadores de COC, 12 pacientes com cistos ovarianos benignos e 53 mulheres saudáveis. Análises multivariadas permitiram identificar alterações de 37 dos 38 pacientes portadores de COE (97,4%). As alterações dos plasmas sanguíneos de portadores de COE foi identificada com 100% de sensibilidade e especificidade na MAS-RMN pelas regiões dos espectros de ^1H , 2,77 partes por milhão (ppm) e 2,04 ppm a partir da origem. Estes achados indicam que a abordagem ^1H -ERMN no metaboloma merece uma avaliação mais aprofundada como nova estratégia para a detecção precoce da COE.

Uma combinação de métodos espectroscópicos (RMN e HPLC) foi utilizada para analisar urina de humanos e ratos tratados com a droga ifosfamida ⁷³. No estudo foi possível detectar uma gama de metabólitos endógenos anormais na urina de seres humanos, submetidos à terapia, após a administração de ifosfamida, e relacionar as perturbações metabólicas com os efeitos nefrotóxicos da droga. As mudanças observadas por ^1H -RMN incluíram aumentos nos níveis de glicose na urina, glicina, alanina, histidina, lactato, acetato, succinato e trimetilamina-N-óxido, além de diminuições dos níveis de hipurato e citrato. Estudo utilizando ^{31}P -RMN identificou mudanças em linhagens celulares resistente a múltiplos fármacos (MDR) utilizados na terapêutica do câncer. ¹³⁰ As células resistentes

incluídas foram transfectadas com o gene humano de multirresistência (MDRI gene), que codifica P-glicoproteína. Na maioria dos casos, os espectros de ^{31}P -RMN foram significativamente diferentes das linhagens drogas-sensíveis. Os espectros das células resistentes indicaram aumento dos níveis de ATP e fosfocreatina em seu citoplasma. Estas alterações são compatíveis com o aumento da taxa de glicose de utilização celular. Grandes alterações também foram observadas nos níveis de glicerofosocolina e glicerofosfoetanolamina. A direção dessas mudanças não era compatível para todas as linhagens celulares estudadas e não poderia ser atribuída diretamente à expressão da P-glicoproteína, sugerindo que as mudanças podem estar relacionadas às alterações no metabolismo, na membrana e na função associada a outros mecanismos de MDR.

Outro estudo utilizando ^{31}P -RMN monitorou e avaliou a resposta terapêutica de gliomas experimentais modificados geneticamente.⁷⁵ Os espectros *in vivo* de RMN foram obtidos a partir dos gliomas subcutâneos de ratos C6 pós-tratamento com Ganciclovir. Foi observada uma significativa regressão do volume tumoral no 10º dia após o início da administração da droga. No entanto, nenhuma alteração do pH ou do metabolismo energético a partir dos valores de pré-tratamento foi observada. Já os espectros *in vitro* de ^{31}P -RMN de extratos dos tumores revelaram uma redução estatisticamente significativa da fosfocolina e da fosfoetanolamina no 6º dia após a administração da droga.

RMN utilizando a técnica de difusão de prótons determinou os perfis bioquímicos intracelulares de seis linhagens celulares de câncer de mama perfundidos em esferas de alginato. O estudo mostrou as diferentes etapas da progressão do câncer de mama e as diferenças dos metabólitos entre os grupos de linhagens celulares, incluindo a colina, lactato e treonina. A resposta para o agente antineoplásico, Ionidamine (LND), também foi monitorada pela função do tempo e da concentração da droga na perfusão das células tumorais. Os espectros ^1H -RMN evidenciaram aumento do sinal intracelular de lactato como uma resposta de LND no tratamento de câncer em diversas linhagens celulares. Estes resultados são consistentes com a

hipótese de que o principal mecanismo da LND em algumas células cancerígenas é marcado pela inibição do transporte do lactato. Este estudo demonstra a viabilidade da utilização de acompanhamento da espectroscopia de RMN intracelular em seu metabolismo e para estudar os efeitos e mecanismos de ação de drogas antitumorais.⁹³

Em células leucêmicas HL60 foram estudadas por MAS¹H-RMN após a indução de apoptose por radiação ionizante e por ação da droga antineoplásica doxorrubicina e, em seguida, a indução da necrose por aquecimento. A apoptose e a necrose foram confirmadas utilizando-se outras técnicas. Os espectros de ¹H-RMN mostraram que ambas as amostras contendo células apoptóticas foram caracterizadas pelos perfis metabólicos. Especificamente, um aumento dos lipídeos celulares e uma diminuição de glutamina, glutamato, colina, taurina e glutathione foram observados. Em contrapartida, as amostras de células necrosadas apresentaram um perfil metabólico diferente caracterizado por um aumento significativo em todos os seus metabólitos examinados, com exceção dos lipídios móveis, que se apresentaram inalterados, e da diminuição da glutathione. Os resultados sugerem que as variações nos espectros de ¹H-RMN são específicas de apoptose, independente do estado físico ou químico, isto é, da natureza do estímulo utilizado para induzir a este modo de morte celular, enquanto as células necrosadas são caracterizadas por um perfil completamente diferente dos metabólitos encontrados nos espectros de apoptose.¹¹³

Morvan e colaboradores^{76,77,90} investigaram a correlação de técnicas espectroscópicas em RMN para determinar e identificar as alterações do metabolismo dos fosfolipídios no tratamento *in vitro* de células de melanoma B16 cultivadas com cloroetil nitrosourea (CENU). Os resultados mostraram uma alteração significativa do metabolismo dos fosfolipídios das células tratadas *in vitro*, envolvendo uma baixa regulação da fosfocolina, e um dramático e irreversível aumento de fosfoetanolamina. Em outro estudo *in vitro*, Morvan e colaboradores⁷⁶, utilizando cisteamina em células de melanoma B16, evidenciaram a modificação do metabolismo dos

fosfolípidios realizados pelas células tumorais. Esta modificação foi demonstrada durante o crescimento tumoral indicando um acúmulo transiente de colina, glicerofosocolina e glicerofosfoetanolamina, além de um aumento sustentado da fosfocolina e fosfoetanolamina, enquanto os níveis de fosfatidilcolina mantiveram-se inalterados. Durante a recuperação do crescimento tumoral, permaneceram elevadas apenas a fosfocolina e a fosfoetanolamina. Portanto, os tumores de melanoma B16 tratados com cistemustina adquiriram um novo fenótipo do metabolismo dos fosfolípidios, um mecanismo que poderia participar da rediferenciação e/ou da sobrevivência das células tumorais.

O núcleo de ^{31}P é suficientemente sensível para que seja possível detectar os sinais de muitos metabólitos fosforilados móveis existentes nos seres vivos em concentrações da ordem dos milimolares (mM). Em 1974, Hoult e colaboradores⁷⁸ obtiveram espectros de qualidade de amostras com atividade fisiológica, incluindo o músculo esquelético isolado e intacto⁴⁸, o coração sob perfusão, fígado, rim e cérebro^{54,57,78}. A qualidade da resolução dos espectros, apesar da gama relativamente estreita dos desvios químicos, resulta do número um tanto pequeno de metabólitos fosforilados observáveis por RMN: ATP, ADP, fosfocreatina (PCr), nicotinamida-adenina dinucleotídeo (NAD), fosfato (Pi), açúcares fosforilados, entre outros. A RMN de ^{31}P mede apenas as concentrações das componentes não imobilizadas. Verifica-se a sensibilidade na detecção de níveis ATP e PCr, mas, nos casos de ADP e Pi, os valores obtidos por RMN são mais baixos porque parte do ADP está imobilizada na célula. De qualquer modo, conclui-se que as concentrações de ADP e Pi livres presentes em tecidos e órgãos bem oxigenados (por exemplo, [ADP]~20 μM , [Pi]~1,5 mM no músculo da rã em repouso a 4°C) são baixas. Essas concentrações associadas ao valor do pH intracelular permitem calcular a energia livre da hidrólise do ATP *in vivo*, a qual origina um potencial de fosforilação superior ao esperado. Além de medir simultaneamente a concentração relativa de vários metabólitos ao longo do tempo e de medir o pH intracelular, a RMN de ^{31}P permite estudar o ambiente químico dos metabólitos. Por exemplo, estudos direcionados nas

ligações de íons de Mg^{2+} ao ATP e ADP, cujos desvios químicos são alterados, permitiram estudar a distribuição dos metabólitos dentro e fora da célula. A distinção entre metabólitos intra e extracelulares resulta de diferenças de composição do pH dos respectivos meios.⁷⁸

O núcleo ^{13}C origina uma boa resolução espectral em sistemas biológicos, mas tem a limitação resultante da sua falta de sensibilidade e baixa abundância natural. Embora o estudo de compostos em abundância natural seja possível em certos casos específicos, tais como o tecido adiposo ou glicogênio do fígado, a maioria dos estudos requer o enriquecimento prévio dos átomos de carbono no isótopo ^{13}C em uma ou várias posições da molécula do substrato. Este processo permite estudar detalhadamente de um modo não destrutivo a cinética do processo metabólico, observando ao longo do tempo os sinais resultantes da incorporação dos núcleos ^{13}C nos vários produtos formados.⁹⁹ A elevada sensibilidade do próton é compensada pelas dificuldades resultantes da presença de sinais muito intensos provenientes da água ou da gordura, que podem tornar difíceis as observações de outros metabólicos mais diluídos. No entanto, já foi possível estudar suspensões celulares de eritrócitos utilizando técnicas modernas. O estudo de sistemas mais complexos tornou-se recentemente possível por supressão dos sinais intensos da água e da gordura, quer por espectroscopia de correlação, quer por outras técnicas de supressão. Por exemplo, dado que os valores de T2 da água e de T1 da gordura nos tecidos são muito inferiores aos valores de muitos metabólicos, a combinação das sequências Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) (filtros de T2) e Inversão Recuperação (IR) permitiu a observação dos sinais da taurina, creatina, fosfocreatina etc.⁹⁹

2 JUSTIFICATIVA

O estudo da organização e controle dos caminhos metabólicos, incluindo a atividade das enzimas que catalisam os diversos passos e outras propriedades que caracterizam o estado fisiológico de um sistema biológico, constitui um importante problema em bioquímica e fisiologia. O metabolismo das células neoplásicas foi estudado durante muitas décadas, com o objetivo de conceber novas estratégias de diagnóstico, da terapêutica e da prevenção do câncer.

Novas abordagens para investigação da bioquímica do câncer foram recentemente realizadas pelas técnicas espectroscópicas por RMN. A utilização destas técnicas, combinada com a alta resolução e sensibilidade de análises *in vitro* de RMN, abriu novos caminhos para investigar as alterações bioquímicas que ocorrem em tumores, nomeadamente no nível do metabolismo lipídico e bioenergético.

3 OBJETIVO

Avaliar o potencial da Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear no estudo do metaboloma do melanoma murino B16F10 em comparação ao tecido não tumoral, visando uma melhor compreensão dos padrões metabólicos tumorais e a caracterização de novos biomarcadores relacionados com a progressão tumoral e a suas correlações morfofuncionais no processo de carcinogênese e invasão celular.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Manutenção e cultivo das linhagens celulares de melanoma B16F10

As células de linhagem tumoral de melanoma B16F10 foram adquiridas do banco da *American Type Culture Collection* (ATCC) e foram cultivadas em frascos de cultura de 75 cm² em meio de cultura (RPMI-1640), suplementada com 10% de soro bovino fetal (SFB) inativado, 2mM de L-glutamina e antibióticos. Antes das células atingirem confluência, foram subcultivadas para ampliação e congelamento (meio completo contendo 10% de dimetilsulfóxido) e mantidas em nitrogênio líquido. As suspensões celulares utilizadas para a implantação no flanco dorsal dos animais foram obtidas após o tratamento dos frascos de cultura com Tripsina 0,2% por 5 minutos e inativação com 10% de soro fetal bovino. As células desprendidas foram centrifugadas duas vezes, ressuspensas em meio de cultura e a concentração celular ajustada por contagem em câmara de Mallassez.

4.2 Implantações das células tumorais

Um grupo de camundongos da linhagem C57BL/6J (totalizando n=30) mantidos no biotério da Divisão de Desenvolvimento Científico do Instituto Butantan foram injetados pela via subcutânea dorsal com 5×10^4 células tumorais B16F10, em condições estéreis. Após o desenvolvimento visível e palpável dos tumores implantados, cerca de 10 dias após a injeção das células, a massa corporal e o volume do tumor foram sequencialmente medidos. O tamanho e volume tumoral foram avaliados com o auxílio de um paquímetro, duas medidas do comprimento (Longitudinal) e duas medidas da largura (Vertical) da massa tumoral dorsal. Seguindo as normas estabelecidas pelo NCI (*National Cancer Institute*), para os valores das medidas foram convertidos em volume, levando-se em consideração a

fórmula do cálculo do volume esférico, cálculo este usual para a medição de tumores sólidos em experimentação animal. A fórmula utilizada será:

$$\text{Volume do tumor} = \text{Longitudinal (cabeça-cauda)} \times \\ \text{Transverso}^2 \text{ (pata-pata)} \times \frac{3}{4} \pi.$$

Além do acompanhamento da massa corporal e do volume dos tumores, foram avaliadas as taxas de sobrevivência, ou seja, o tempo de vida dos animais após 30 dias pós-implante dos diferentes grupos experimentais.

4.3 Necropsias dos animais

Os animais foram avaliados levando-se em consideração o tempo de evolução tumoral. A partir do 5º e sucessivamente nos 15º e 25º dias pós-implante os animais foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical. Em seguida, os tumores e tecidos contralaterais da derme foram retirados por biópsias com PUNCH de 0,2 mm de diâmetro e armazenados imediatamente em nitrogênio líquido para serem avaliados por espectroscopia de RMN. Também foram analisadas as alterações macroscópicas, como a presença de metástase e exsudatos inflamatórios. Os órgãos foram colocados em tubos Falcon com 3 ml de formol 10% tamponado (pH: 7.2) para posteriores análises histológicas e congelados em nitrogênio líquido para futuras análises espectrais.

4.4 Análises das Fases do Ciclo Celular por Citometria de Fluxo

Suspensões de 10^6 células de amostras das células de melanoma B16F10 foram retiradas por tripsinização, congeladas em tampão citrato (2mM) e mantidas em nitrogênio líquido até o momento da análise. Para as biópsias dos tecidos tumorais de melanoma B16F10 dorsais foram realizadas uma digestão e uma separação das células tumorais dos tumores dorsais implantados em camundongos C57BL/6J nos períodos de 5º, 15º e 25º dias nos quais a concentração celular foi ajustada para 10^6 células/mL em meio de cultura RPMI-1640 e suplementado com 10% de soro fetal bovino.

A determinação do ciclo celular foi realizada em citômetro de fluxo FACScalibur (BD), utilizando a metodologia do Iodeto de Propídeo (PI). As

suspensões celulares foram incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente com 30 mg/ml de solução de tripsina e em seguida com 5 g/l de inibidor de tripsina e 0,1 g/l de ribonuclease – A. Após este período as células foram incubadas com 18 mg/ml de PI por 15 minutos em temperatura ambiente, seguida da análise das populações celulares nas fases do ciclo celular por citometria de fluxo. A aquisição da população celular, em média de 10.000 eventos foi realizada pelo programa “*Cell Quest*” (BD) e os conteúdos de DNA foram avaliados pela intensidade de fluorescência (FL-2). Os resultados foram expressos em porcentagem média de células nas diferentes fases do ciclo celular: DNA fragmentado/ apoptose (subdiploide), G0/G1, fases S e G2/M. A discriminação das populações celulares (linhagens B16F10) contidas nas fases do ciclo celular e mortas foram analisadas isoladamente, conforme a aquisição do programa MOD-FIT (BD).

4.5 Potenciais de membrana mitocondrial por citometria de fluxo

O potencial de membrana mitocondrial foi avaliado pela estimativa medida pela captação da sonda JC-1 (5,5', 6,6'-tetracloro-1,1', 3,3-tetraetilbenzimidazolilcarbocinina). A cada condição definida da incubação com o sulindaco e seus metabólitos, alíquotas de 2×10^6 células foram incubadas com 10 $\mu\text{mol/L}$ de JC-1 por 20 minutos a 37°C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 1500 rpm por 10 segundos e a suspensão celular resultante foi lavada com salina tamponada. A fluorescência foi determinada em $\lambda=485$ nm para excitação e $\lambda=590$ nm para emissão por citometria de fluxo.

4.6 Análise da expressão de marcadores das vias de morte celular e de checagem do ciclo celular por citometria de fluxo

Após digestão e separação das células tumorais dos tumores dorsais implantados em camundongos C57BL/6J nos diferentes períodos experimentais, a concentração celular foi ajustada para 10^6 células/mL em meio de cultura RPMI-1640 e suplementado com 10% de soro fetal bovino. Alíquotas de 100 μL das suspensões celulares foram permeabilizadas com Saponina 1% e incubadas por 1 hora, à 4°C, com 1 μg de anticorpo

específico anticiclina D1 conjugado com FITC (Santa Cruz, USA) e 1µg de anticorpo específico Caspase 3 conjugado com ficoeritrina-PE (Santa Cruz, USA) na presença ou ausência de seu inibidor específico Ac-Asp-Glu-Val-Asp-OH (BioAgency Biotecnologia Ltda). Após este período, as células foram centrifugadas por 10 minutos à 1500 rpm e lavadas com PBS gelado. O sobrenadante desprezado e o botão celular ressuspenso em solução de PBS contendo 1% de paraformaldeído. A leitura e análise da expressão em unidades arbitrárias de fluorescência dos receptores na superfície celular foram realizadas em citômetro de fluxo FACScalibur (Becton & Dickinson, USA). Neste estudo, foi utilizado o programa “Cell Quest” (BD), com aquisição de 100.000 eventos, tendo como parâmetros FSC (tamanho) e SSC (granulosidade/complexidade) em FL1/FL2, a detecção da intensidade de fluorescência da reação antígeno/anticorpo conjugado à PE e/ou FITC.

4.7 Ensaios de proliferação celular

Para caracterizar a atividade proliferativa das células de melanoma B16F10 foi realizado o ensaio de proliferação com o marcador carboxifluoresceína (CFSE - *Carboxy-fluorescein diacetate succinimidyl Ester* – Molecular Probes). Inicialmente foi necessário padronizar o protocolo para utilização deste marcador nas células de melanoma B16F10 no intuito de se identificar a concentração ideal do CFSE para esta marcação.

O CFSE, diluído em PBS 0,1% albumina humana em diferentes concentrações, foi adicionado ao meio com as células para a marcação. O tempo de marcação foi de 10 minutos a 37° C, homogeneizando a cada 3 minutos. A marcação foi interrompida adicionando cinco vezes o volume de meio RPMI 10% de SBF e incubando-se por 5 minutos em gelo e no escuro. As células foram, então, lavadas três vezes com 20 mL de RPMI 10% SBF e ressuspendidas em 1 ml de RPMI 10% de SBF para a contagem. Uma alíquota de células foi separada para verificar a intensidade de marcação das células com CFSE no dia da marcação (dia zero) em citômetro de fluxo. Após a determinação da concentração ideal para a marcação das células B16F10, o experimento foi realizado seguindo os protocolos do tratamento

na expansão (descritos no item 4.1). Portanto, as células B16F10 marcadas com CFSE foram plaqueadas em 19 garrafas de cultura de 25 cm² e cobertas com papel alumínio para evitar perda de fluorescência durante o experimento.

4.8 Análises histopatológicas e imunohistoquímicas

Foram retirados pequenos fragmentos de aproximadamente 0.2cm² das biópsias dorsais e de órgãos (pulmão, fígado, baço, pâncreas e rins) dos animais portadores de melanoma B16F10, pesados e fixados por 24 horas em tampão formalina, tamponado com o pH 7,4 para a realização de análises histopatológicas, bem como de seus tumores e metástases, para serem corados de diversas maneiras, possibilitando uma melhor visualização das manifestações ocorridas no microambiente celular, como diferenciação celular, neoformação vascular, apoptose, necrose, regeneração tecidual e hemorragias.

Após período de fixação de 24 horas, utilizando lâmina histológica sobre tábua de macroscópica, foram retiradas duas amostras retangulares de cada fragmento do tumor. Todas as amostras foram acondicionadas em cápsula histológica e colocadas no autotécnico (Leica® modelo RM 2145) para processamento *“overnight”*, sendo desidratadas em concentrações crescentes de álcool etílico a 70, 80 e 90%. Posteriormente, foram diafanizadas em xilol contendo misturas sequencialmente concentradas de parafina durante 12 horas. Realizada inclusão em parafina quente (Leica® modelo EG 1160), os blocos foram microtomizados (Leica® modelo RM 2145) em cortes de 5µm e dispostos em lâmina de vidro de 75 x 25 mm³, realizando dois níveis de corte para cada área de estudo e, a seguir, as lâminas foram coradas pelos métodos imunocitoquímicos de Ki67. Todas as lâminas histopatológicas e imunohistopatológicas foram confeccionadas no Laboratório Central de Patologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

4.9 Padronizações de armazenamento e transporte das amostras

Foram padronizados meios de armazenamento e de transporte das amostras celulares e das biópsias com objetivo de manter a integridade celular das amostras para as análises espectrais.

Substâncias utilizadas: Meio de cultivo RPMI 1640 para células de melanoma B16F10; soro fetal bovino (SFB); solução de tripsina/EDTA; antibióticos/antimicóticos (Sulfato de Gentamicina 50 mg/L e Anfotericina B 2 mg/L) crioprotetor DMSO na concentração 10%.

4.10 Congelamentos das células

Foram utilizados criotubos contendo células de melanoma B16F10 com uma concentração de 10^9 células/mL cada. As células tripsinizadas foram coradas com azul de Trypan e a contagem em câmara de Neubauer, como descrito por Butler e Dawson⁸⁵. A concentração celular foi ajustada com RPMI (células de melanoma B16F10) com 10% de SFB, de modo que cada criotubo contivesse 1×10^9 células. Em seguida, foram adicionados 10% do crioprotetor DMSO a tal ponto, que o volume final para cada criotubo fosse de 1mL. Os criotubos contendo as células ressuspendidas na solução de congelamento foram armazenados a -70°C por 18 horas. Após isso, foram acondicionados em nitrogênio líquido (-196°C) onde permaneceram até o momento do descongelamento.

Os criotubos foram retirados do nitrogênio, descongelados em banho-maria a 37°C e ressuspendidos em 9mL de RPMI e com 10% de SFB. Após a ressuspensão, as três amostras foram novamente centrifugadas e novamente suspendidas em solução composto por SFB (10%) mais água deuterada (D_2O). A concentração celular foi determinada e a porcentagem de recuperação foi calculada através da estimativa do número total de células recuperadas em relação ao número de total de células congeladas.

4.11 Ensaios colorimétricos de redução do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) por desidrogenase mitocondriais

Para determinação da porcentagem da viabilidade celular utilizou-se ensaio de MTT. Em uma microplaca de 96 poços foram adicionados 100 µL da suspensão celular de cada tratamento. Cada criotubo foi semeado em triplicata perfazendo um total de 9 poços por tratamento. Como controle, foram utilizadas células de melanoma e melanócitos normais tripsinizadas e ressuspendidas apenas em RPMI com 10% de SFB em uma concentração de 10^9 células/mL. A placa foi incubada 24 hs em estufa a 37°C, com atmosfera a 5% de CO². Em seguida o sobrenadante foi removido e adicionado 20µL de MTT. A placa foi incubada por 4 horas, protegida da luz, a 37°C, com atmosfera a 5% de CO². Retirou-se o MTT, adicionou-se 50µL de etanol por poço e incubou-se por 10 minutos por 37°C, em seguida, retirou-se o sobrenadante e foi feita a leitura em 2 comprimentos de onda, 570nm e 650nm. A porcentagem da viabilidade celular (PVC) foi determinada pela seguinte fórmula: $PVC = \text{média da diferença (570-650) dos poços tratados} \times (100) / \text{média da diferença (570- 650) dos poços do controle}$. As análises espectrais das amostras foram realizadas conforme metodologia descrita abaixo.

4.12 Aquisições de espectros por RMN de ¹H e ¹³C, ³¹P

Experimentos de ¹H, uni e bidimensionais foram adquiridos em espectrômetro Bruker Avance III (colaboração com Projeto JP FAPESP 05/59571-0 – ProfºDrº. Alvielér Magalhães), operando a 400.13MHz para ¹H, equipado com sonda de alta resolução sob rotação no ângulo mágico (*High Resolution Magic Angle Spinning* – HRMAS) de 4mm de tripla ressonância (HCP).

Protocolo de aquisição dos espectros

Foram utilizados basicamente experimentos de supressão de duplo-sinal de solvente e água via onda contínua e gradientes de campo pulsados, além de sequências 1D que utilizam metodologias adiabáticas em suas sequências de pulsos.

Tabela 1 - Parâmetros de aquisição de uma sequência 1D ZGF2PR (dupla supressão de sinal) para obtenção de espectros de H de amostras de células de melanoma B16F10.

Parâmetros	Ajustes
Solvente/Solução Congelamento	H ₂ O + D ₂ O + DMSO
Calibração com amostra padrão	H ₂ O + D ₂ O ($\delta = 4,7$ ppm) DMSO ($\delta = 2,6$ ppm)
Temperatura da amostra	300k
Sequência de Pulso	1D ZGF2PR
Supressão de água	Modelagem de excitação
Ângulo do pulso de excitação	90
Ângulo de reorientação do pulso	180
Tempo de relaxamento	3s
Dimensão direta da largura de varredura	3200Hz
Dimensão indireta do número de pontos dos dados	16384
Dimensão indireta da largura de varredura	50Hz
Número de transientes	Tipicamente 8 por incremento
N° de Scans	Ns = 256
Tempo de aquisição	Tipicamente ± 16 min

Tabela 2 - Parâmetros de aquisição de uma sequência 1D CPMG (t_2^*) para obtenção de espectros de H de amostras de células de melanoma B16F10.

Parâmetros	Ajustes
Solvente	H ₂ O + D ₂ O
Calibração com amostra padrão	H ₂ O + D ₂ O ($\delta = 4,7$ ppm)
Temperatura da amostra	300k
Sequência de Pulso	1D CPMG (<i>spin-eco</i> t_2^*) [*]
Supressão de água	Modelagem de excitação
Ângulo do pulso de excitação	90
Ângulo de reorientação do pulso	180
Tempo de relaxamento	4s
Dimensão direta da largura de varredura	6010Hz
Dimensão indireta do número de pontos dos dados	16384
Dimensão indireta da largura de varredura	50Hz
Número de transientes	Tipicamente 8 por incremento
Nº de Scans	Ns = 256
Tempo de aquisição	Tipicamente ± 20 min

HRMN das células B16F10 mantidas em cultura:

Foi avaliado o potencial da RMN de alta resolução, em conjunto com a análise multivariada, para encontrar correlações consistentes entre a composição de amostras de células de melanoma B16F10, determinando as diferenças metabólicas dos dias 5°, 15° e 25°. Após realizar as culturas celulares, as células foram congeladas em nitrogênio líquido, processadas e analisadas por espectroscopia de RMN. Foram utilizadas sequências 1D de dupla saturação, filtro T2 e realizados espectros de ¹H e ³¹P. Após a aquisição dos espectros os dados foram processados no programa TopSpin® e iniciadas a identificação e caracterização dos sinais.

HRMN das biópsias de melanoma murino:

Amostras das biópsias de melanoma murino, tecido adjacente colhidas de peças cirúrgicas removidas de animais portadores de melanoma B16F10 e biópsias de tecido subcutâneo de camundongos normais foram analisadas através da Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de alta resolução com rotação segundo o ângulo mágico (HRMAS).

Os animais foram divididos em 3 grupos, classificados como 5°, 15° e 25° período pós-implantação das células tumorais B16F10 em dorso de camundongos C57. Grupo I - Após o 5° dia de inoculação das células tumorais (B16F10) foram realizadas biópsias dos tumores e tecidos contralaterais (adjacente) da derme retirados por biópsias com instrumento cirúrgico dermatológico, PUNCH de 0,2 mm de diâmetro, e armazenados imediatamente em nitrogênio líquido para serem avaliados por espectroscopia de RMN; Grupo II - Após o 15° dia de inoculação das células tumorais (B16F10) foram realizadas biópsias dos tumores e tecidos contralaterais da derme retirados por biópsias e armazenados imediatamente em nitrogênio líquido para serem avaliados por espectroscopia de RMN; Grupo III - Após o 25° dia de inoculação das células tumorais (B16F10) foram realizadas biópsias dos tumores e tecidos contralaterais da derme retirados por biópsias e armazenados imediatamente em nitrogênio líquido para serem avaliados por espectroscopia de RMN. Os animais foram avaliados durante 30 dias. Foram analisadas 5 amostras a cada período. A análise através da RMN-HRMAS permitiu uma análise direta de pequenas quantidades de tecido mantendo-o intacto (ca. 20 mg), permitindo a caracterização detalhada da sua composição química e de suas propriedades moleculares dinâmicas. Através de métodos de aquisição unidimensional 1D, foram realizados espectros de ^1H e iniciada a identificação das estruturas de metabólitos endógenos, presentes em concentrações submilimolares (ppm), envolvidos em diferentes vias bioquímicas. Para a discriminação entre tecido neoplásico e tecido normal adjacente, foram investigadas as variações entre as amostras e a observação direta dos espectros. Foram utilizadas sequências 1D de

saturação, filtro T2 e realizadas espectros de ^1H . Após a aquisição dos espectros os dados foram processados no programa TopSpin[®] e iniciadas a identificação e caracterização dos sinais.



Figura 11– Instrumentação em HRMAS-NMR, esquema de preparo da amostra e aquisição dos espectros.

5 RESULTADOS

5.1 Aspectos citológicos do crescimento da linhagem tumoral de melanoma B16F10

As células da linhagem tumoral de melanoma murino B16F10 foram adquiridas do banco da *American Type Culture Collection* (ATCC) e cultivadas em frascos com meio de cultura (RPMI-1640), suplementado com 10% de soro bovino fetal (SFB). Após a confluência celular, as células foram armazenadas em criotubos e congeladas em solução de congelamento, contendo 10% de DMSO (dimetil-sulfóxido de sódio), e mantidas em nitrogênio líquido. Foram separadas amostras das células de melanoma B16F10 para as análises de padronização de armazenamento celular e para espectroscopia de HRMAS-RMN. O aspecto de crescimento celular foi acompanhado em microscópio invertido, fotodocumentadas nos diferentes períodos e mostraram-se células aderentes fusiformes, com produção de pigmento acastanhado (Figura 12).

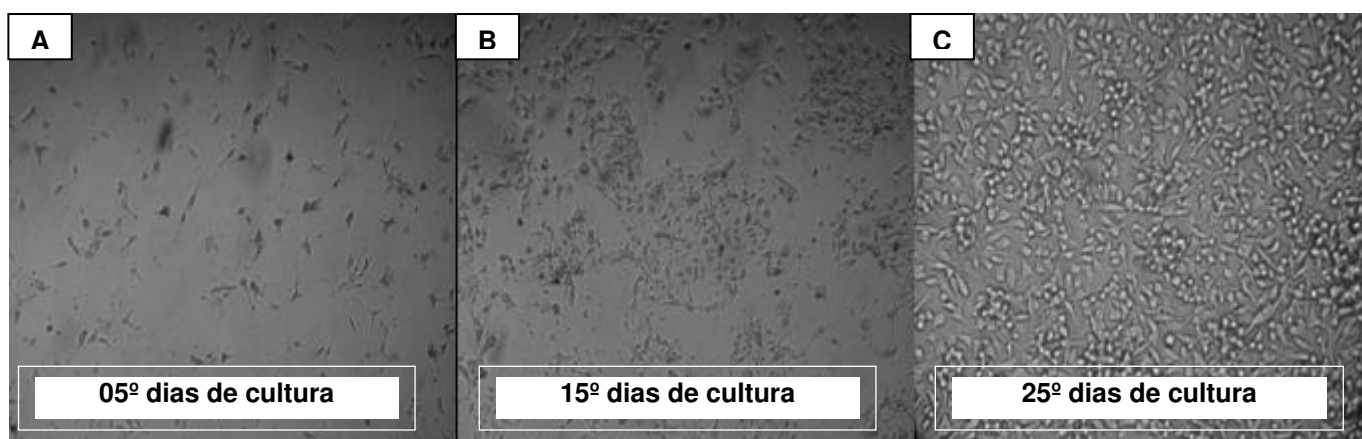


Figura 12 – Fotomicroscopia obtida em microscópio invertido de culturas de melanoma murino B16F10 mostrando a progressão do crescimento celular nos períodos de 5º (A), 15º (B) e 25º (C) dias até atingirem a linha de confluência. Aumento de 20 e 40X.

5.2 Análises das Fases do Ciclo Celular por Citometria de Fluxo

A persistência do estresse oxidativo, geração de metabólitos secundários em células tumorais pode explicar parcialmente algumas características do crescimento do tumor, como a ativação dos proto-oncogenes indutores da divisão celular, reparo de DNA, fatores de transcrição, instabilidade genômica, resistência à radioterapia ou à quimioterapia, invasão e disseminação. Um dos mais importantes fatores a ser considerado em relação à situação de estresse oxidativo é o balanço entre radicais livres e sistemas antioxidantes e a capacidade de proliferação celular. Neste projeto foram avaliadas separadamente as populações de células contidas no ciclo celular e as células mortas que apresentaram DNA fragmentado, conforme descrito no item Materiais e Métodos.

A Tabela 3 representa o processo de crescimento das culturas celulares da linhagem de melanoma B16F10 comparado, estatisticamente, aos períodos de 5°, 15° e 25° dias nas diferentes fases do ciclo celular. Nos períodos de 5° e 15° dias, observa-se uma progressão do crescimento celular representado pelo aumento na fase G0/G1. Em contrapartida, no período de 15° dias observa-se uma parada na fase de síntese (S) e início da replicação celular (S>G2/M) com a formação de clones celulares. Nota-se aumento gradativo na população celular com DNA fragmentado, supostamente devido ao aumento da densidade celular.

Tabela 3- Fases do ciclo celular das células de melanoma murino B16F10 obtidas por citometria de fluxo. Expresso em média \pm desvio padrão n=05 animal/grupo.

Fases do ciclo celular B16F10	5° dias/cultura N=05	15° dias/cultura N=05	25° dias/cultura N=05
DNA fragmentado	12,3 \pm 1,3	(\uparrow) 27,2 \pm 1,5***	(\uparrow) 37,0 \pm 2,7**
G0/G1	49,2 \pm 4,0	(\downarrow) 8,0 \pm 1,7**	(\downarrow) 16,1 \pm 3,9***
Fase-S	16,9 \pm 1,2	17,3 \pm 4,7	18,1 \pm 1,2
G2/M	50,2 \pm 2,0	(\uparrow) 70,8 \pm 4,0	(\uparrow) 60,1 \pm 1,5

*** diferença significativa $p < 0.001$. Teste de variância de Anova.

5.3 Análises dos parâmetros tumorais do crescimento dorsal dos camundongos portadores de Melanoma B16F10.

Após o 5º dia da implantação de 5×10^4 células tumorais na região dorsal, 100% dos animais apresentavam tumores dorsais próximos aos locais de inoculação apresentando em média volume de $0.10 \pm 0.05 \text{cm}^3$. Os animais de todos os grupos de experimentação acondicionados em grupos de 05 animais por gaiola foram pesados e realizadas as medições do comprimento e a largura do tumor, com o auxílio do paquímetro, além de fotodocumentados. O aspecto macroscópico dorsal dos diferentes períodos de estudo está apresentado na Figura 13.

Os animais foram observados diariamente e, após 25º dia de implantação, foram sacrificados por deslocamento cervical, necropsiados os tumores dorsais e as metástases presentes nos órgãos internos, (coração, pulmão, fígado, rins, baço), pesados e fixados por 24 horas em tampão formalina, tamponado com o pH 7,4 para a realização de análises histopatológicas. Macroscopicamente, os tumores dorsais apresentavam-se pigmentados e com áreas de necrose, com extensas áreas de ulceração, extremamente irrigada e ocupando um volume expressivo em relação à superfície corpórea total do animal, principalmente iniciando-se a partir do 15º dia e estendendo-se até o 25º dia de experimentação (Figuras 13B e C).

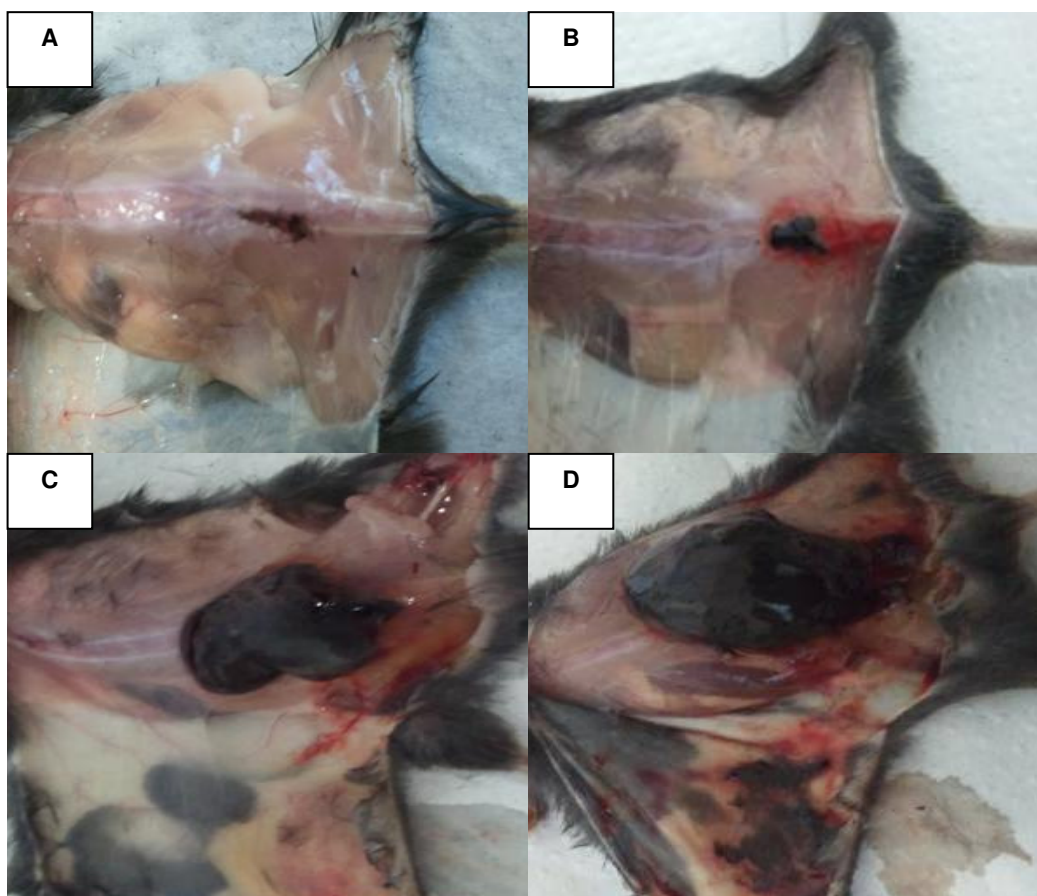


Figura 13 Aspecto macroscópico de camundongos C57BL/6J do 5° (A), 15° (B), 25° (C) e 30° (D) períodos pós-implantação de células de melanoma murino B16F10.

(A) Na região dorsal, observa-se início do crescimento tumoral caracterizada por uma área pigmentada, coloração castanho-preto, aderida a fáscia muscular. Ainda, observam-se áreas de neovascularização indicando a características neoplásicas malignas.

(B) Observa-se crescimento tumoral exponencial caracterizado por aumento significativo do volume. O tumor apresenta áreas hemorrágicas, neovascularização regional e em alguns animais observou-se um espreado da massa tumoral na região da coluna vertebral dorsal demonstrando sua agressividade tumoral e de sua invisibilidade tecidual local e à distância.

(C) Observa-se crescimento tumoral exponencial caracterizado por aumento do volume. O tumor apresenta áreas hemorrágicas, neovascularização regional e áreas de ulceração e necrose.

(D) Observa-se crescimento tumoral exponencial caracterizado por aumento do volume. O tumor apresenta áreas hemorrágicas, neovascularização regional, áreas de ulceração, invisibilidade tecidual e metástases em parênquima hepático e pulmonar.

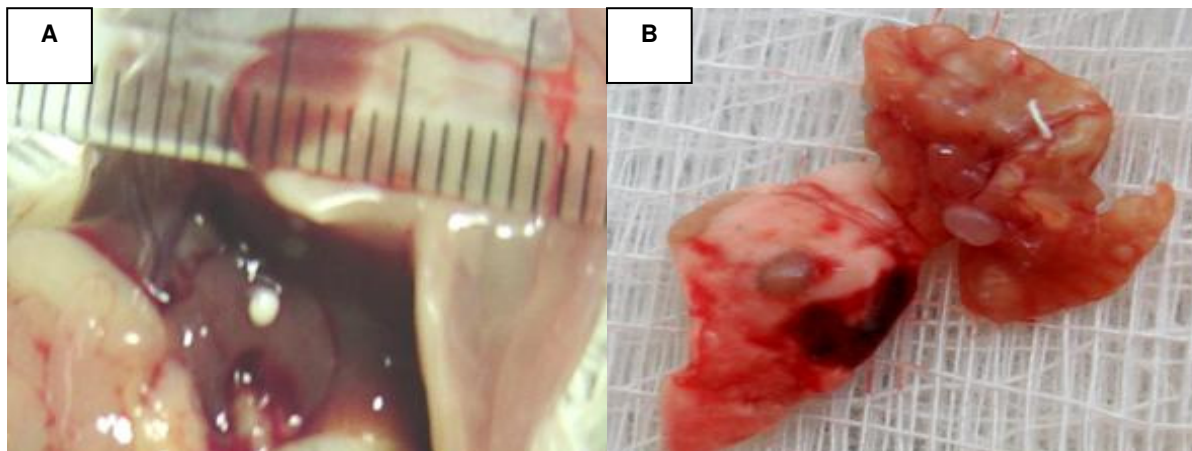


Figura 14 – Aspecto macroscópico das lesões internas observadas após a necropsia de camundongos C57BL/6J portadores de melanoma murino dorsal B16F10 entre os períodos de 25° e 30°.

Observam-se metástases nodulares de aspectos esbranquiçados e acastanhados nos parênquimas hepático (A) e pulmonar (B).

A curva de crescimento tumoral foi avaliada em comparação com as seguintes medições: incidência, taxa de sobrevivência, área tumoral e número de metástases internas. O padrão de crescimento do melanoma B16F10 em camundongos C57BL/6J revelou uma curva com padrão sigmoide, representada pela reta de ascendente, fase de crescimento exponencial e uma reta com tendência ao declínio, decorrente da expansão do volume tumoral e aumento das áreas de necrose tumoral (Figura 15-A), como também diminuição significativa da massa corpórea (Figura 15-B). Após a dissecação cirúrgica, verificamos que o tumor implantado localizava-se no tecido subcutâneo, apresentando coloração enegrecida decorrente da produção excessiva de liberação para o meio de melanina pelas células tumorais.

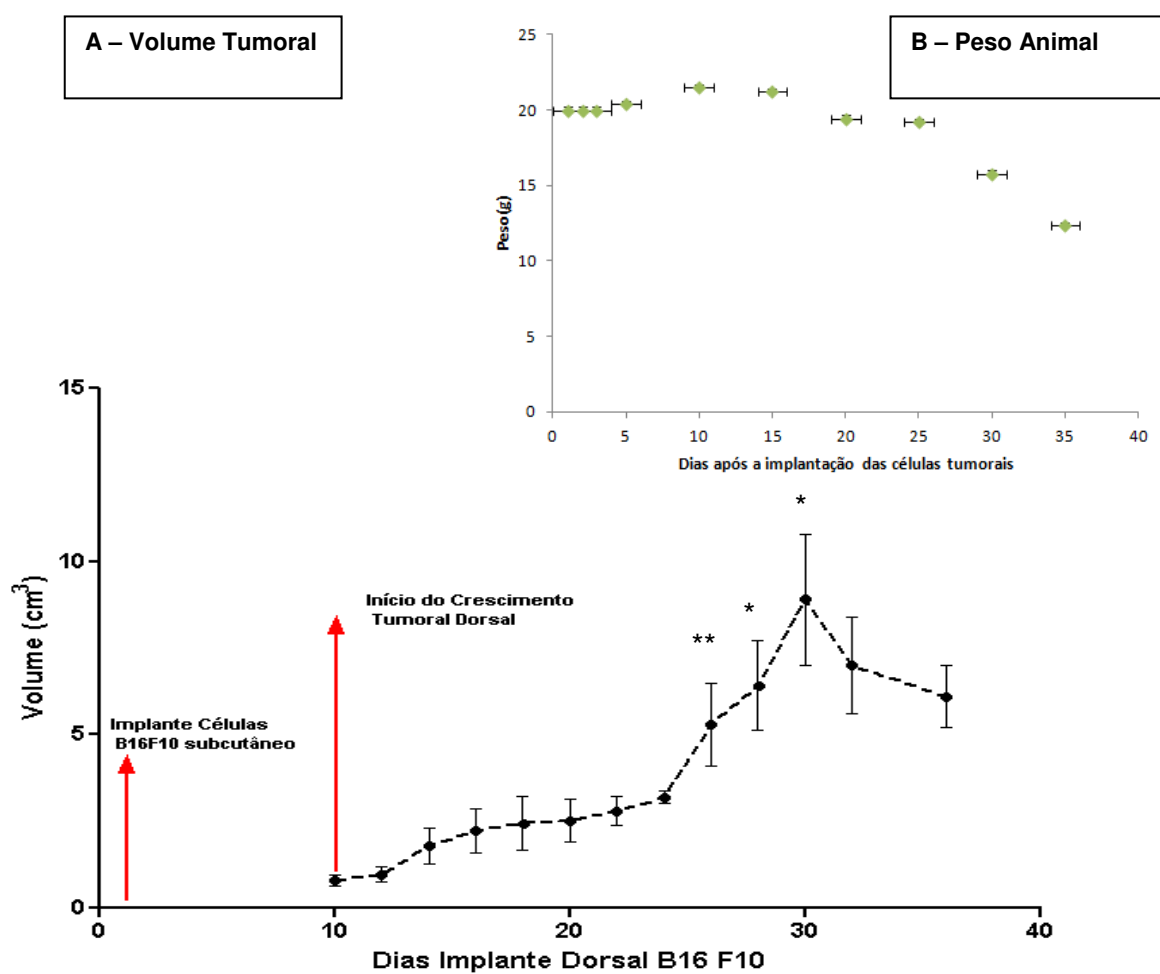


Figura 15 – Curva de crescimento do volume tumoral entre o 5° e 15° dia do implante tumoral 5×10^4 células de melanoma B16F10 em camundongos C57BL/6J.

Nota-se crescimento exponencial após 25° dia de implante e decréscimo até o momento do sacrifício decorrente da presença de áreas de necrose.

** Diferença proliferativa obtida pelo teste de variância Anova.

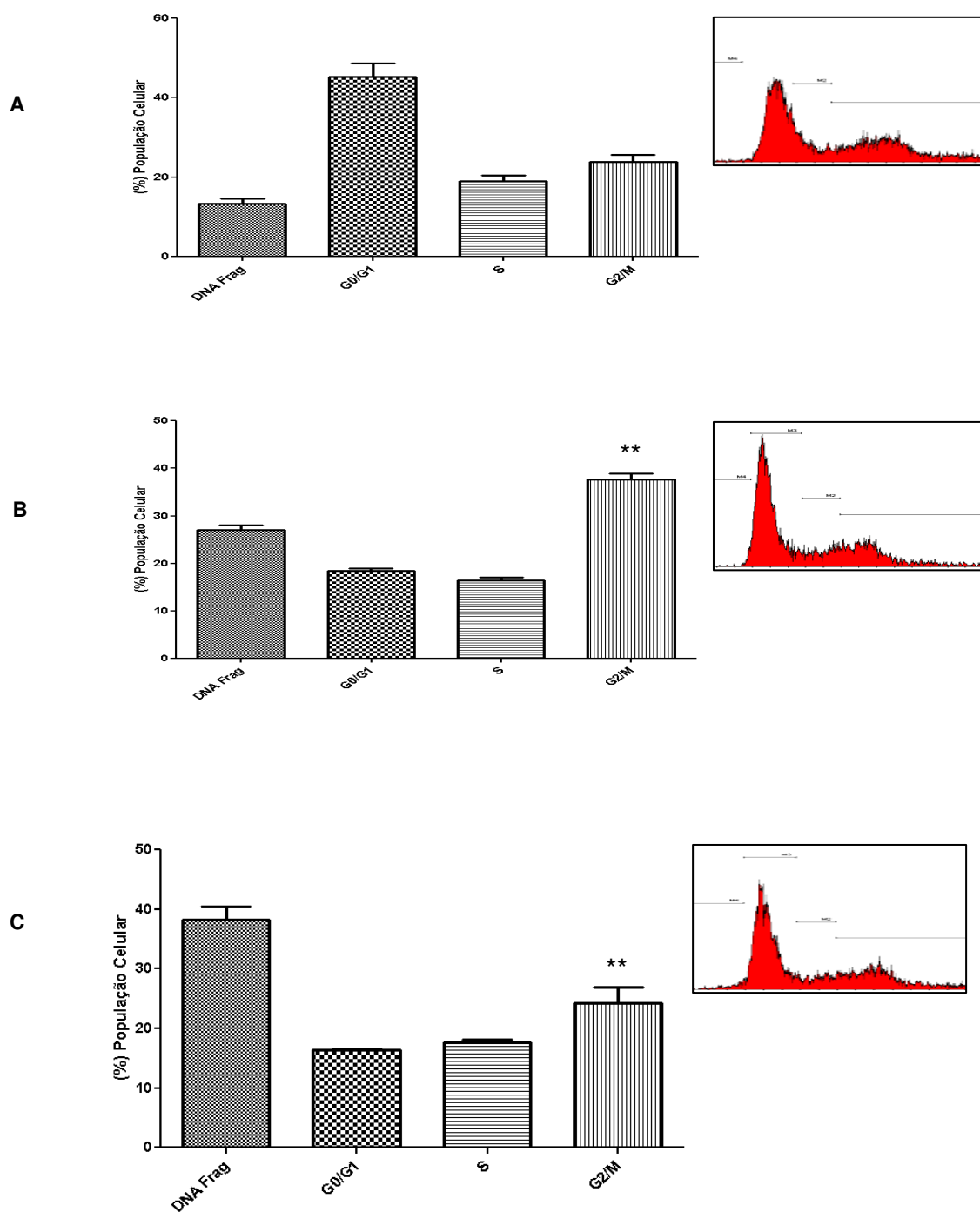


Figura 16 – Gráfico de barra e histograma representativo do programa WIN-MDI da média e desvio padrão das populações celulares nas fases do ciclo celular dos tumores dorsais melanoma B16F10 após 5° dias).

5° dias (A), 15° dias (B) e 25° dias (C) de implantação. (*unset=* representa os histogramas adquiridos pelo programa *cell-quest* para determinação da fase do ciclo. ** diferença significativa da taxa proliferativa celular.

5.4 Análises do índice proliferativo do crescimento dorsal dos camundongos portadores de Melanoma B16F10 por citometria de fluxo pelo método CFSE.

O protocolo utilizado com o CFSE permitiu avaliar de maneira fácil e com grande precisão como o marcador foi dividido igualmente entre as células-filhas com cada divisão celular. CFSE tem fluorescência muito brilhante e, portanto, localização das células em populações de grande heterogeneidade, permitindo a análise simultânea de número celular, posição, bem como o status de divisão. Utilizamos como controle para o estabelecimento deste método em nosso laboratório linfócitos T obtidos de gânglios linfáticos de (4) camundongos normais C57BL/6J de aproximadamente 2 meses de idade estimulados com o mitógeno fitohemaglutinina em concentração ótima mantidos por 48, 72 e 96 horas de cultura na presença e ausência do fator mitogênico, as curvas de ativação com o mitógeno (Figura 17). As aquisições realizadas no citômetro de fluxo e analisadas pelo programa Wizard Proliferation estão apresentadas na figura 17.

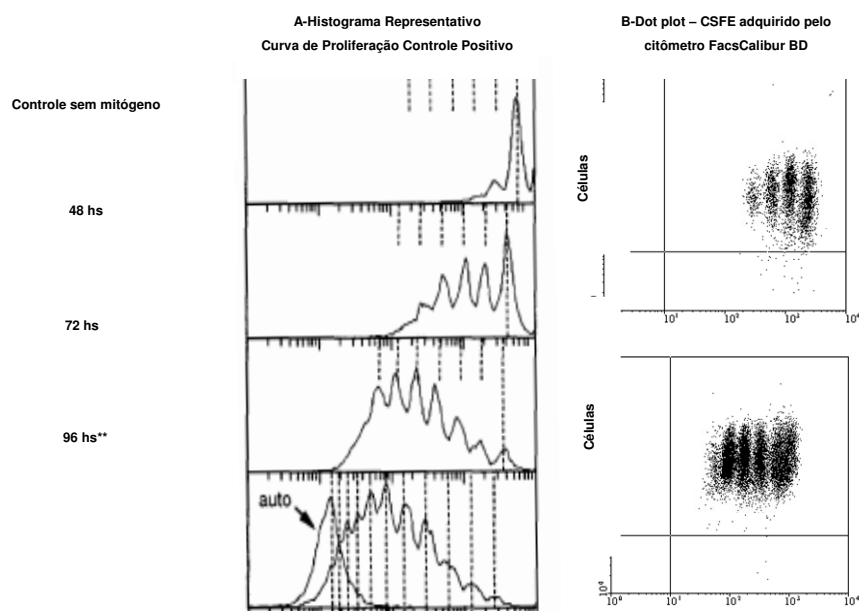


Figura 17 – Curva de proliferação de linfócitos normais de camundongos C57BL/6J estimulados com fitohemaglutinina (controle / positivo)

(A) após 48, 72 e 96 horas de cultura. (B) Curva da distribuição do marcador CSFE em células-filhas no histograma analisado pelo programa *Proliferation Wizard* e (C) *dot plot* representativo das populações celulares adquiridas pelo programa Cell Quest.

*** Diferenças estatísticas entre os tempos de cultivo. Teste de Variância de ANOVA.

As células tumorais obtidas dos tumores dorsais nos períodos de 5°, 15° e 25° dias foram separadas após a adição de colagenase tipo IV. A suspensão celular foi incubada com CSFE e mantida em cultura por 72 horas, analisada a proporção de células em proliferação pelo programa *Proliferation Wizard*, calculadas as proporções e relações de proliferação entre os tumores analisados. Os histogramas representativos de cada grupo de experimentação foram agrupados em o tumor de menor diâmetro ou volume e o tumor de maior diâmetro ou volume (Figura 18). As médias e os cálculos estatísticos estão apresentados na figura 19. As diferenças encontradas demonstram claramente a relação entre as taxas de proliferação, índice de proliferação e o volume tumoral. Tumores de 5° dias de crescimento apresentam menor capacidade proliferativa que os demais períodos, portanto, menor volume.

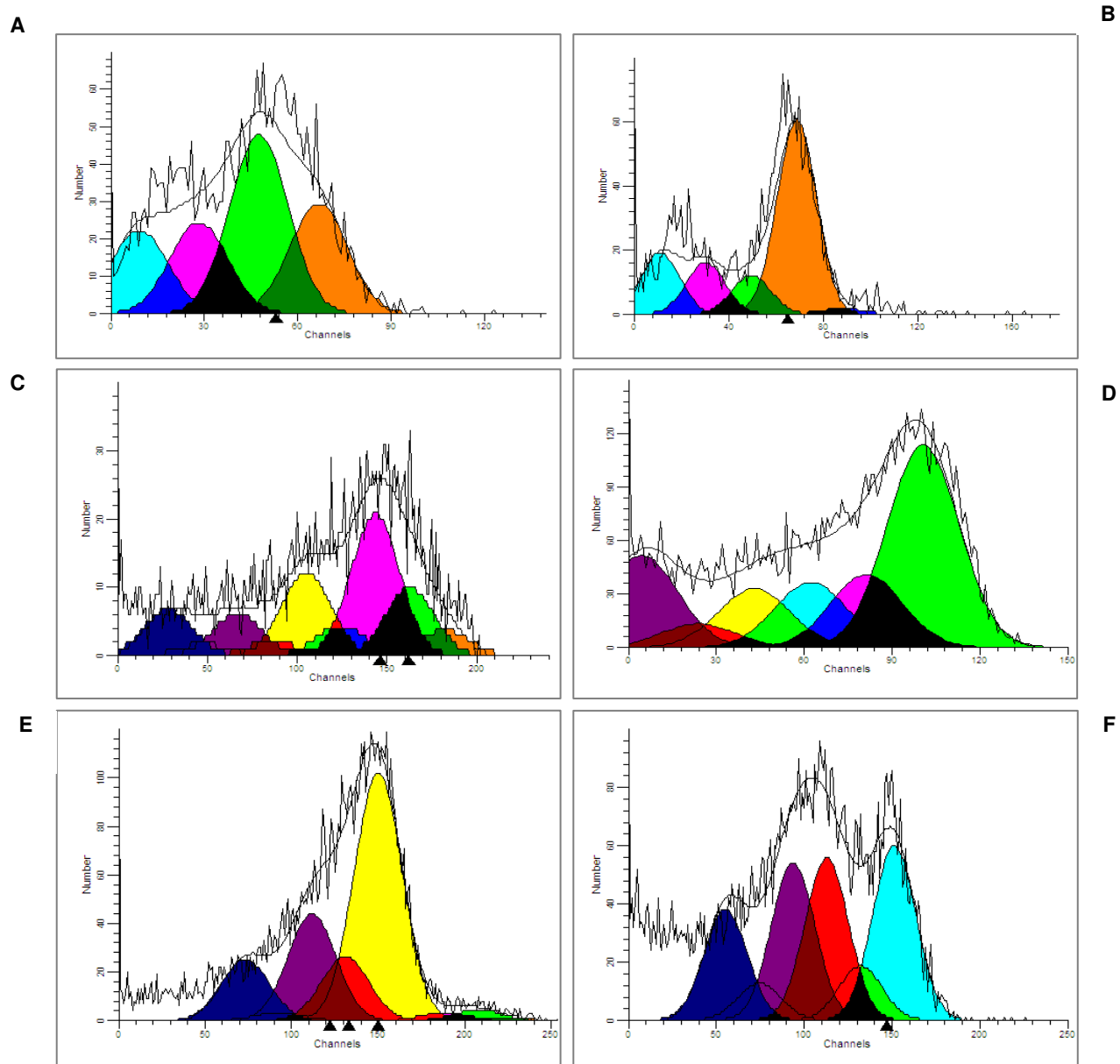


Figura 18 - Curva da distribuição do marcador CSFE em células do tumor dorsal melanoma B16F10 do histograma analisado pelo programa *Proliferation Wizard*

Tumores dorsais obtidos após a separação e cultivados de amostras de 5° (A e B), 15° (C e D) e 25° (E e F) dias após o crescimento tumoral dorsal.

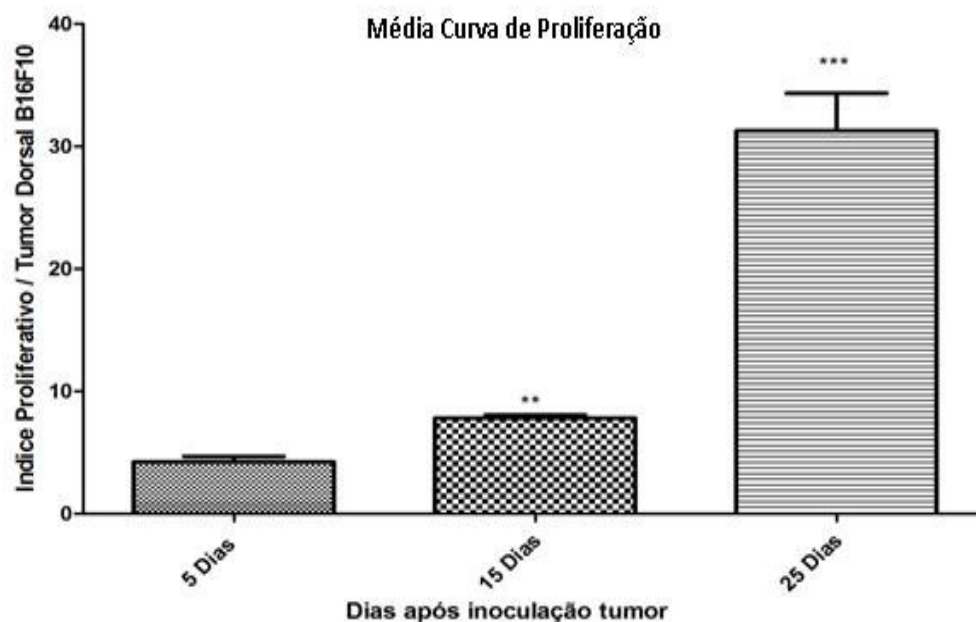


Figura 19 - Gráfico de barras representando a média e desvio padrão das diferentes índices proliferativos dos tumores dorsais após 5°, 15° e 25° dias de experimentação.

*** Diferenças significativas, Teste de Variância de ANOVA.

5.5 Análises histopatológicas e imunohistoquímicas das biópsias obtidas dos tumores dorsais de melanoma B16F10 implantado em camundongos C57BL/6J após 5°, 15° e 25° dias de experimentação.

Após 5° dias da implantação das células tumorais, os tumores apresentavam-se pequenos. Com volumes pequenos foram processados para as análises histológicas de rotina H/E e corados para imunohistoquímica para o marcador de proliferação Ki-67^{MIB}. A análise histopatológica do tumor revelou grande quantidade de células tumorais, presença de pigmento melânico, acastanhado no interior das células tumorais e distribuído, presenças de mitose foram detectadas e as análises do marcador Ki-67 foram positivas em todas as células encontradas nos nódulos ou nichos de crescimento tumoral, como destacado na figura 20 (A,B,C e D). Não foram detectados infiltrados inflamatórios mononucleares dignos de nota. Raras áreas de invasão local, de necrose e de ulceração foram observadas. As fotomicrográfas representam amostras de cada grupo experimental, saliento que todas as amostras obtidas neste projeto foram

analisadas e o processamento em programas de análise e morfometria ainda não foi concluído.

Após 15° dias da implantação das células tumorais, os tumores apresentavam-se com grande volume, alguns animais apresentaram ulceração e pequenas áreas de necrose. A análise histopatológica do tumor revelou grande quantidade de células tumorais, presença de pigmento melânico, acastanhados no interior das células tumorais e distribuídos, grande quantidade de mitose e vasos neoformados. A marcação para a detecção da capacidade proliferativa por imunohistoquímica com o marcador Ki-67 foram positivas em sua totalidade, destacam-se as áreas em necrose altamente positivas. Não foram detectados infiltrados inflamatórios mononucleares dignos de nota. Raras áreas de invasão local, áreas de necrose foram detectadas em maior extensão nos cortes analisados e de ulceração foram observadas na figura 20 (E,F, G e H).

As análises dos tumores obtidos dos animais de 25° dias de experimentação apresentavam-se com grande volume, ulceração e áreas de necrose. A análise histopatológica do tumor revelou grande quantidade de células tumorais, presença de pigmento melânico, acastanhado no interior das células tumorais e distribuído, grande quantidade de mitose, e vasos neoformados, como também a deposição de fibras que constituíram o estroma tumoral. A marcação para a detecção da capacidade proliferativa por imunohistoquímica com o marcador Ki-67 foram positivas em sua totalidade, destacam as áreas em necrose altamente positivas. Não foram detectados infiltrados inflamatórios mononucleares dignos de nota. As áreas de invasão local, áreas de necrose foram detectadas em maior extensão nos cortes analisados e de ulceração na figura 20 (I,J,L e M).

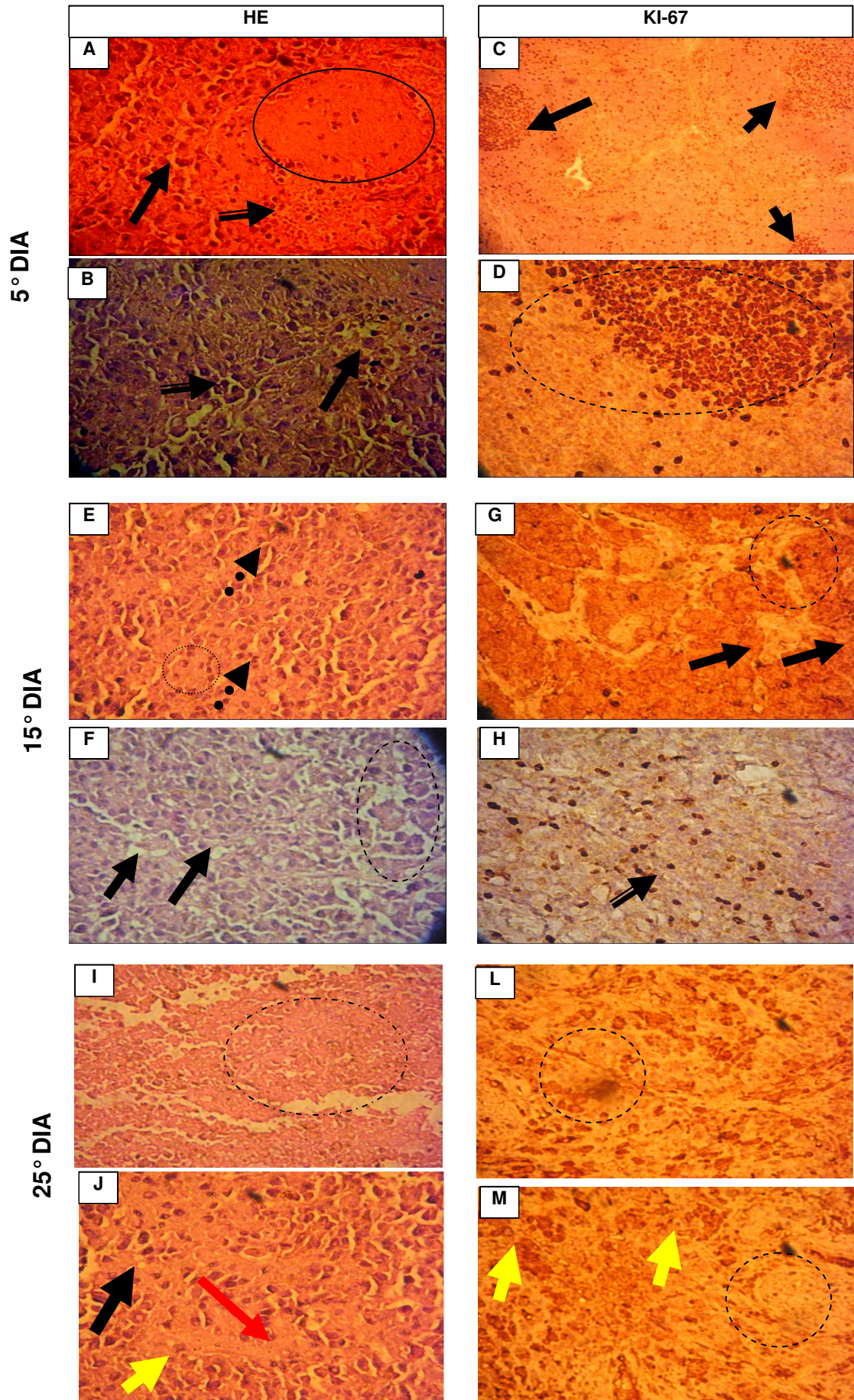


Figura 20 - Fotomicrografias representativas dos cortes histológicos dos tumores dorsais de melanoma B16f10 após 5°, 15° e 25° dias de crescimento em camundongos C57BL/6J.

A e B - Nota-se presença de células tumorais com pigmento melânico (setas), figuras de mitose (seta) e vasos sanguíneos e raro infiltrado inflamatório intratumoral (círculo). Aumento 400X, coloração H/E.

C e D - Nota-se expressão do marcador de proliferação celular nos nichos de células tumorais, destacadas nas setas e círculo. Aumentos 200X e 400X, coloração imunohistoquímica.

E e F - Nota-se presença de células tumorais com pigmento melânico (setas), figuras de mitose (seta) e grande quantidade de vasos sanguíneos e raro infiltrados inflamatórios intratumoral e áreas de necrose (círculo). Aumento 400X, coloração H/E.

G e H - Nota-se expressão do marcador de proliferação celular em todo o tecido tumoral, a quantidade de estroma é pequena e áreas de necrose mostraram fortemente marcadas (Círculo) nos nichos de células tumorais, destacadas nas setas e círculo. Aumentos 200X e 400X, coloração imunohistoquímica.

I e J - Nota-se presença de células tumorais com pigmento melânico (seta em preto), figuras de mitose (seta em vermelho) e grande quantidade de vasos sanguíneos e raro infiltrados inflamatórios intratumoral e grandes extensos de necrose e estroma tumoral (círculo e sete em amarelo). Aumentos 200X e 400X, coloração H/E.

L e M - Nota-se expressão do marcador de proliferação celular em todo o tecido tumoral, a quantidade de estroma em áreas de necrose mostraram fortemente marcadas (setas) nos nichos de células tumorais, destacadas nas setas e círculo. Aumentos 400X, coloração imunohistoquímica.

5.6 Análises do potencial elétrico da membrana mitocondrial das células de melanoma B16F10, utilizando a sonda Rodamina - 123 por citometria de fluxo.

A determinação do potencial elétrico interno da membrana mitocondrial foi realizada por citometria de fluxo utilizando como sonda a rodamina - Rho123, uma sonda lipofílica catiônica fluorescente que se distribui no compartimento mitocondrial, emitindo fluorescência verde, medida na região de 530 nm (canal de intensidade FL1), que é proporcional à quantidade absoluta de Rho123. Assim, a redução na fluorescência está relacionada com a despolarização, ou seja, a perda do potencial da membrana mitocondrial interna.

Os resultados das análises do potencial elétrico da membrana mitocondrial das células de melanoma B16F10, obtidas dos animais portadores de tumores dorsais nos períodos de 5°, 15° e 25° dias utilizando a sonda Rodamina - 123 por citometria de fluxo demonstraram dois tipos de populações celulares, a primeira apresentando baixo metabolismo,

denominada no programa de aquisição de M1 e a segunda apresentando alto metabolismo, denominada no programa de aquisição de M2.

A intensidade de fluorescência em M2 é uma característica de células tumorais sendo justificada por estas células apresentarem populações diferentes e com domínio de células com alto metabolismo. Os resultados dos diferentes períodos de análise demonstraram claramente o aumento da proporção de células tumorais com alto metabolismo.

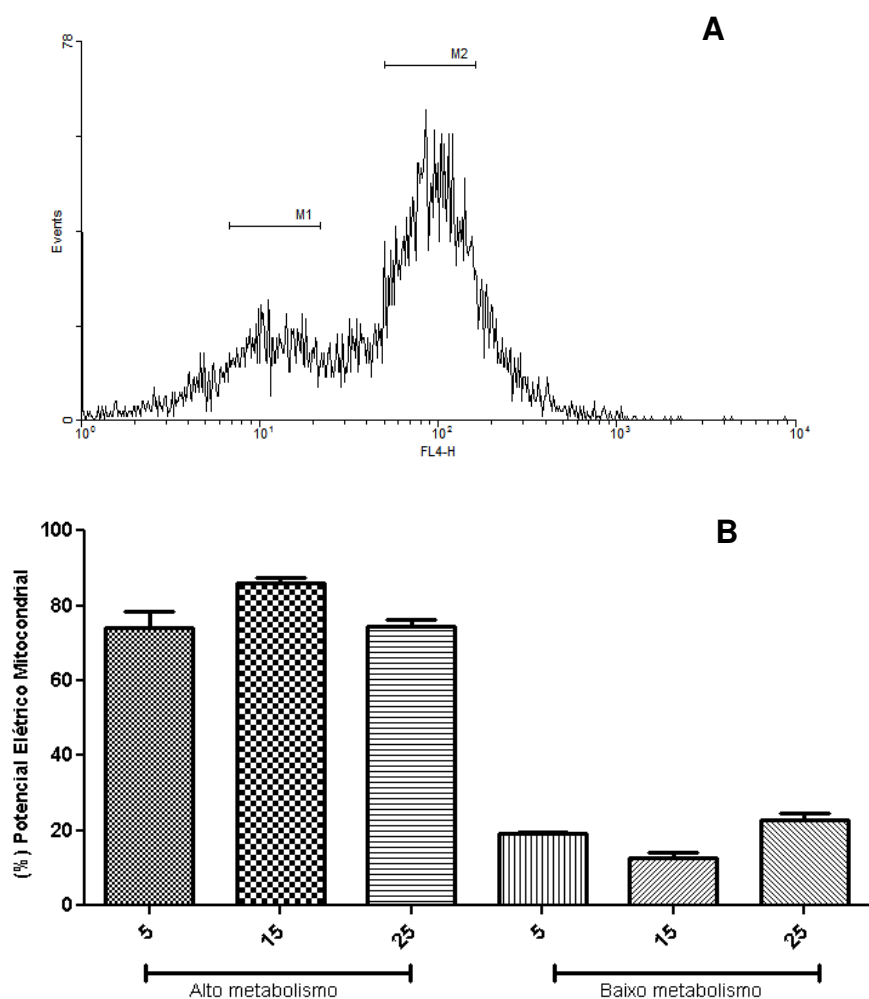


Figura 21 Histograma (A) e Gráfico de barra (B) representando a média e desvio padrão das populações celulares com baixo metabolismo (M1) e alto metabolismo (M2) do potencial elétrico mitocondrial adquirido por citometria de fluxo, nos diferentes períodos após a implantação das células tumorais 5°, 15° e 25° dias.

5.7 Análises da expressão de marcadores das vias de morte celular a caspase-3 fosforilada e de checagem do ciclo celular ciclina D1.

As ciclinas são importantes mediadores da atividade das cdk's e seus níveis são variáveis durante o ciclo celular. As ciclinas estão divididas em três classes específicas: ciclinas G1-S, ciclinas S e ciclinas M. O nível de ciclina é regulado pela expressão gênica e degradação proteica. A ciclina D1 é uma das proteínas envolvidas na transição celular da fase do ciclo de G1 (repouso), para a fase S (síntese) tanto em células normais como em células neoplásicas. A superexpressão da proteína ciclina D1, como resultado de ativação do gene, remove a regulação normal do ciclo celular causando proliferação celular descontrolada e transformação para um fenótipo neoplásico.

Os resultados obtidos mostraram aumento significativo e gradual na expressão da ciclina D-1 nos períodos de 15° e 25° dias, fase exponencial do crescimento tumoral. Os resultados estão apresentados na Figura 22.

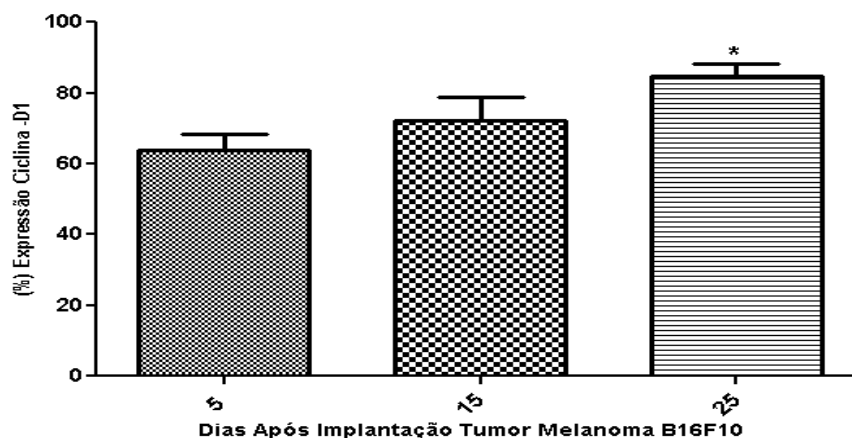


Figura 22 - Gráfico de barras representando a média e desvio padrão da expressão do marcador de checagem do ciclo celular, ciclina D-1 em células tumorais obtidas dos tumores dorsais após 5°, 15° e 25° dias da implantação dorsal em camundongos C57BL/6J. .

*Diferenças significativas entre os grupos. Teste de variância de ANOVA

Marcadores de morte celular programada, tais como a cisteína protease 32, conhecida como caspase-3, responsável pela clivagem proteolítica de várias proteínas. A ativação sequencial das caspases desempenha um papel central na fase de execução da apoptose celular. As caspases existem como pró-enzimas inativas que depois sofrem um processamento proteolítico em resíduos de aspartato, para produzirem duas subunidades, uma pequena e outra grande, que dimerizam para formar a enzima ativa.

Os resultados mostraram diminuição significativa na expressão da caspase -3 fosforilada após o 25º dia de implantação, fase exponencial final do crescimento tumoral, onde foi observado aumento das áreas macroscópicas de necrose e nos experimentos para a determinação das fases do ciclo celular, aumento da fração de células com DNA fragmentado. Os resultados estão apresentados na Figura 23 .

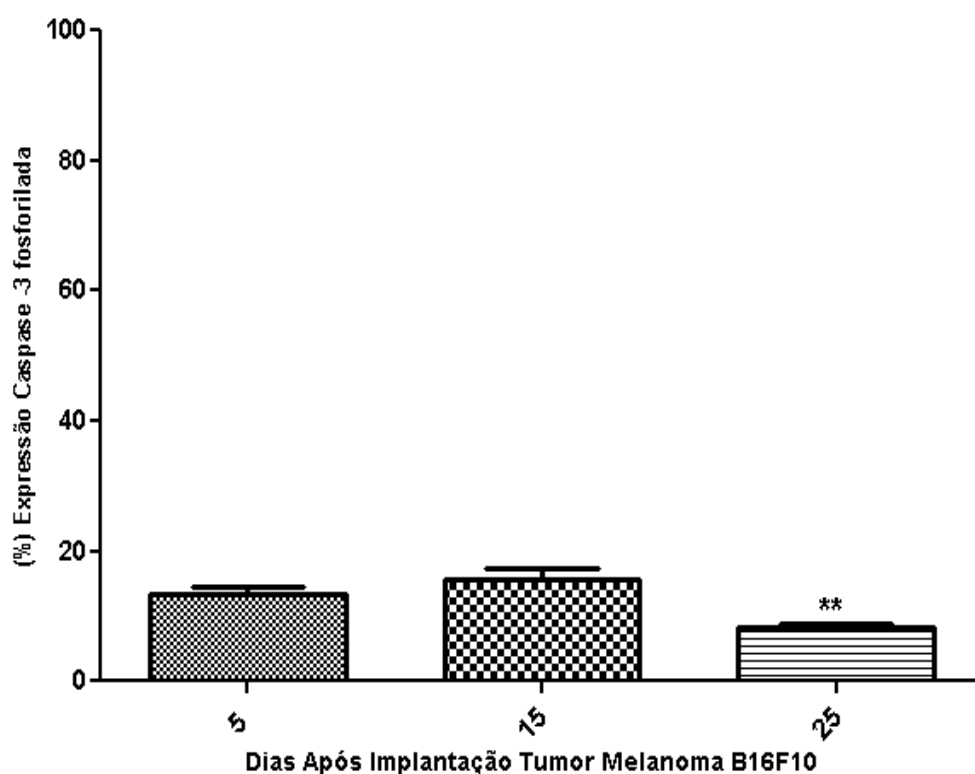


Figura 23- Gráfico de barras representando a média e desvio padrão da expressão do marcador de morte celular programada, caspase-3 fosforilada efetora, em células tumorais obtidas dos tumores dorsais após 5º, 15º e 25º dias da implantação dorsal em camundongos C57BL/6J.

**Diferenças significativas entre os grupos. Teste de variância de ANOVA.

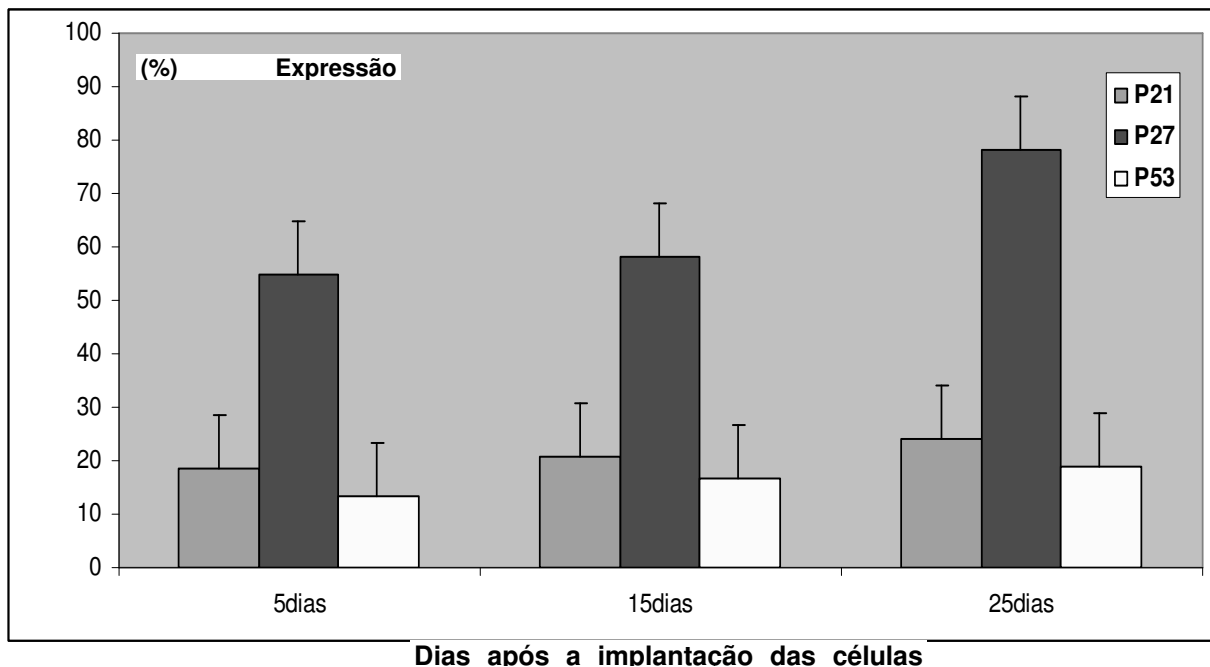


Figura 24- Gráfico de barras representando as médias \pm dp da expressão dos marcadores da progressão do ciclo celular no melanoma B16F10 após 5°, 15° e 25° dias do crescimento dorsal.

** Diferenças estatísticas – Teste de Variância de ANOVA

5.8 Análises da expressão dos receptores CD34 e VEGF-R1 por citometria de fluxo dos tumores dorsais de melanoma B16F10 implantado em camundongos C57BL/6J após 5°, 15° e 25° dias de experimentação.

O antígeno CD 34 é uma glicoproteína transmembrana que está expresso em células endoteliais, nos fibroblastos embrionários e em algumas células do tecido nervoso fetal e adulto. As células que expressam o antígeno CD34 são denominadas CD 34 positivas (CD34+) e foram identificadas por citometria de fluxo, utilizando-se o anticorpo monoclonal – anti-CD 34.

As análises da expressão do marcador CD34 mostraram aumentos significativos nos tumores dos períodos de 15° e 25° dias de experimentação; entretanto, não há diferenças entre a progressão de crescimento (Figura 16 e Tabela 1).

Outro marcador estudado neste projeto foi o VEGF-R1. O VEGFR-1 localiza-se na superfície de células hematopoiéticas do tecido, macrófagos e monócitos, bem como endotélio vascular. Os VEGFRs são receptores do tipo tirosina-quinase ativados através de dimerização induzida por ligantes, envolvidos no controle da formação de vasos sanguíneos e linfáticos. A expressão do receptor R1 para o VEGF dos tumores de melanoma B16f10 mostrou aumento significativo de expressão ao longo do crescimento tumoral (Tabela 4).

Tabela 4 – Porcentagem de expressão dos marcadores CD34 e VEGF-R, expresso em média \pm dp em células obtidas do tumor dorsal de melanoma B16F10 implantado em camundongos C57BL/6J após 5°, 15° e 25° dias de experimentação

Tumor Dorsal Melanoma B16F10	Marcador CD34 (n=05)	Marcador VEGF-R1 (n=05)
Tumor 5° dias após a implantação	42.4 \pm 9.7	61.7 \pm 18.7
Tumor 15° dias após a implantação	70.7 \pm 15.2*	82.6 \pm 21.3*
Tumor 25° dias após a implantação	78.4 \pm 23.2*	91.5 \pm 28.2***
*Diferenças significativas		

5.9 Aquisições de espectros por RMN de ^1H

Os espectros de aquisições por RMN de ^1H em ambos os pulsos de pré-saturação e excitação conseguiram esculpir uma supressão quase completa da água e com uma base muito plana, como pode ser visto nos espectros em c e d apresentados na Figura 25. No entanto, resultou em uma

perda significativa do sinal, especialmente nas regiões de concentração lipídica (entre 1 a 3 ppm) quando comparados aos espectros adquiridos sem a utilização de supressão de água, os espectros a e b apresentados na Figura 25.

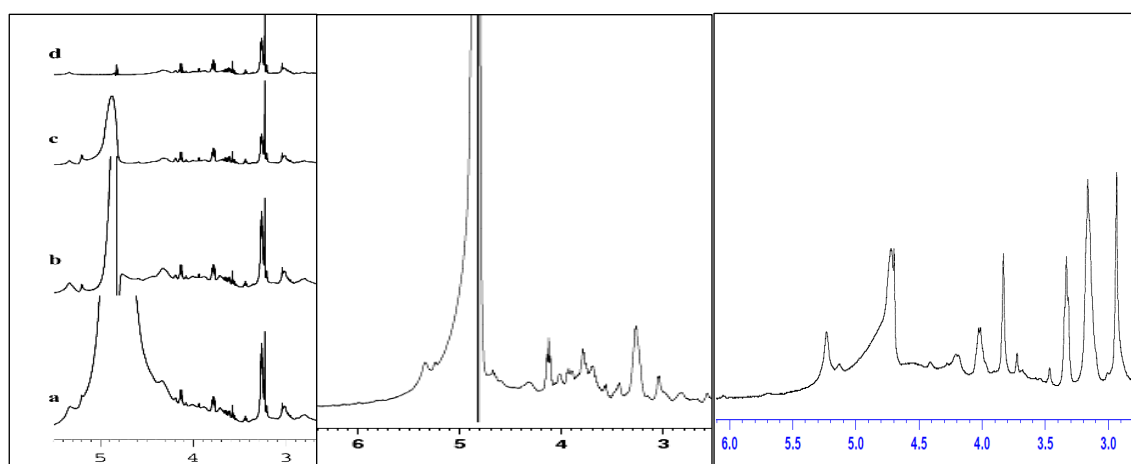


Figura 25 - Espectro utilizado na sequência de pulso 1D ZGPR com excitação e supressão de água (região 4.7 ppm) de células de melanoma B16F10.

Este espectro foi adquirido através de um pulso de 90. Na figura A, todos os espectros são da mesma escala. As figuras B e C demonstram a relação do sinal da água sem e com saturação, respectivamente

As amostras de cultura celular, além de apresentarem altas concentrações de H_2O também possuem uma concentração significativa do crioprotetor DMSO. Para reduzir os sinais do DMSO, nas análises espectrais, foi utilizada uma sequência de dupla saturação, denominada de ZGF2PR. Espectros apresentados na Figura 26.

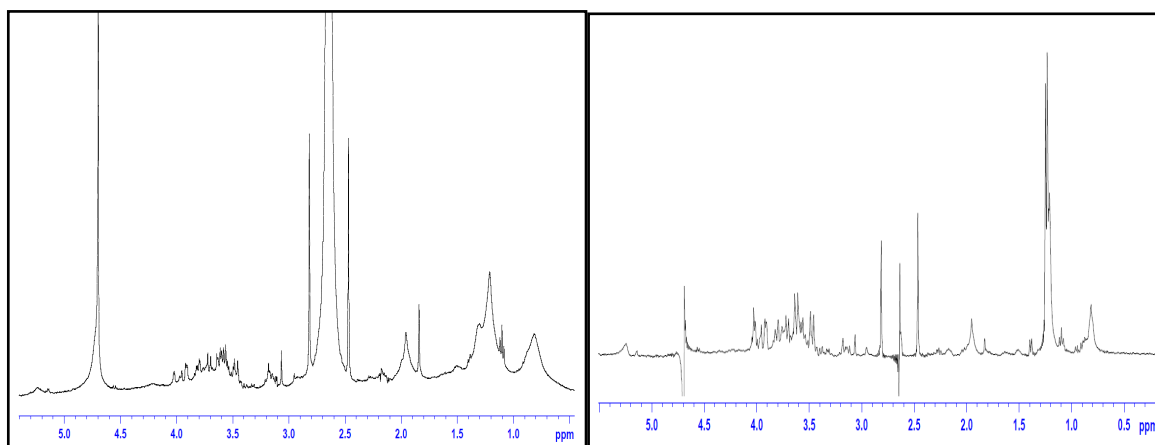


Figura 26 - Espectro utilizado na sequência de pulso 1D ZGF2PR com excitação e supressão de água (4,7ppm) de células de melanoma B16F10 e supressão seletiva do crioprotetor DMSO (2,6ppm)

As amostras celulares e os tecidos tumorais apresentam altos sinais provenientes de moléculas de alta massa molecular, tais como os componentes das membranas da parede celular. Devido ao fato destes componentes serem rígidos, ou seja, apresentarem baixa mobilidade molecular, também possuem T2 curtos, ocasionando o alargamento dos seus sinais, que por sua vez causa a sobreposição de outros sinais, como o das moléculas de baixa massa molecular, dificultando a interpretação dos dados. Então, para minimizar estes sinais foi utilizada uma sequência específica que filtra os sinais T2 curtos, a sequência CPMG.

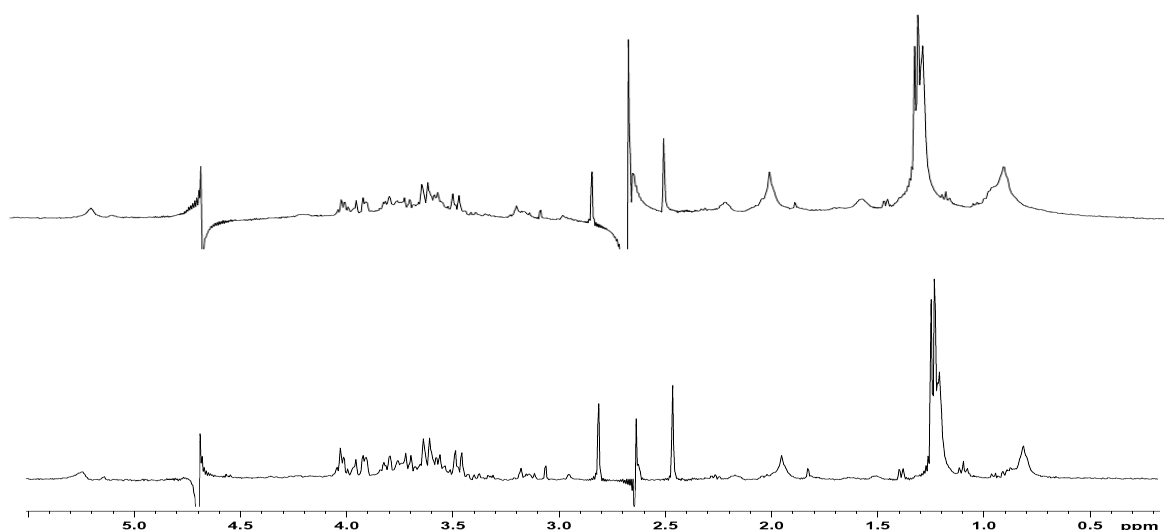


Figura 27 - Comparação entre espectros de RMN de ^1H de amostras de cultura celular de melanoma B16F10 adquiridos com a sequência ZGF2PR (Superior) e CPMG (Inferior).

A sequência CPMG reduz os sinais alargados referentes às macromoléculas devido à perda de coerência dos vetores magnetização destas no plano xy. O espectro é caracterizado com linhas de base e picos mais definidos. E, ainda, observa-se um melhoramento das regiões saturadas 4.7 e 2.6 ppm.

5.10. Análise e identificação dos espectros de amostras de células e tecidos de tumores de melanoma murino B16F10 por RMN de ^1H .

Após realizar as culturas celulares, as células foram armazenadas e transportadas em nitrogênio líquido ao Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Instituto de Química da Unicamp (Prof^o Responsável Alviclér Magalhães). Após o descongelamento, as células foram centrifugadas a 2000 rpm durante 10 minutos e foi retirado o sobrenadante composto principalmente de SFB + DMSO. As células foram lavadas com água deuterada e novamente centrifugadas. Após a segunda centrifugação e retirado o sobrenadante, as células foram colocadas em um rotor de 12 μL levadas a sonda HRMAS e inicializado as leituras espectrais. Todos os experimentos foram padronizados preconizando o cuidado na preparação das amostras e a calibração dos equipamentos.

Foram utilizadas sequências 1D de dupla saturação, filtro T2 e realizados espectros de ^1H . Após a aquisição dos espectros, os dados foram processados no programa TopSpin[®] e iniciada a identificação e caracterização dos sinais utilizando também o programa LC Model e dados existentes em bancos de dados relacionados com projetos em metaboloma e na literatura. Na Figura 28, observa-se espectro 1D de ^1H adquirido com a sonda HRMAS (4000 rpm, 293K e tempo de aquisição de ± 20 min). O espectro das amostras de cultura celular de melanoma B16F10 (Figura 28) demonstra o ajuste da sequência de aquisição CPMG, iniciando por um pulso de pré-saturação da água (escala 4,7 ppm) e do DMSO (escala 2,6 ppm), seguido de pulsos de excitação e otimização para reajuste de potencial e ganho definindo os picos. Os picos em estudos são os que absorvem na escala, em ppm, 1.0 ao 7.0 ppm. No espectro foram observados altos níveis de ácidos graxos (0 a 2,5 ppm) e de aspartato/asparagina (2,83ppm). E na faixa da escala de 2,75 – 4,5ppm observa-se grande concentração de metabólitos.

Os animais foram avaliados levando-se em consideração a evolução tumoral. A partir do 5^o dia e sucessivamente nos dias 15^o e 25^o dias pós-implante, os animais foram submetidos à eutanásia por deslocamento

cervical. Em seguida, os tumores e tecidos contralaterais da derme foram retirados por biópsias com instrumento cirúrgico dermatológico, PUNCH de 0,2 mm de diâmetro, armazenados imediatamente e transportados em nitrogênio líquido para serem avaliados por espectroscopia de RMN.

Para a discriminação entre tecido neoplásico e tecido normal adjacente, foram investigadas as variações entre as amostras e a observação direta dos espectros. Foram utilizadas sequências 1D de saturação, filtro T2 e realizados espectros de ^1H . Após a aquisição dos espectros, os dados foram processados no programa TopSpin[®] e iniciada a identificação e caracterização dos sinais.

Os espectros adquiridos de biópsias e de tecidos colaterais do 5º dia pós-implante (Figura 29 e 30, respectivamente), em comparação, evidenciaram altos níveis de ácidos graxos + lactato (0 a 2,5 ppm) e alto nível de α – glicose (5,23ppm) caracterizando um aumento no metabolismo celular observado nos espectros das biópsias de tumores melanoma B16F10. Outros metabólitos evidenciados como colina, lisina, serina, fenilalanina estão correlacionados com a atividade tumoral.

Os espectros adquiridos de biópsias e de tecidos colaterais do 15º dia pós-implante (figuras 29 e 30, respectivamente), em comparação, evidenciou altos níveis de ácidos graxos + lactato (0 a 2,5 ppm) e um alto nível de colina (2,94ppm), que, de acordo com a literatura, estão relacionados com perfis bioquímicos tumorais. Em relação ao espectro do 5º dia pós-implante, há uma redução dos níveis de α – glicose (5,23ppm), sugerindo uma mudança do metabolismo frente ao microambiente. Outros metabólitos evidenciados como colina, prolina lisina, serina, fenilalanina estão correlacionados com atividade e progressão celular.

O espectro adquirido de biópsias do 25º dia pós-implante (figura 31) evidenciou uma normalização dos níveis de ácidos graxos + lactato (0 a 2,5 ppm) comparado com os períodos 5º e 15º dia pós-implante. Observa-se também um aumento significativo dos níveis de prolina e fenilalanina (2,06 - 3,12ppm).

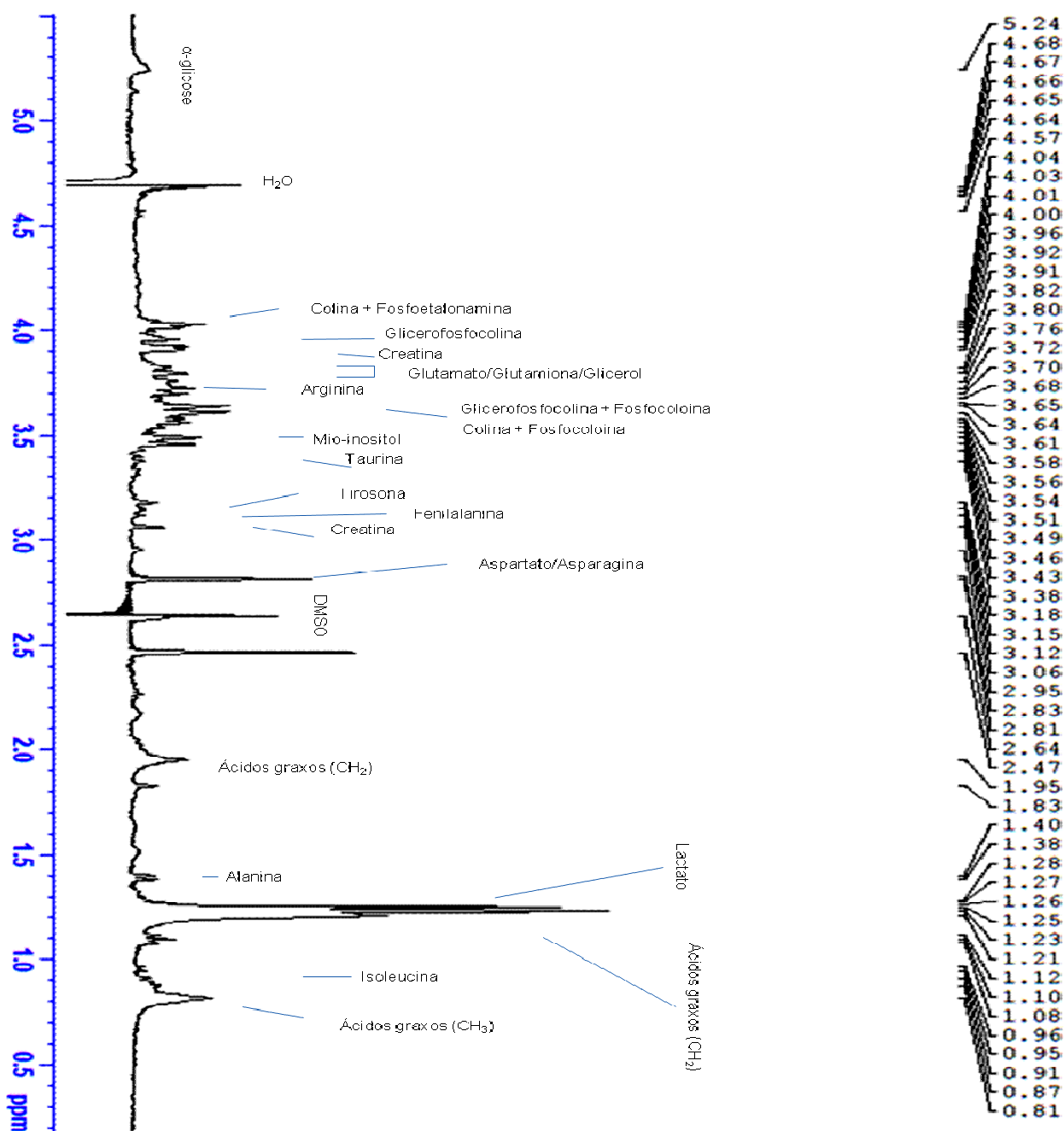


Figura 28 - Espectros 1D de ^1H por método de aquisição CPMG de amostras de células linhagem melanoma B16F10 em RMN-HRMAS-400Hz.

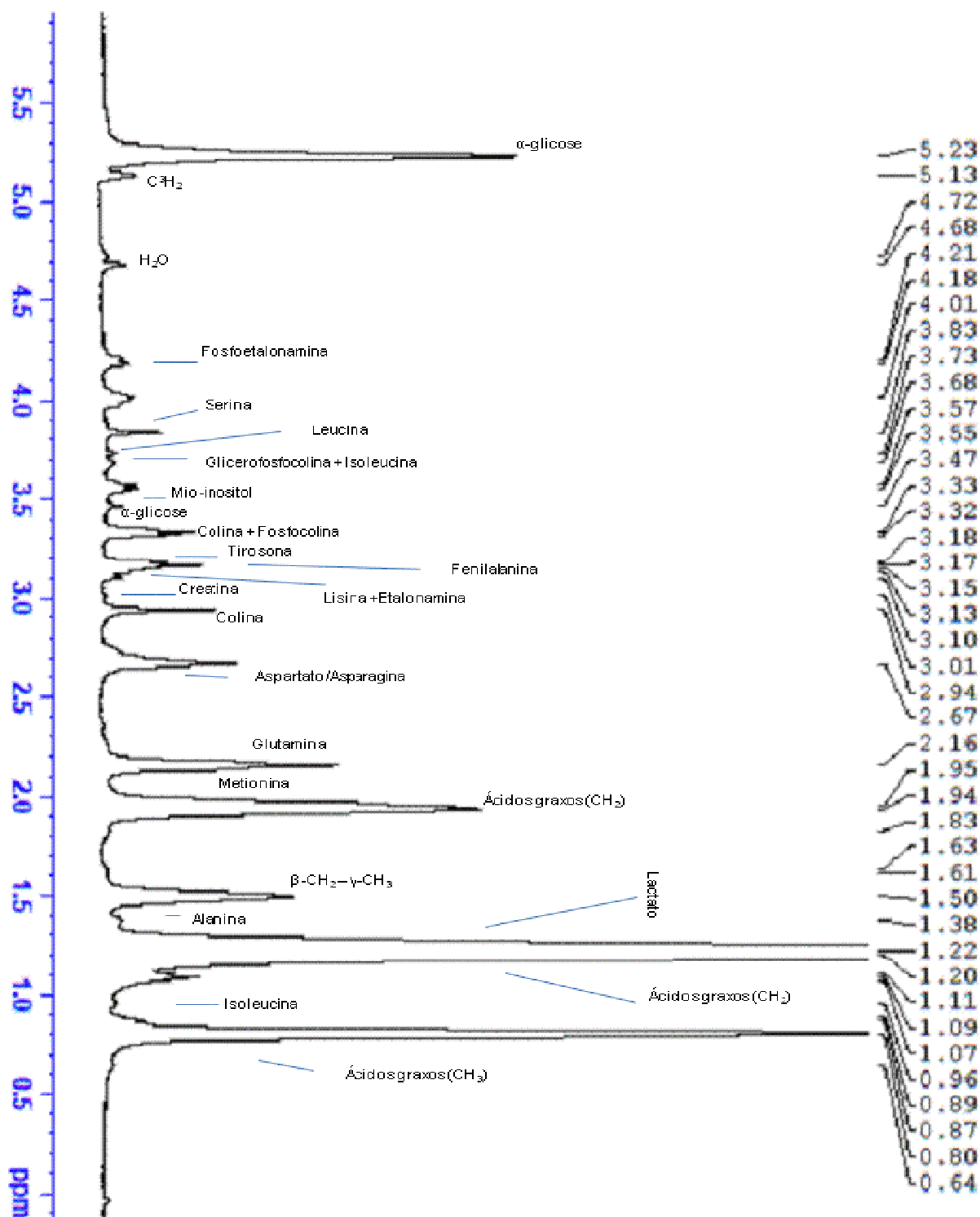


Figura 29 - Espectros 1D de ¹H por método de aquisição CPMG de amostras de biópsias de melanoma B16F10 em RMN-HRMAS-400Hz do 5º dia pós-implante.

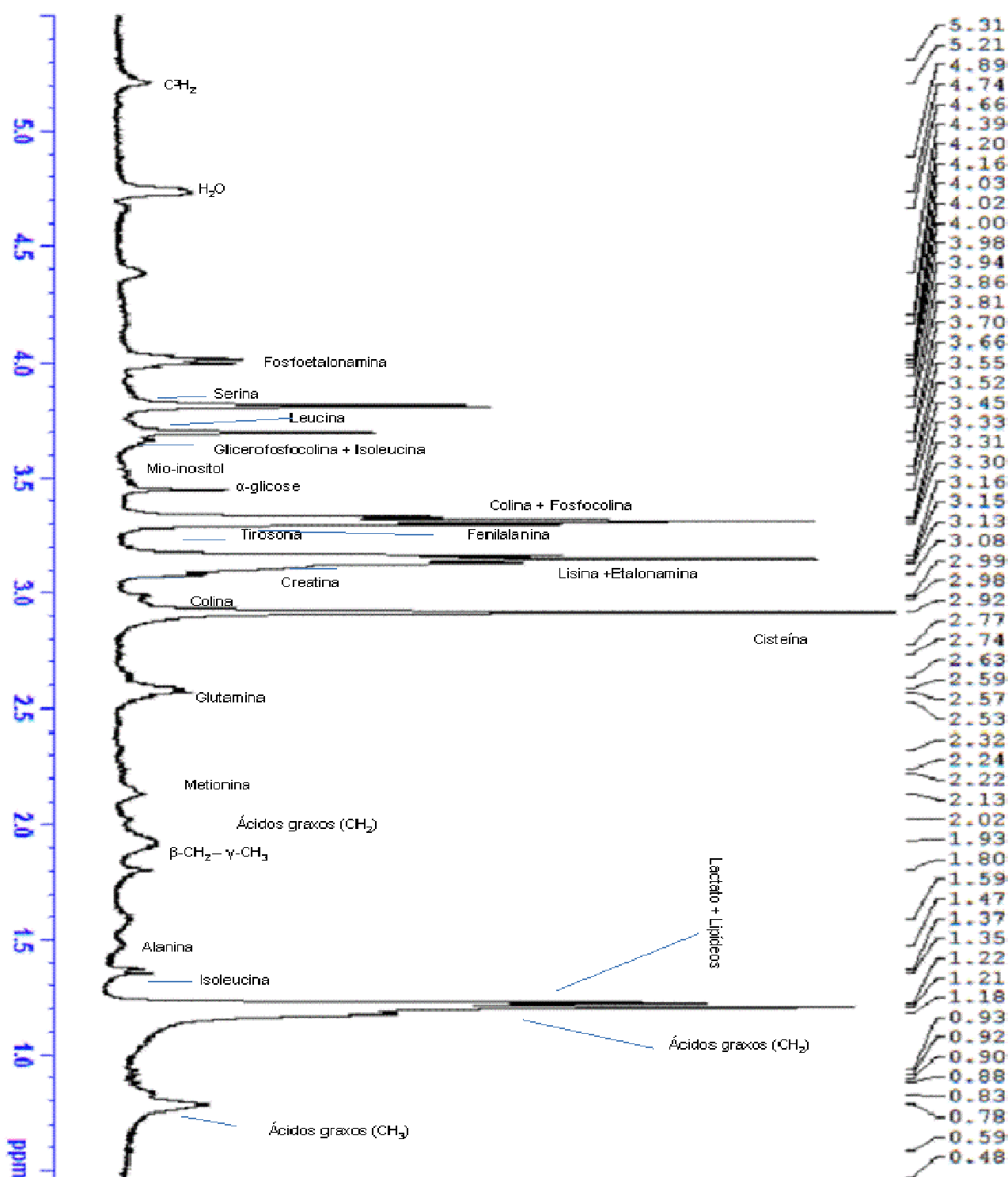


Figura 30 - Espectros 1D de ^1H por método de aquisição CPMG de amostras de biópsias do tecido colateral de animais portadores de melanoma B16F10 em RMN-HRMAS-400Hz do 5º dia pós-implante.

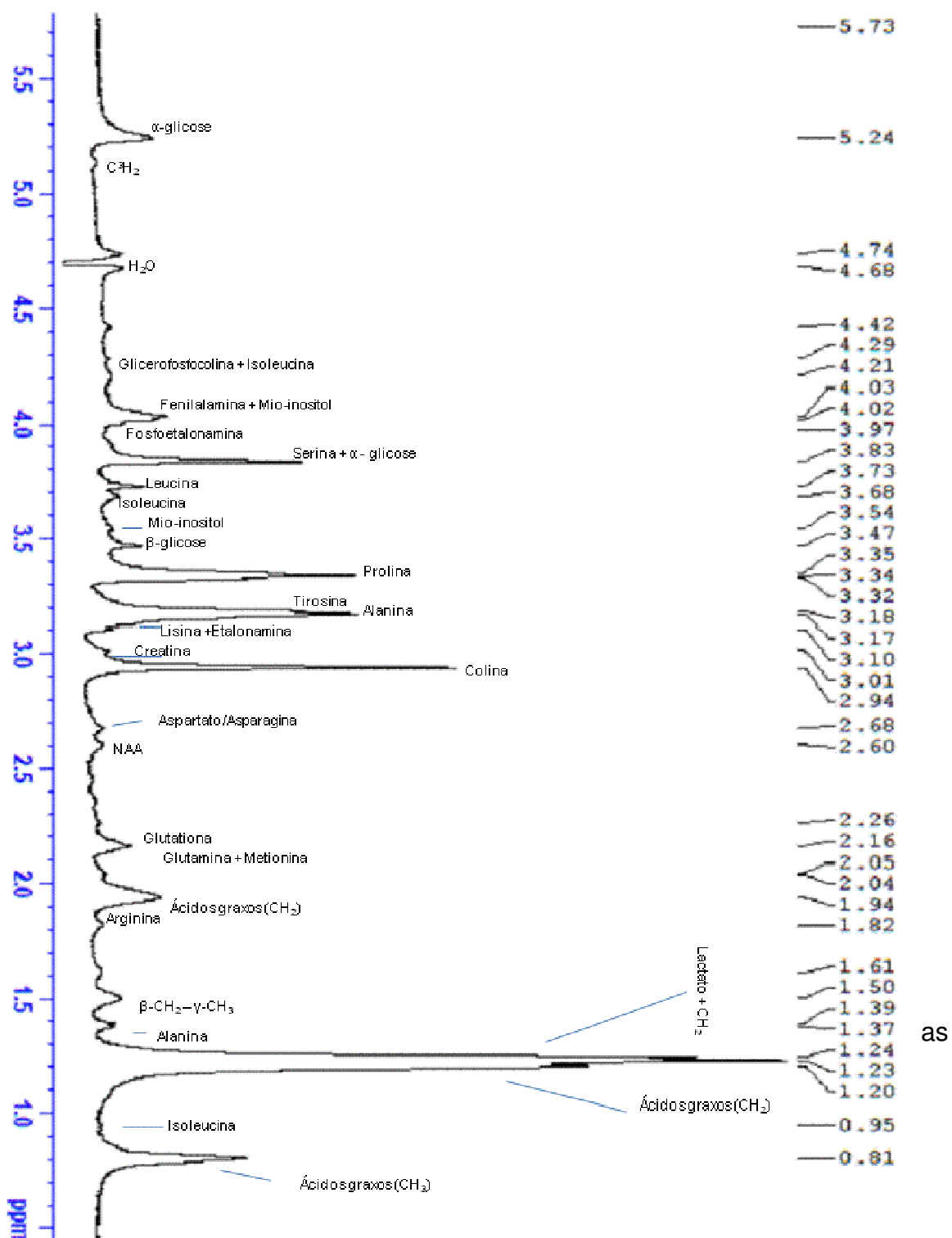


Figura 31 - Espectros 1D de ^1H por método de aquisição CPMG de amostras de biópsias de melanoma B16F10 em RMN-HRMAS-400Hz do 15º dia pós-implante.

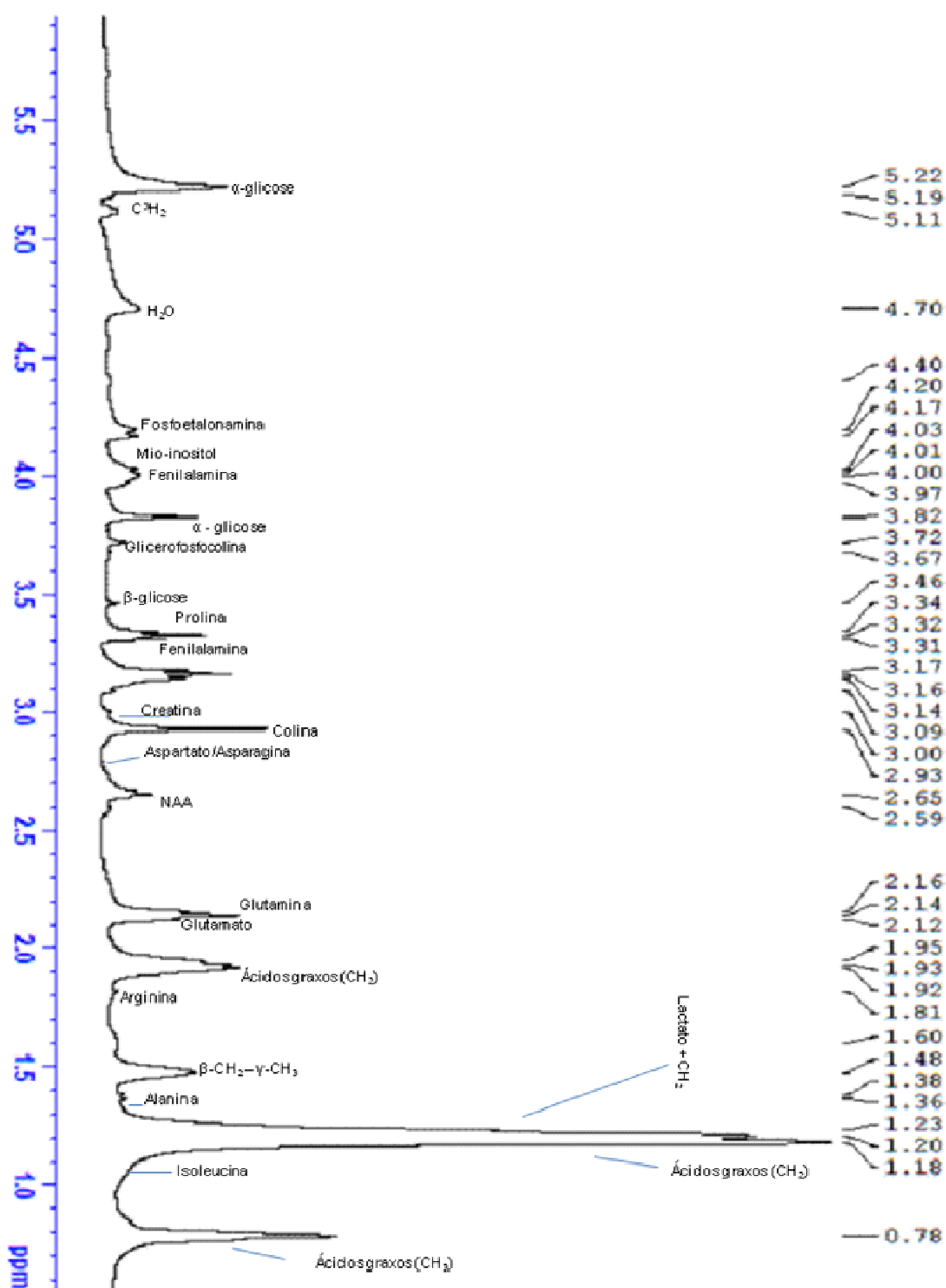


Figura 32 - Espectros 1D de ^1H por método de aquisição CPMG de amostras de biópsias do tecido colateral de animais portadores de melanoma B16F10 em RMN-HRMAS-400Hz do 15^o dia pós-implante.

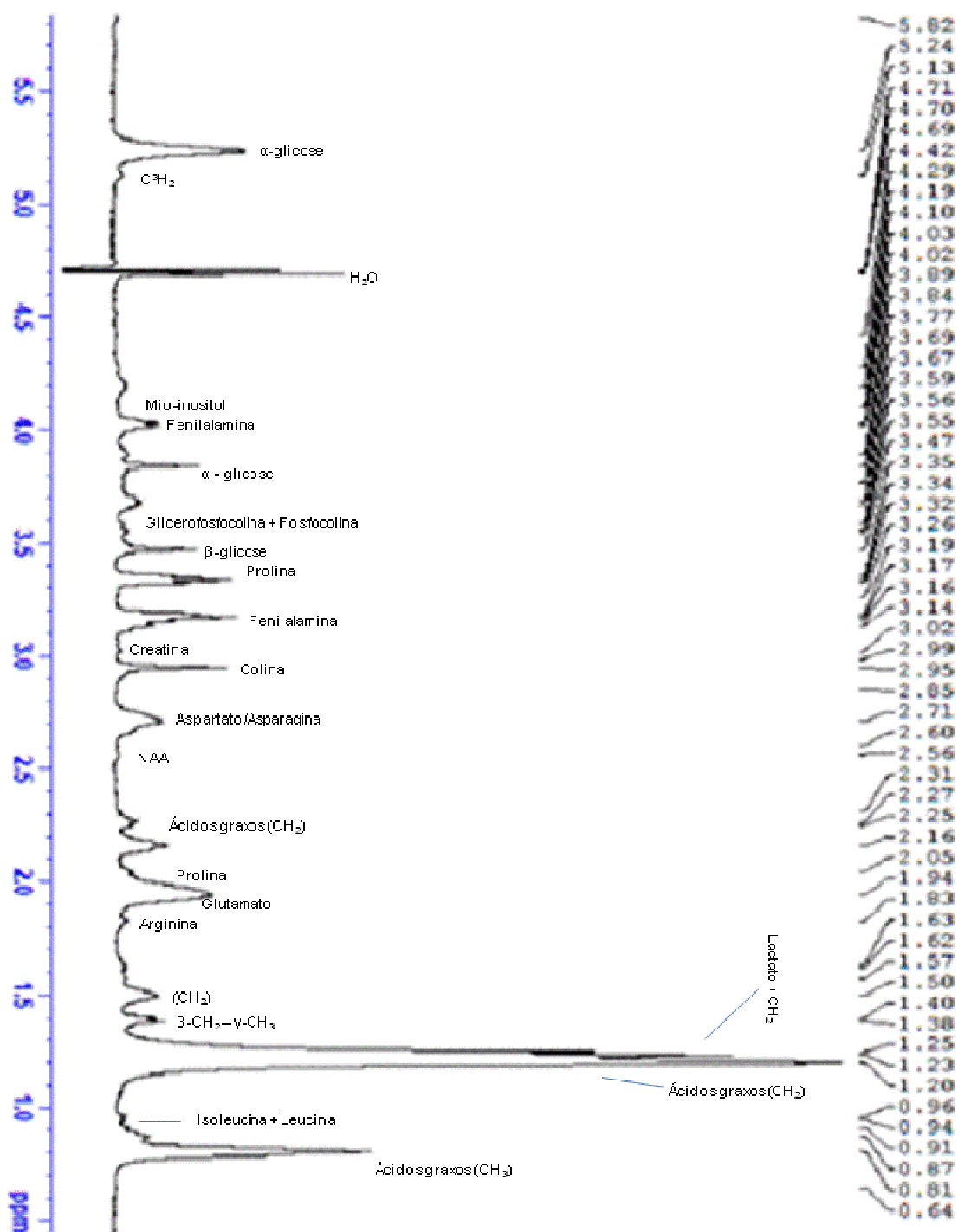


Figura 33 - Espectros 1D de ¹H por método de aquisição CPMG de amostras de biópsias de melanoma B16F10 em RMN-HRMAS-400Hz do 25° pós-implante.

Após aquisição dos espectros 1D de ^1H das amostras de biópsias de melanoma B16F10, foi realizado um estudo comparativo dos períodos (5°, 15° e 25°) de pós-implante tumoral utilizando o software Top spin. As figuras 34-38 demonstram a comparação dos níveis de concentração de metabólitos específicos expressos nos espectros 1D ^1H RMN.

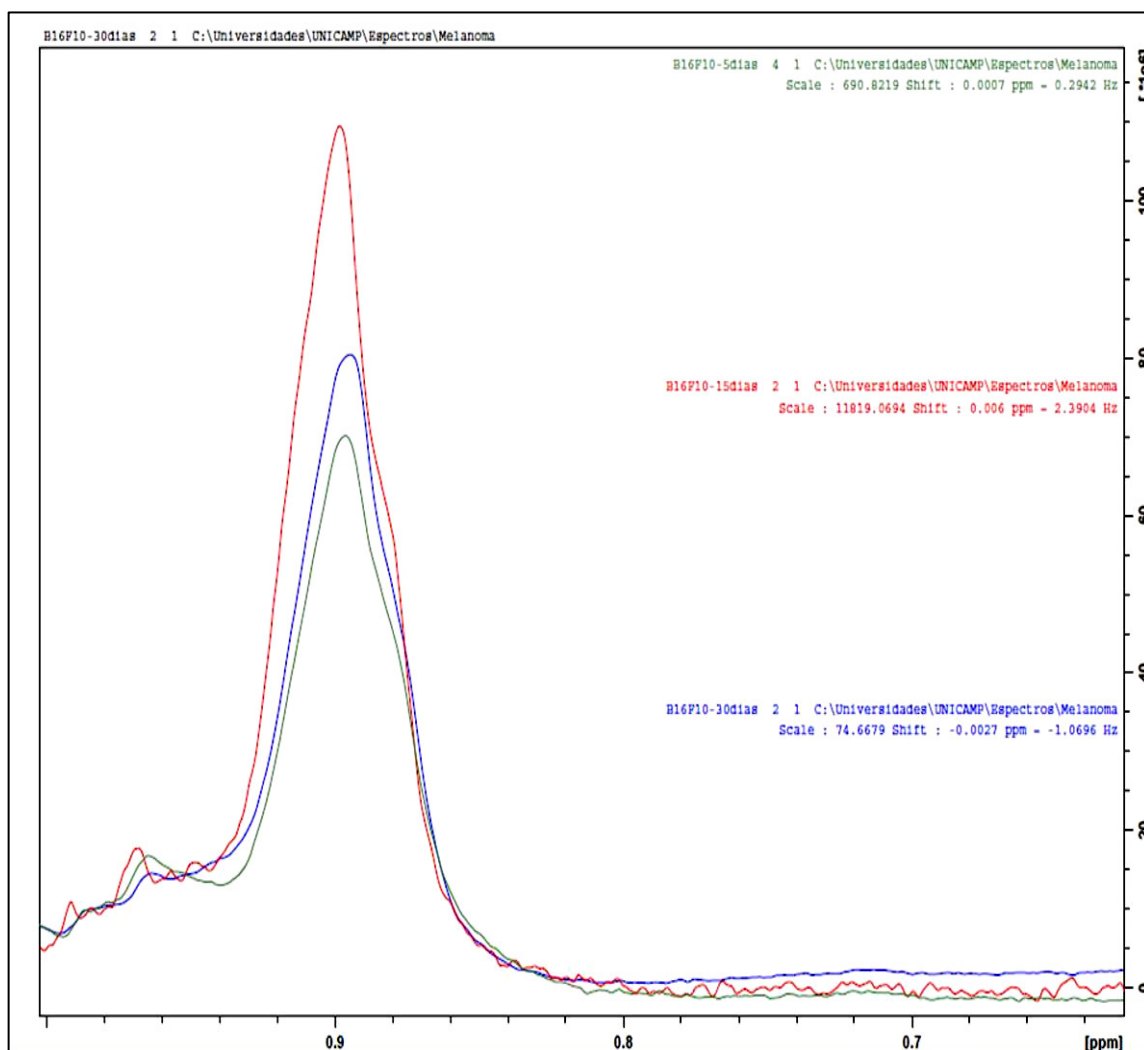


Figura 34 - Análise espectral H 1D RMN demonstrando a carga lipídica (CH_2 e CH_3) em comparação com diferentes tempos da implantação tumoral 5° dia (verde), 15° dia (vermelho) e 25°- 30° dia (azul).

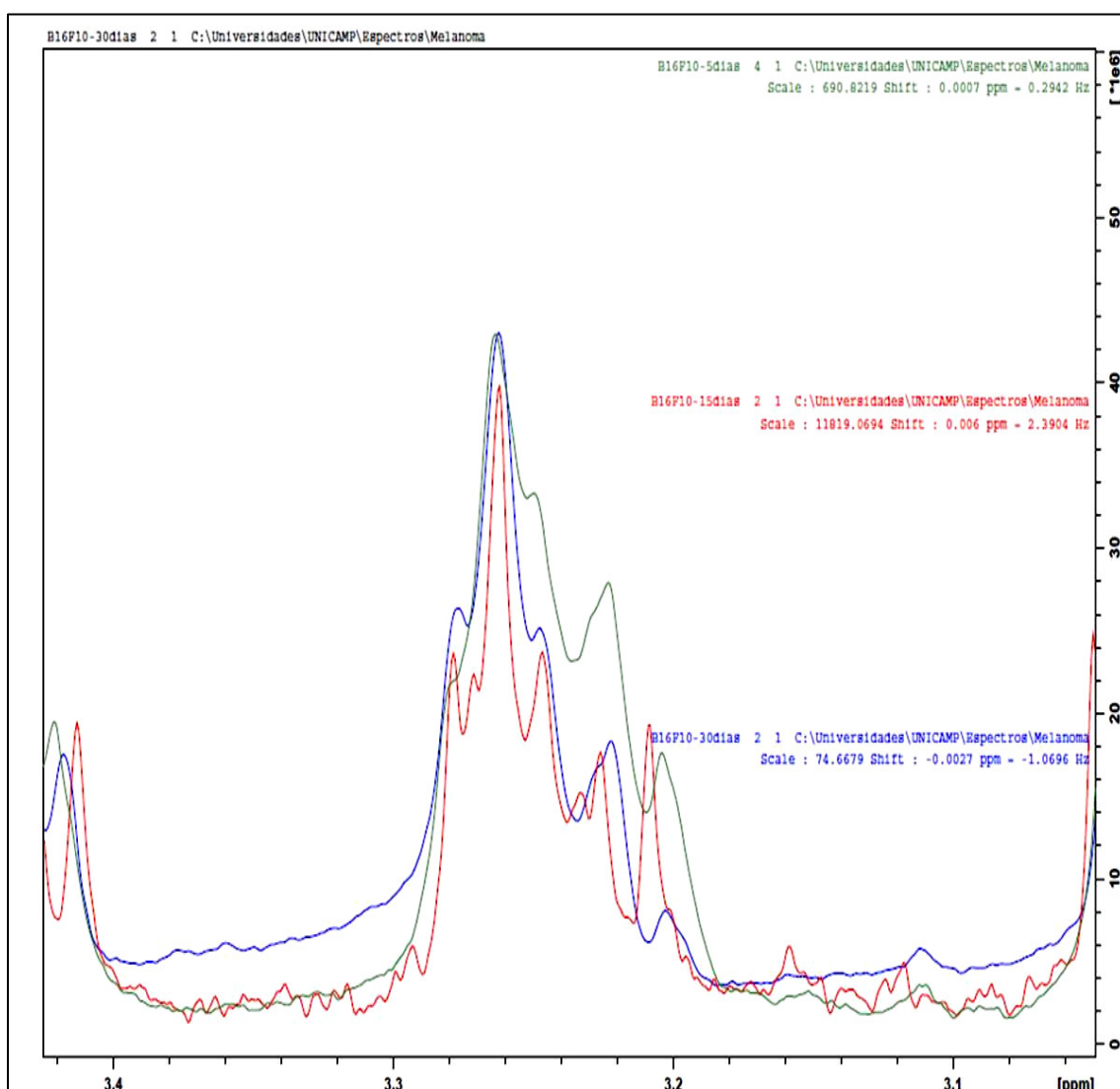


Figura 35 - Análise espectral H 1D RMN demonstrando a presença dos metabólitos fosfolípidios (Cho, PCho e GPCho) e o poliálcool cíclico Mio-Inositol em comparação com diferentes tempos da implantação tumoral 5° dia (verde), 15° dia (vermelho) e 25° - 30° dia (azul).

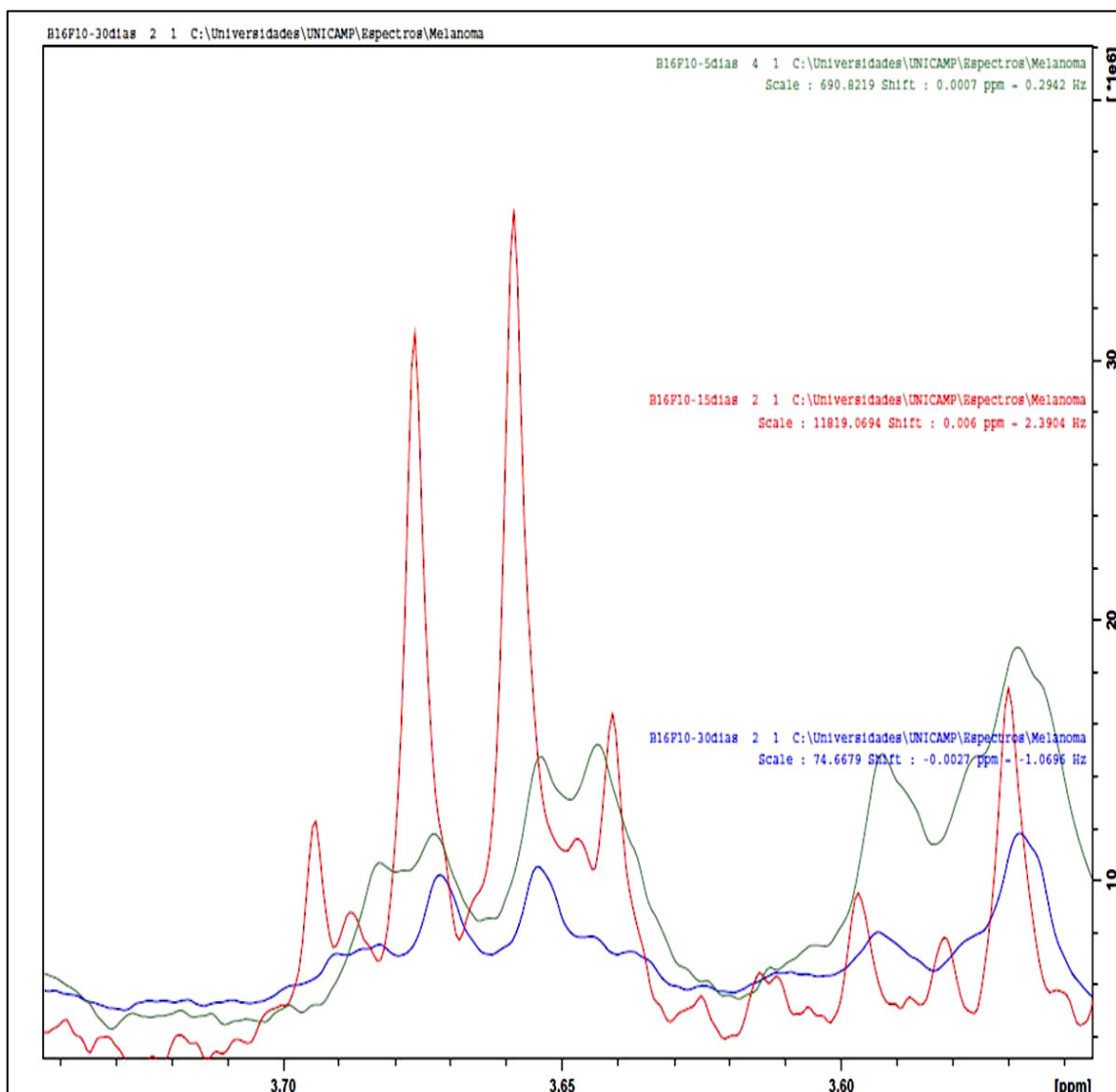


Figura 36 – Análise espectral H 1D RMN demonstrando a carga do metabólito Mio-Inositol em comparação com diferentes tempos da implantação tumoral 5^o dia (verde), 15^o dia (vermelho) e 25^o - 30^o dia (azul).

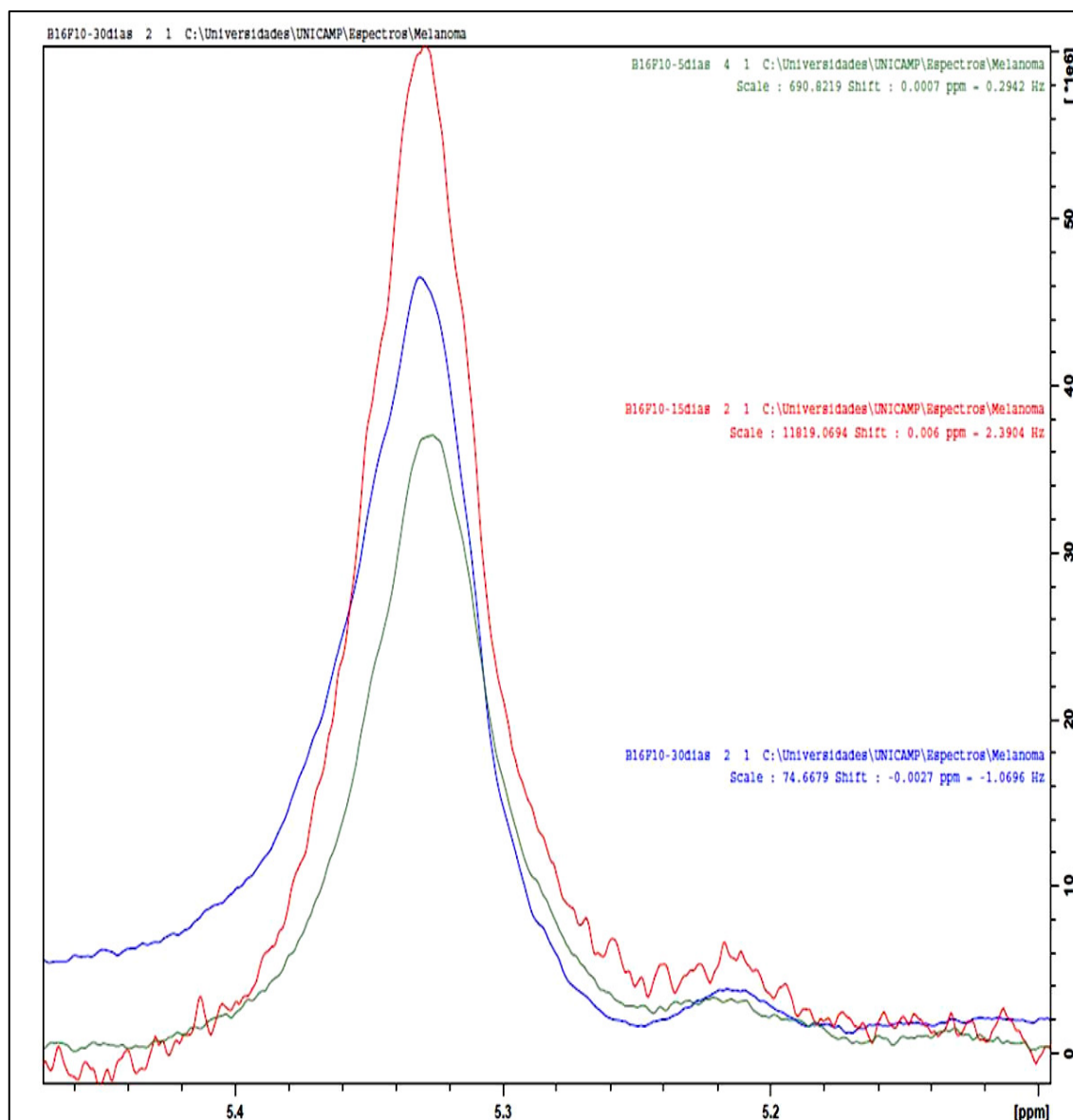


Figura 37– Análise espectral H 1D RMN demonstrando a carga lipídica (Glicerol) em comparação com diferentes tempos da implantação tumoral 5° dia (verde), 15° dia (vermelho) e 25° - 30° dia (azul).

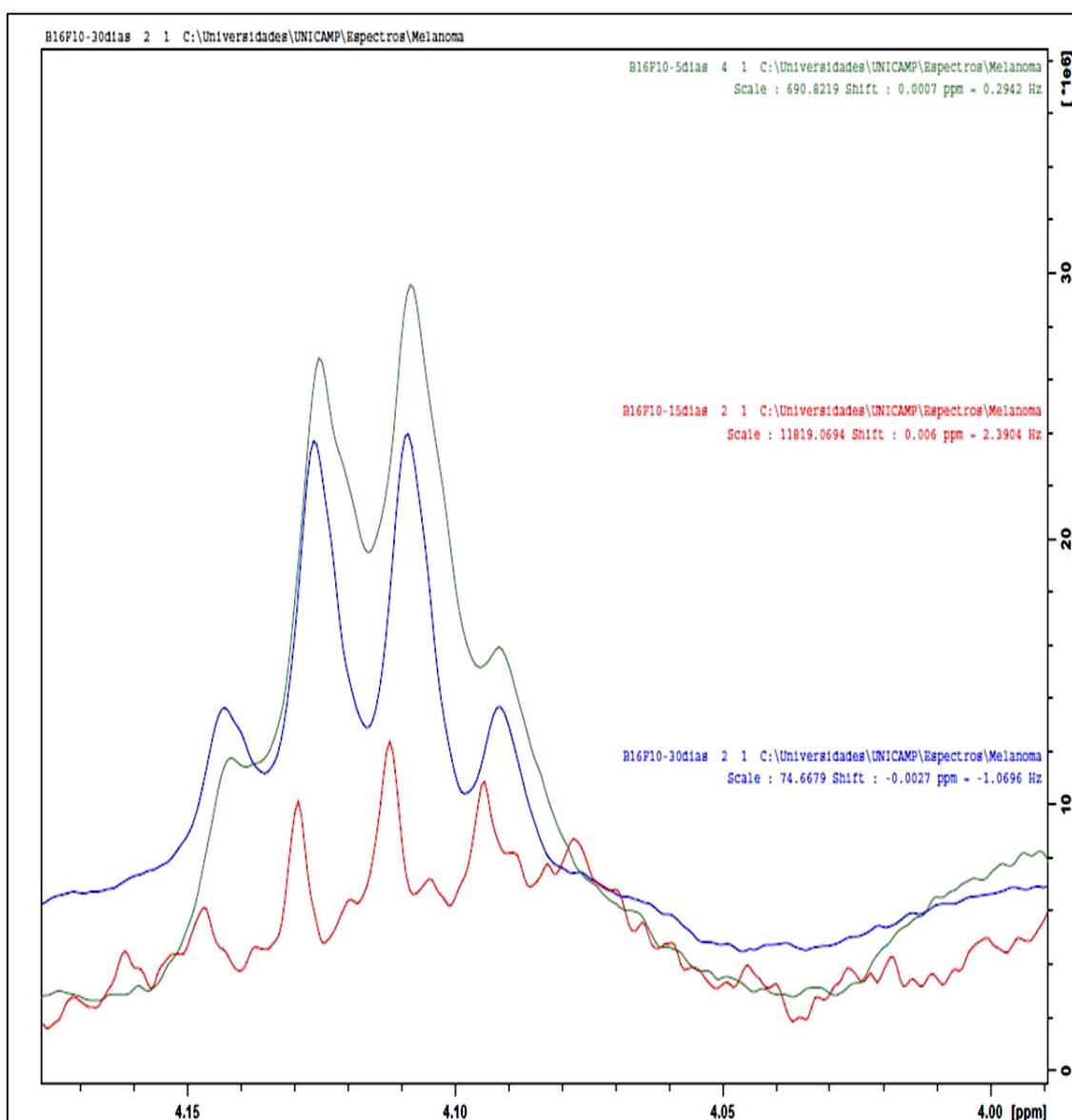
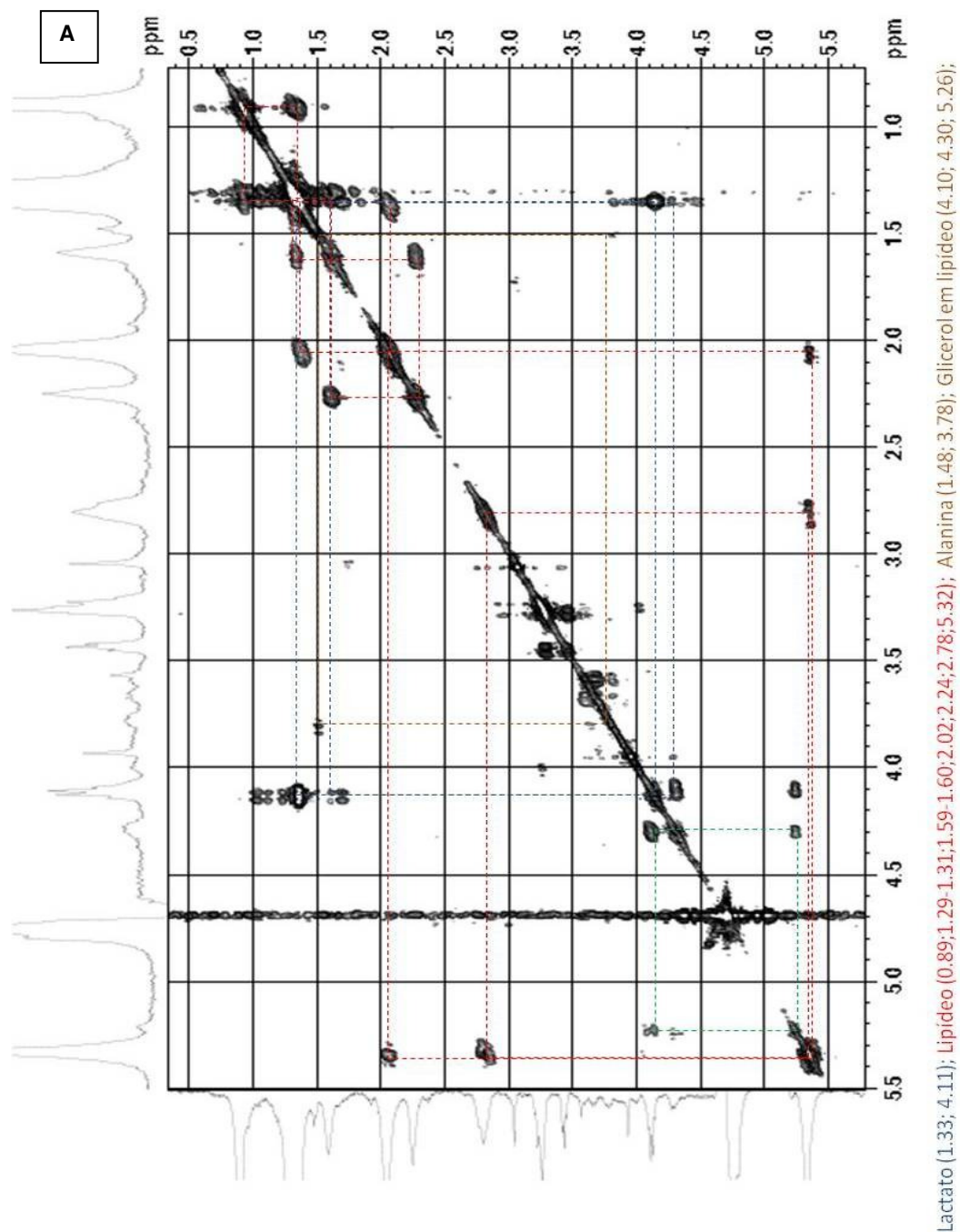


Figura 38– Análise espectral H 1D RMN demonstrando a carga do metabólito Lactato em comparação com diferentes tempos da implantação tumoral 5^o dia (verde), 15^o dia (vermelho) e 25^o - 30^o dia (azul).

Para confirmação dos metabólitos foram utilizadas sequências espectroscópicas de correlação bidimensional (2D) de prótons de hidrogênio (Figura 39).



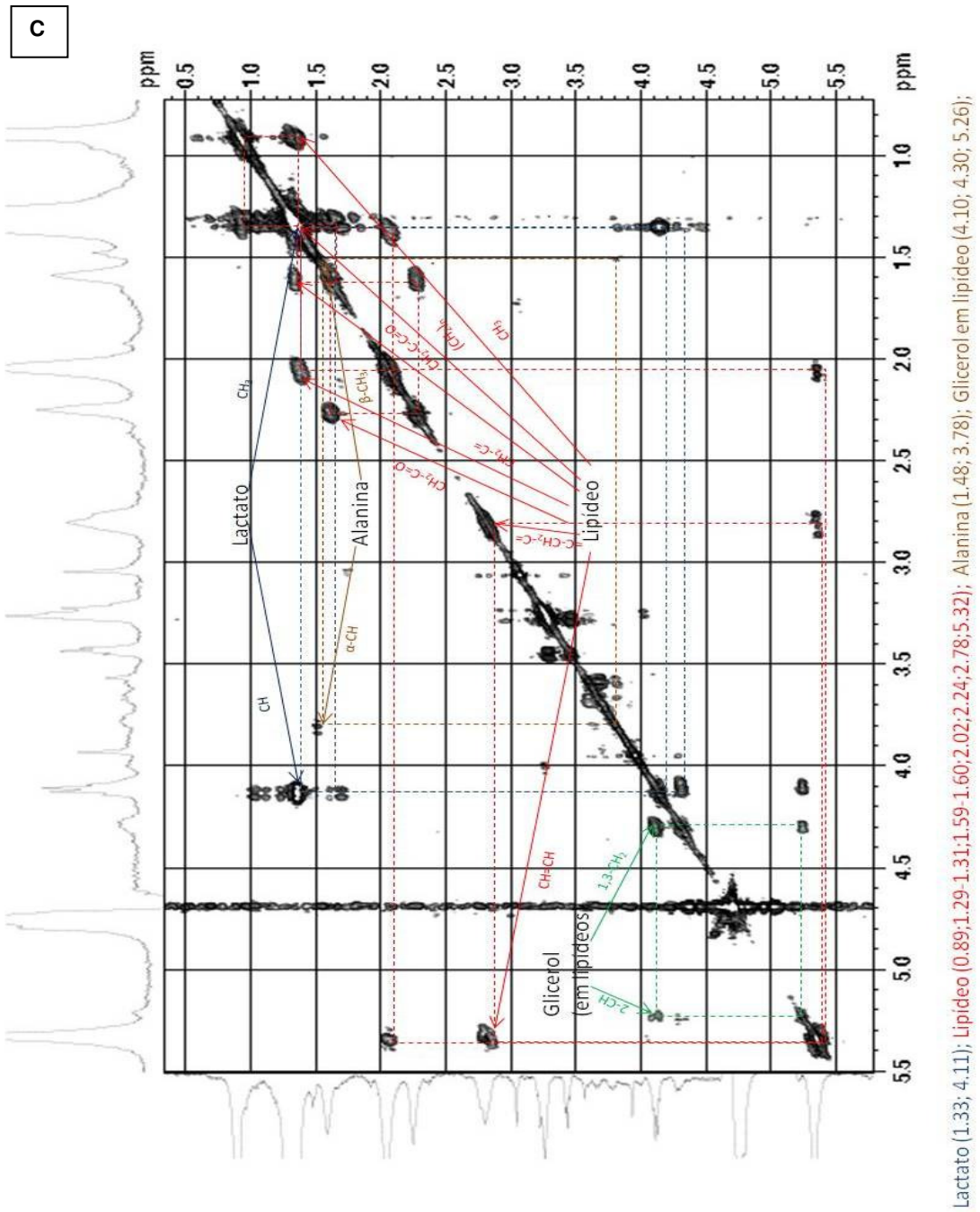


Figura 39 - Análise espectral H 2D RMN identificando os principais metabólitos presentes nas amostras de biópsia dos animais portadores de melanoma B16F10 A,B E C. (15° dia pós-implante).

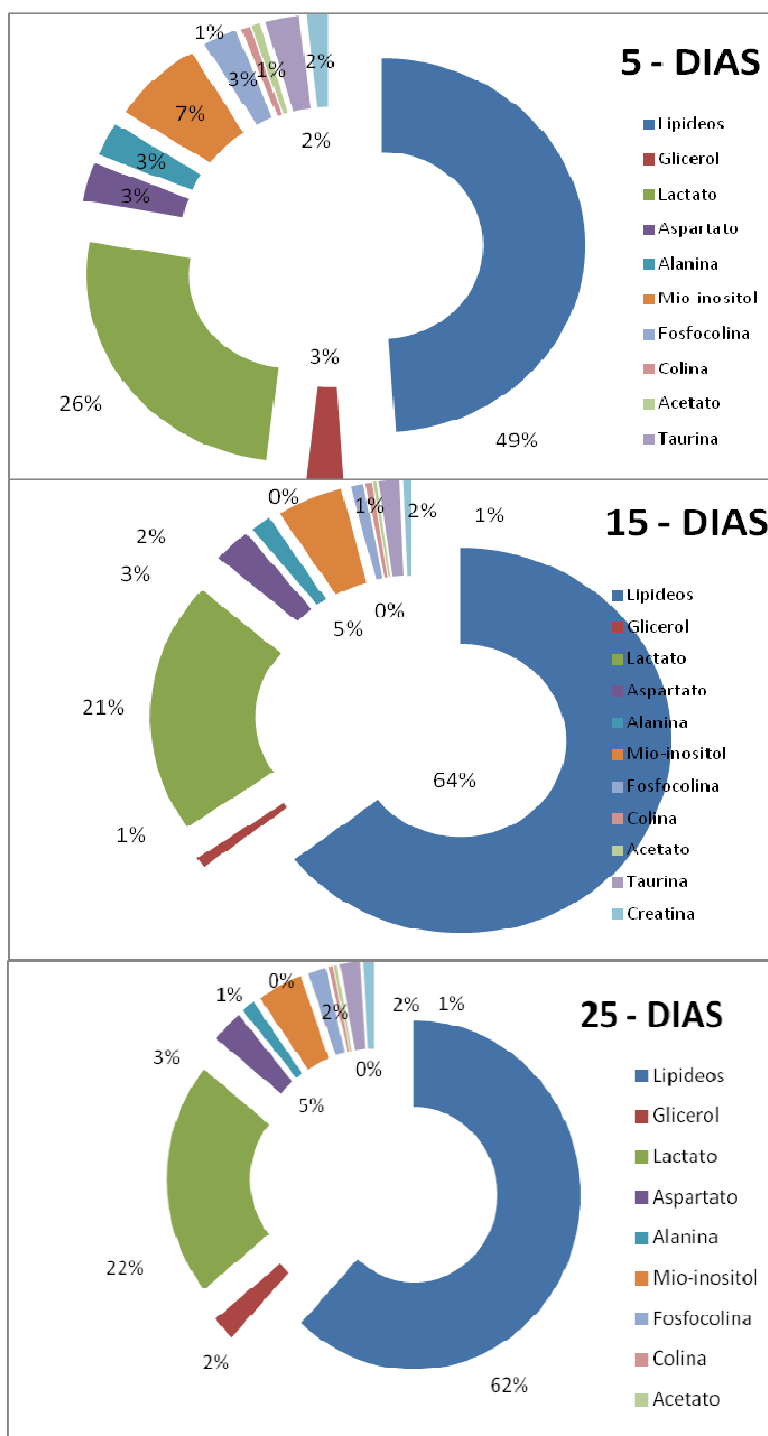


Figura 40 - Distribuição porcentual da quantidade dos metabólitos obtidos nos diferentes períodos de crescimento do tumor dorsal melanoma B16F10, obtido pela análise da derivação da integral do pico do perfil 2D do HRMAS RMN.

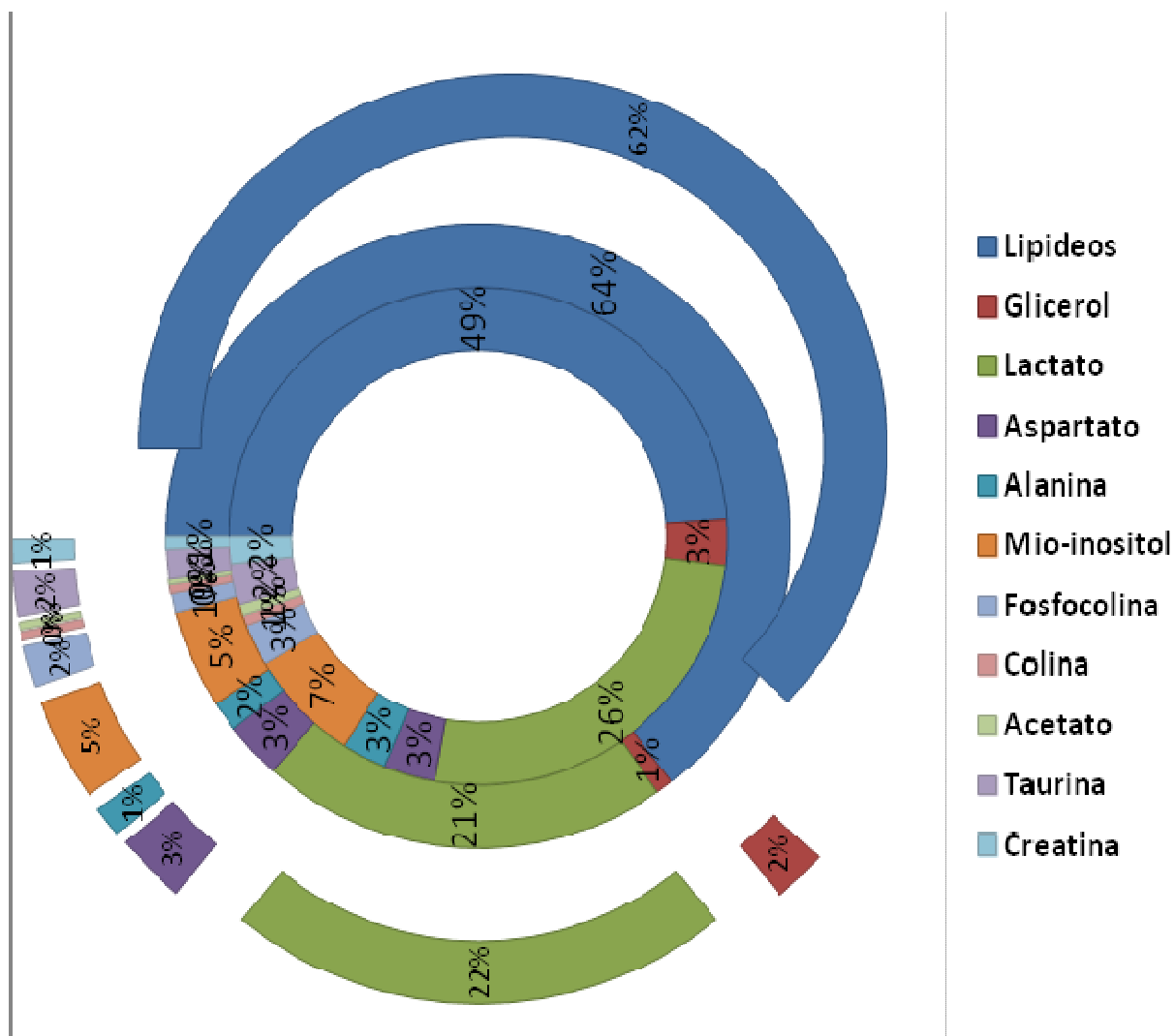


Figura 41 - Análise diferencial dos metabólitos totais produzidos pelo melanoma B16F10 nos diferentes períodos de crescimento tumoral

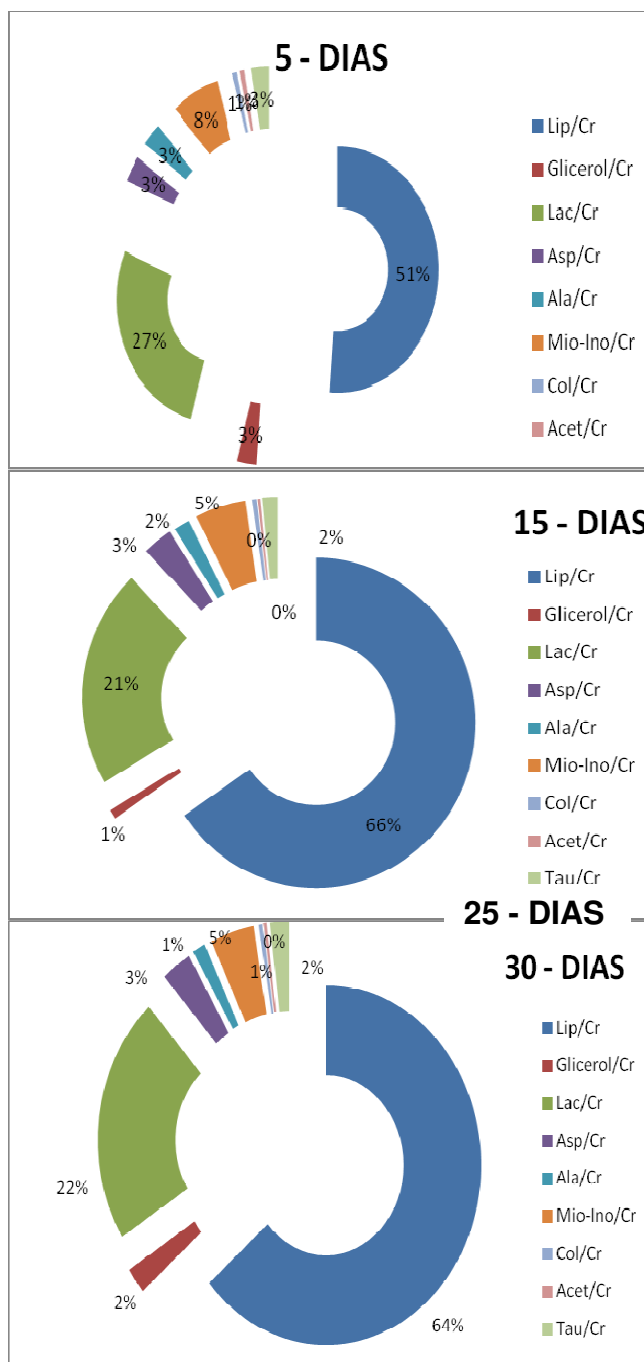


Figura 42– Análise diferencial dos metabólitos diferencialmente produzidos pelo melanoma B16F10 nos diferentes períodos de crescimento tumoral, utilizando como valor de referência a fosfocreatina.

5.11 Análise estatística do perfil diferencialmente expressos identificados nas amostras de tecidos de tumores de melanoma murino B16F10 por RMN 2D de ^1H .

Após as determinações quantitativas das amostras dos tumores nos períodos de 5^o, 15^o e 25^o dias foram realizados novas determinações dos espectros RMN e comparados os valores obtidos e as suas diferenças estatísticas. Os gráficos de barras representativos das médias obtidas e os valores das amostras e as diferenças estatísticas de Variância de múltiplas vias de ANOVA estão apresentados nas figuras 43 a 53. Os resultados das diferentes quantidades em ppm mostraram diferenças significativas nos períodos de crescimento tumoral. Os tumores após 15^o e 25^o dias apresentaram diferenças de quantidade, como o aumento nas cargas lipídicas e nas concentrações de glicerol, colina, fosfocolina, lactato, aspartato, alanina, mioinositol, taurina, acetato e creatina. Em anexo os valores obtidos das amostras, médias, desvio padrão, coeficiente de variação e as análises estatísticas.

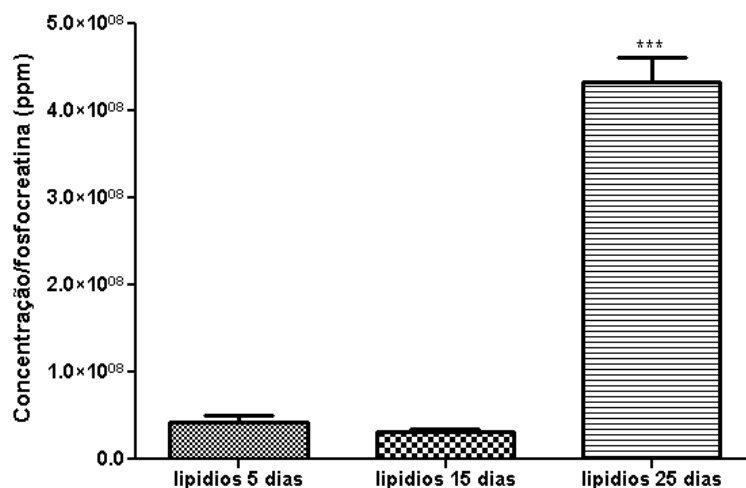


Figura 43 - Gráfico de barra dos valores das médias \pm dp das concentrações em ppm dos Lipídios Totais das amostras dos tumores de melanoma B16F10, nos períodos de 5^o, 15^o e 25^o dias.

Nota: As figuras 43 a 53 apresentam dados obtidos após o processamento matemático da derivação dos valores dos picos do espectro e cálculo da integral e seus dados foram normalizados utilizando-se como referência a fosfocreatina; diferenças estatísticas obtidas pelo teste de Variância de Anova de duas vias, seguido pelo pós-teste múltiplo de Tukey

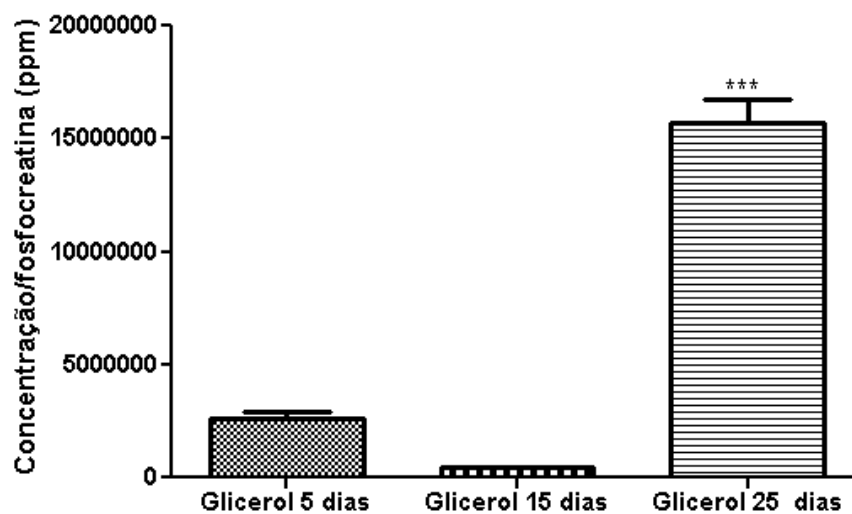


Figura 44 - Gráfico de barra dos valores das médias \pm dp das concentrações em ppm do metabólito Glicerol das amostras dos tumores de melanoma B16F10, nos períodos de 5^o, 15^o e 25^o dias.

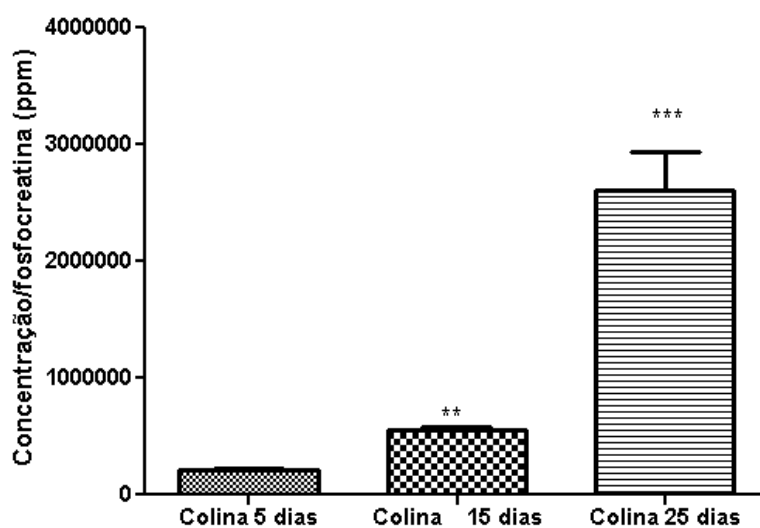


Figura 45 Gráfico de barra dos valores das médias \pm dp das concentrações em ppm do metabólito Colina das amostras dos tumores de melanoma B16F10, nos períodos de 5^o, 15^o e 25^o dias.

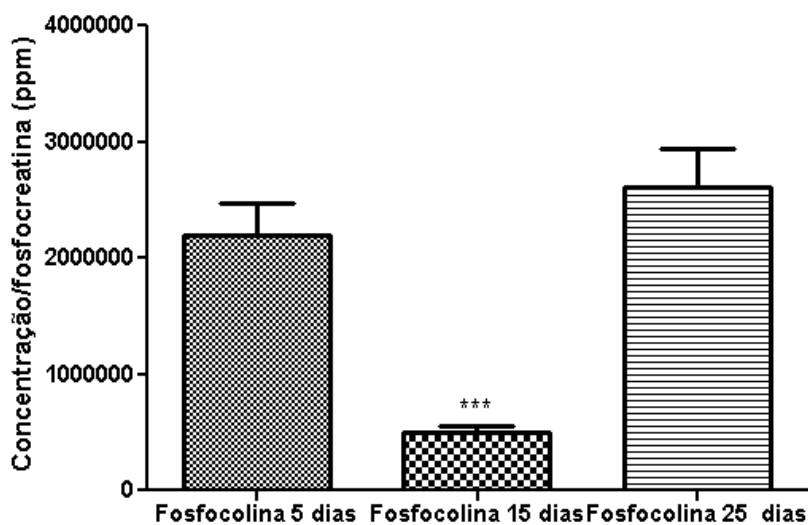


Figura 46- Gráfico de barra dos valores das médias \pm dp das concentrações em ppm do metabólito Fosfocolina das amostras dos tumores de melanoma B16F10, nos períodos de 5^o, 15^o e 25^o dias.

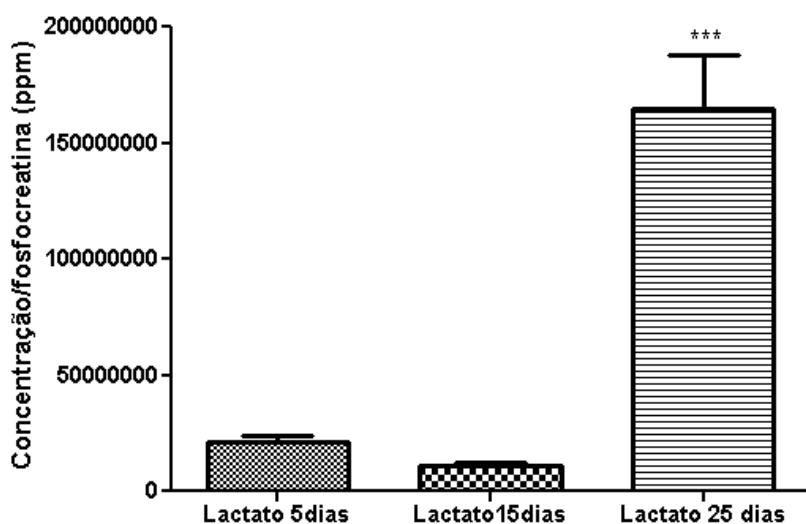


Figura 47 - Gráfico de barra dos valores das médias \pm dp das concentrações em ppm do metabólito Lactato das amostras dos tumores de melanoma B16F10, nos períodos de 5^o, 15^o e 25^o dias.

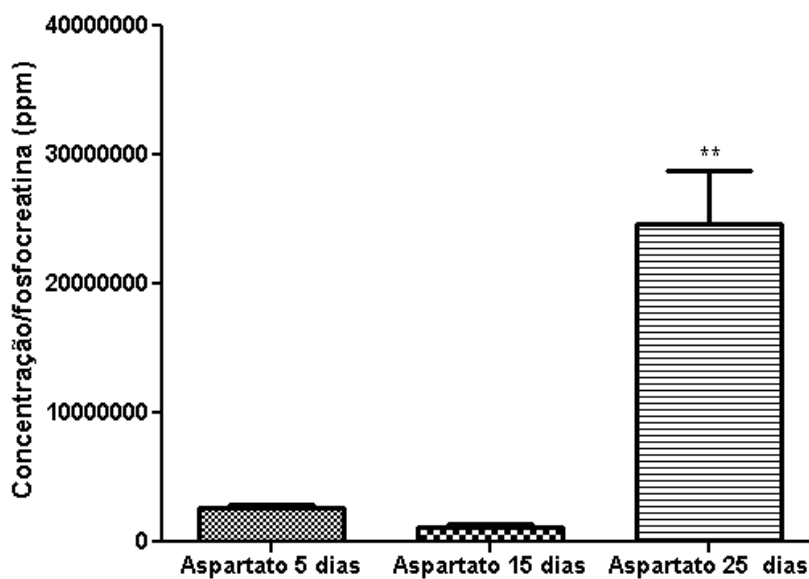


Figura 48- Gráfico de barra dos valores das médias \pm dp das concentrações em ppm do metabólito Aspartato das amostras dos tumores de melanoma B16F10, nos períodos de 5^o, 15^o e 25^o dias.

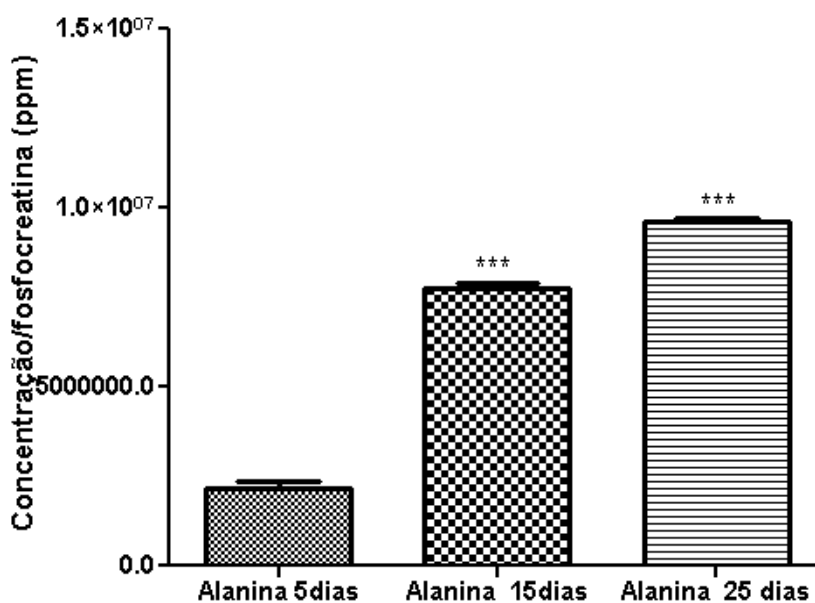


Figura 49 Gráfico de barra dos valores das médias \pm dp das concentrações em ppm do metabólito Alanina das amostras dos tumores de melanoma B16F10, nos períodos de 5^o, 15^o e 25^o dias.

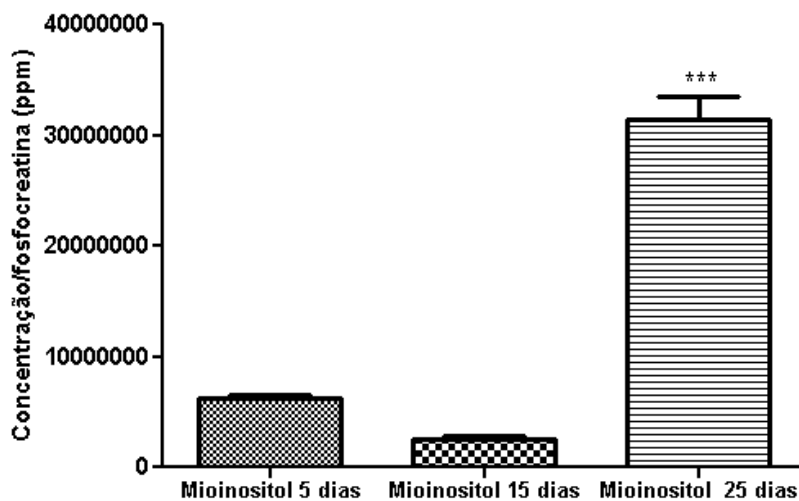


Figura 50 - Gráfico de barra dos valores das médias \pm dp das concentrações em ppm do metabólito Mioinositol das amostras dos tumores de melanoma B16F10, nos períodos de 5^o, 15^o e 25^o dias.

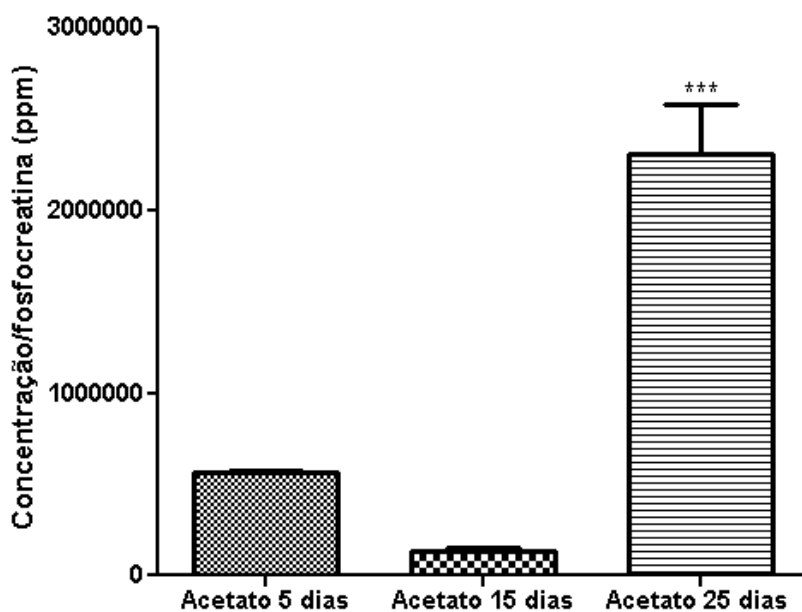


Figura 51 - Gráfico de barra dos valores das médias \pm dp das concentrações em ppm do metabólito Acetato das amostras dos tumores de melanoma B16F10, nos períodos de 5^o, 15^o e 25^o dias.

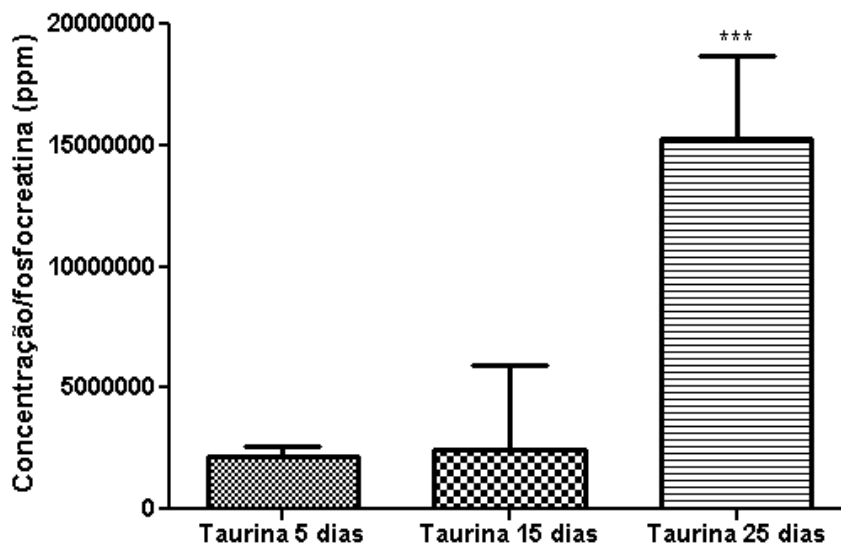


Figura 52- Gráfico de barra dos valores das médias \pm dp das concentrações em ppm do metabólito Taurina das amostras dos tumores de melanoma B16F10, nos períodos de 5^o, 15^o e 25^o dias.

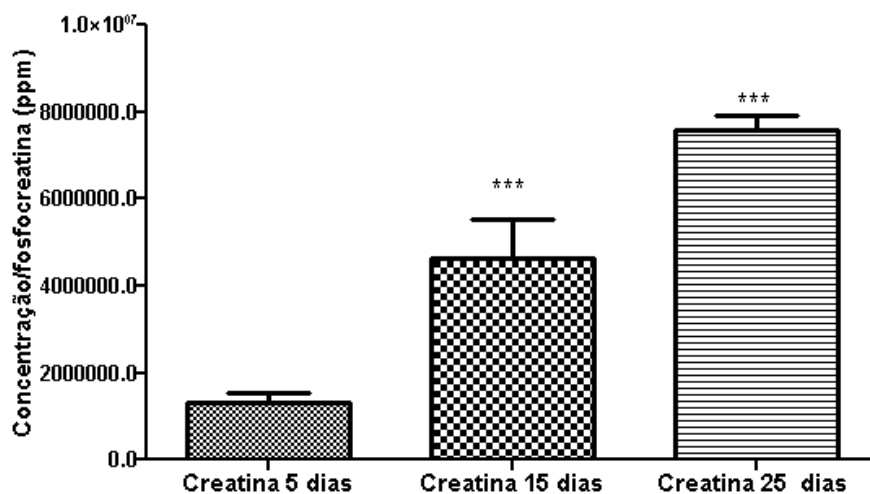


Figura 53 - Gráfico de barra dos valores das médias \pm dp das concentrações em ppm do metabólito Creatina das amostras dos tumores de melanoma B16F10, nos períodos de 5^o, 15^o e 25^o dias.

6 DISCUSSÃO

O metabolismo das células tumorais tem sido estudado por várias décadas com o objetivo de desenhar novas estratégias da prevenção, diagnóstico e terapêutica do câncer. Com base na identificação das alterações específicas, as principais limitações dessa abordagem metabólica, como a transferência de resultados dos modelos experimentais *in vitro* para *in vivo*, em que as células apresentam condições heterogêneas de fornecimento de oxigenação, nutrientes, exposição de hormônios e fatores imunológicos. Apesar destas limitações, algumas classes de alterações bioquímicas identificadas em tumores, especialmente através da utilização de modelos adequados de carcinogênese ou em linhagens celulares, possuem diferentes taxas de crescimento e níveis de diferenciação, por exemplo, em hepatomas ou em carcinomatose ascítica.

As principais consequências das neoplasias se devem ao seu tamanho, à sua localização, à sua capacidade de produzir substâncias biologicamente ativas e, no caso dos cânceres, têm-se ainda os múltiplos efeitos devastadores provocados na sua sede e à distância. Os efeitos locais dependem em grande parte da sede e das dimensões do tumor, podendo causar obstruções e suas consequências naturais, compressão e deslocamentos de órgãos ou estruturas além de ulcerações e hemorragias. Os efeitos sistêmicos estão relacionados com transtornos metabólicos devido à produção de substâncias tóxicas ou de ação fisiológica. Neoplasias de glândulas endócrinas podem causar tanto redução como aumento de hormônios, levando respectivamente a hipofunção e hiperfunção glandular. O estado de consunção progressiva, fraqueza generalizada, anemia e emagrecimento acentuado, que caracterizam o estado de caquexia, é uma das consequências mais dramáticas dos cânceres. Pacientes portadores de tumores desenvolvem hipercatabolismo. Outros efeitos sistêmicos são as síndromes paraneoplásicas, que por vezes é a primeira manifestação de um câncer, e podem ser, até, as responsáveis pela morte do paciente. Nesta categoria estão incluídas como alterações principais a produção ectópica de

hormônio, alterações hematológicas (eritrocitose, anemia, hipercoagulabilidade), manifestações neuromusculares (degeneração cerebelar, demência, neuropatias periféricas, manifestações semelhantes às da polimiosite e miastenia gravis) e outras como osteoartropatia hipertrófica e *Acanthosis Nigricans*¹²⁸.

O desenvolvimento de técnicas analíticas que tornam possíveis a determinação e a quantificação de componentes do metabolismo intermediário é útil para a compreensão da fisiopatologia da doença, para o conhecimento dos mecanismos responsáveis pelos efeitos de drogas e para a associação entre o diagnóstico e a terapia medicamentosa individualizada.

Metabolômica é o estudo do metabolismo global, de pequenas moléculas presentes em células, tecidos, órgãos e fluidos biológicos; tem o potencial de contribuir significativamente para a investigação biomédica e, em última instância, para a clínica médica. Técnicas analíticas que empregam a RMN têm-se mostrado uma ferramenta primordial para as análises metabólicas. A determinação estrutural de metabólitos conhecidos utilizando vários métodos dimensionais (1D) e (2D) de RMN é direta, não há a necessidade de padrões autênticos. A RMN é um sistema de detecção particularmente poderoso nas determinações estruturais de metabólitos, incluindo as posições atômicas dos átomos de ¹³C, ¹⁵N, ou ²H e de seus isômeros gerados durante os estudos de rastreamento; fornece mapas detalhados de vias bioquímicas ou redes, que podem também servir como entradas cruciais para análise de fluxo quantitativa.

Na célula e nas amostras de tecidos, a água é normalmente três ordens de grandeza mais abundante do que outros metabólitos. Assim, a supressão da água é necessária para aquisição de espectros de RMN. Para superar o problema da dinâmica molecular e recuperar os metabólitos que se sobrepõem com a larga base do sinal de ressonância da água, optou-se por utilizar técnicas de supressão de água. No entanto, o ambiente heterogêneo celular muitas vezes complica a supressão de água e o forte acoplamento da água com a membrana dos lipídios interfere na detecção de RMN de membranas associadas a componentes lipídicos. As técnicas de

supressão de água empregadas, incluindo pré-saturação e gradiente de campo pulsado eco duplo-seletivo, utilizando as sequências de pulso ZGPR e ZGF2PR, resultaram em uma redução superior a 90% do sinal da água associado com espectros de prótons de células e tecidos e 60% de supressão do sinal do crioprotetor DMSO, respectivamente.

Os resultados apresentados nas Figuras 25, 26 e 27 mostram que a supressão de água e do crioprotetor DMSO, utilizando uma combinação seletiva de supressão de excitação e gradientes pulsados, evita a perda de sinal encontrado com as convencionais sequências de pulso. A técnica de supressão de água e do crioprotetor com base na combinação da coleta seletiva de pulsos de excitação e de gradientes de campo pulsado – onda contínua, desenvolvida neste projeto, foi utilizada na aquisição de alta resolução dos espectros de RMN-MAS das amostras de células de melanoma B16F10. Essa metodologia permite que a sequência de pulsos seja eficiente na supressão da água e do DMSO, não eliminando os sinais de pequenos metabólitos celulares (Figura 25).

O ciclo celular é coordenado por meio de eventos que possibilitam que as células dupliquem seu material genético e, posteriormente, entrem em divisão (mitose). Concluída a mitose, as células neoformadas podem continuar a se dividir, passando por todas as fases do ciclo ou, então, sair do ciclo celular, tornando-se células em estado de repouso (G0). Estas células podem reentrar no ciclo por meio de fatores de crescimento.⁶⁶

A proliferação celular é normalmente determinada por sinais extracelulares que ativam um programa de expressão gênica e que regulam proteínas requeridas para divisão celular⁶⁶. No início da fase G1 ciclinas-D (D1, D2 e D3) reúnem-se em um complexo de haloenzimas com uma ou duas subunidades catalíticas, de quinases dependentes de ciclinas (Cdk), Cdk4 e Cdk6. Nas células que se divide ativamente, a interfase é seguida da mitose, culminando na citocinese. Sabe-se que a passagem de uma fase para outra é controlada por fatores de regulação, de modo geral, proteicos, que atuam nos chamados pontos de checagem do ciclo celular. Dentre essas proteínas, se destacam as ciclinas, que controlam a passagem da

fase G1 para a fase S e da G2 para a mitose. Se em algumas dessas fases houver qualquer anomalia, por exemplo, algum dano no DNA, o ciclo é interrompido até que o defeito seja reparado e o ciclo celular possa continuar. Caso contrário, a célula é conduzida a apoptose.

Outro ponto de checagem é o da mitose, promovendo a distribuição correta dos cromossomos pelas células-filhas. Perceba-se que o ciclo celular é perfeitamente regulado, está sob controle de diversos genes e o resultado é a produção e diferenciação das células componentes dos diferentes tecidos do organismo. Os pontos de checagem correspondem, assim, a mecanismos que impedem a formação de células anômalas.

A origem das células tumorais está associada às anomalias na regulação do ciclo celular e à perda de controle da mitose. Alterações do funcionamento de genes controladores do ciclo celular, em decorrência de mutações, são relacionadas ao surgimento de um câncer. Duas classes de genes, os protooncogene e os genes supressores de tumor, são os mais diretamente relacionados à regulação do ciclo celular. Os protooncogenes são responsáveis pela produção de proteínas que atuam na estimulação do ciclo celular, enquanto os genes supressores de tumor são responsáveis pela produção de proteínas que atuam inibindo o ciclo celular. Os protooncogenes, quando ativos, estimulam a ocorrência de divisão celular e os genes supressores de tumor, quando ativos, inibem a ocorrência de divisão celular. O equilíbrio na atuação desses dois grupos de genes resulta no perfeito funcionamento do ciclo celular.

Superficialmente, a conexão entre o ciclo celular e o câncer é óbvia: as maquinarias regulatórias do ciclo celular controlam a proliferação celular e, em contrapartida, o câncer é uma doença de proliferação celular inadequada. Fundamentalmente, todos os cânceres permitem a proliferação celular. No entanto, este excesso de células está ligado a um ciclo vicioso, com uma redução da sensibilidade aos sinais que normalmente uma célula possui para aderir, diferenciar ou morrer. Esta combinação de propriedades alteradas aumenta a dificuldade de decifrar os principais sinais da causa do câncer. As primeiras alterações genéticas contribuem para o

desenvolvimento do câncer, no qual há um ganho de funções por mutações definidas por oncogêneses.⁸² Os produtos do proto-oncogenes possuem funções em vias de transdução de sinais que promovem a proliferação celular. No entanto, as transformações por oncogêneses individualmente podem ser redundantes ou podem ser de tipo específico de células. Isto sugere que múltiplos caminhos distintos de alterações genéticas podem levar ao câncer, mas que nem todos os caminhos têm o mesmo papel para cada tipo de célula. Jackowski e colaboradores^{107, 108} demonstraram que o acúmulo de fosfolipídios e seus precursores são eventos periódicos associados às fases distintas do ciclo celular.

Nas análises das fases do ciclo celular por citometria de fluxo em células de melanoma B16F10 observou-se maior nível de atividade celular das células de melanoma, na fase G1/0 e G2/M (Tabela 3). A compreensão das relações e dos níveis durante as fases do ciclo celular em células tumorais pode auxiliar o desenvolvimento de métodos para monitorar alterações RMN no controle do ciclo celular, que ocorrem na progressão da célula tumoral. Os diferentes graus de malignidade fornecem uma forte correlação entre os marcadores celulares.¹⁰⁹ No entanto, os ensaios não fornecem informações das vias metabólicas. Então, foi importante correlacionarmos às análises espectrais e os resultados do ciclo celular, na tentativa de sinalizar os caminhos para a progressão tumoral do melanoma. Na Figura 28 observamos altos sinais expressos por ácidos graxos CH3 e CH2 na escala de 0,80 a 2,5 ppm, caracterizando um acúmulo expressivo de lipídeos. Jackowski e colaboradores^{107,108} estudaram o acúmulo de lipídeos (LP), de precursores dos lipídeos e derivados em eventos periódicos associados a fases distintas do ciclo celular. O estudo demonstrou que, em uma célula mitogeno-estimulada, o acúmulo de LP é coordenado na fase S do ciclo celular (embora a síntese LP não seja dependente da síntese de DNA). Mais especificamente, nos primeiros estudos, as análises espectrais e as do ciclo celular mostraram que: (a) o acúmulo de líquido LP ocorre na fase S como um resultado do ciclo celular dependente de oscilações nas taxas de síntese e degradação de derivados do LP, (b) um *turnover* mais

rápido de LP ocorre na fase G1 e continua até o limite G1 / S, (c) a limitação da taxa de biossíntese de derivados de LP está também ativada na forma de células-ciclo-dependentes, a partir do G1, aumentando constantemente em S e / G2 M, e observa-se um declínio acentuado durante a fase S mas acelera novamente como células reentradas em G1. Durante a fase G1, ambos os caminhos de derivados LP mediados por hidrólise são, portanto, a máxima atividade celular. Esta evidência sugere que a produção máxima de lipídeos em um tumor (ou em uma célula de proliferação rápida) provavelmente ocorre na fase G1 e é mantida na fase S (onde biossíntese LP está parada), fornecendo uma possível explicação para a correlação positiva entre os derivados de LP e a intensidade do sinal nas células tumorais. Em contraste, a biossíntese de lipídeos parece ser parada (*arrest*), durante a fase G1, e não se observou a biossíntese nestas células.

Mais estudos serão necessários para determinar quais metabólitos são produzidos durante G2/M e excretado na fase, ou de biodegradação na fase G1. No momento, nós não temos informações suficientes para especular sobre as razões para as diferenças no metabolismo dos lipídeos entre G1 e G2/M. Estes conceitos e hipóteses sugerem que seria útil investigar mais detalhadamente as mudanças que ocorrem com os derivados dos LP nas diferentes fases do ciclo celular. Os experimentos até agora sugerem que não apenas a biossintética dos caminhos, mas também as alterações observadas no ciclo celular podem contribuir para um caminho de progressão tumoral relacionado com o metabolismo dos lipídios.

Modelos de tumores experimentais foram desenvolvidos para avaliar a significância de fosfolipídios como metabólitos indicadores de resposta do tumor à terapia. Estudos *ex vivo* com ^{31}P -RMN em tumores implantados em camundongos singênicos demonstraram que alterações precoces nos níveis de PDE e PME foram induzidos pela administração *in vivo* de modificadores da resposta biológica, antes do aparecimento de áreas de necroses. O primeiro exemplo dos espectros de ^{31}P -RMN de um tumor humano *in vivo* foi relatado por Griffiths e colaboradores ¹¹⁰ em um caso de rabdomyossarcoma. Uma característica peculiar espectral do tumor foi o

aparecimento de sinais de destaque na frequência de regiões típicas de compostos de fosfomonoéster (PME) e fosfodiéster (PDE).

As células tumorais e as normais se dividem mais rapidamente quando os volumes teciduais ou tumorais são menores e, mais lentamente, se esses volumes são maiores. Isto leva a um crescimento exponencial com curtos tempos de duplicação em tumores de menor volume. A fração proliferativa do tumor decresce à proporção que o mesmo cresce, aumentando seu tempo de duplicação. Assim, um tumor apresenta tempos diferentes de duplicação em momentos diferentes de seu crescimento/estádio. Foram realizadas análises das diferentes fases do ciclo celular dos tumores de melanoma B16F10 nos períodos de 5^o, 15^o e 25^o dias após a implantação das células tumorais na região dorsal. Macroscopicamente foi observada a presença de áreas de necrose após os 25^o dias do crescimento tumoral (Figuras 13). Os resultados mostraram todos os períodos analisados há um efeito proliferativo com aumento das células nas fases G2/M nos tumores retirados após 15^o e 25^o dias de implante das células e uma proporção de células com DNA fragmentado (Figura 16).

O aumento da fragmentação foi correlacionado à extensa área de crescimento tumoral dorsal e à presença de áreas de necrose que foram acentuadas a partir do 15^o dias da implantação. As correlações estatísticas estão apresentadas na figura 24 e mostraram claramente as modificações nas proporções de células com potencial proliferativo inversamente proporcional ao DNA fragmentado ao longo do crescimento tumoral, supostamente decorrentes da presença de áreas de necrose tumoral.

O fato de que os tumores dependem das vias metabólicas da glicólise ou, ainda, da gliconeogênese para satisfazerem as suas demandas metabólicas têm sido reconhecido desde o início do século XX, sob o nome de efeito Warburg. Vários mecanismos têm sido propostos para explicar este fenômeno, incluindo a alta regulação das etapas limitantes da glicólise, a acumulação de mutações no genoma mitocondrial, a hipóxia induzida (interruptor da respiração mitocondrial) e/ou a reprogramação metabólica

resultante da perda de função das enzimas como a fumarato e succinato desidrogenase. Como da glicólise aeróbica e a resistência da apoptose permanece a ser elucidado.¹¹⁴

Por outro lado, estas alterações podem ser adquiridas de forma independente por células tumorais durante as várias etapas da oncogênese. A supressão do programa intrínseco da apoptose pode ser conseguido através de mecanismos que conduzem diretamente ao efeito Warburg. Alterações mitocondriais câncer-específico e a bioenergética podem ser aproveitadas na identificação das vias de progressão tumoral. Para elucidar tais alterações, as identificações mitocondriais específicas, utilizamos neste projeto as análises por citometria de fluxo na determinação do potencial elétrico interno da membrana mitocondrial.

A determinação do potencial elétrico interno da membrana mitocondrial foi realizada por citometria de fluxo utilizando como sonda a rodamina - Rho123, uma sonda lipofílica catiônica fluorescente que se distribui no compartimento mitocondrial, emitindo fluorescência verde, medida na região de 530 nm (canal de intensidade FL1), que é proporcional à quantidade absoluta de Rho123. Assim, a redução na fluorescência está relacionada com a despolarização, ou seja, a perda do potencial da membrana mitocondrial interna.

As células tumorais de melanoma murino B16F10 obtidas de animais portadores de melanoma dos períodos 5°, 15° e 25° dias pós-implante, demonstraram significativo aumento do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$). Os resultados apresentam também duas populações celulares, (Figura 21). Uma possível justificativa para este processo seria heterogeneidade das mitocôndrias em número e atividade metabólica dentro de uma mesma população celular como peculiar da progressão e formação de clones tumorais com diferentes potenciais de invasão. As mutações genéticas e conseqüentemente as alterações metabólicas das células tumorais podem aumentar o fluxo de elétrons ou causar alterações na permeabilidade mitocondrial, onde há uma despolarização na membrana interna da mitocôndria, bem como aumento da permeabilidade, mais precisamente pela

transição na permeabilidade dos poros mitocondriais. Este mecanismo é o principal gatilho da inibição de fatores apoptóticos da mitocôndria, como o citocromo C.¹¹⁴ As células tumorais podem acumular defeitos no genoma mitocondrial, levando à respiração mitocondrial deficiente ou a se utilizar de outras vias metabólicas secundárias com menor eficiência na produção de aceptores de elétrons e na geração de ATP.

As ciclinas são importantes mediadores da atividade das cdk's e seus níveis são variáveis durante o ciclo celular. As ciclinas estão divididas em três classes específicas: ciclinas G1-S, ciclinas S e ciclinas M. O nível de ciclina é regulado pela expressão gênica e degradação proteica. A ciclina D1 é uma das proteínas envolvidas na transição celular da fase do ciclo de G1 (repouso) para a fase S (síntese), tanto em células normais, como em células neoplásicas. A superexpressão da proteína ciclina D1, como resultado de ativação do gene, remove a regulação normal do ciclo celular, causando proliferação celular descontrolada e transformação para um fenótipo neoplásico. Nesta etapa do projeto foram adicionadas informações complementares das vias de morte celular, como a expressão da caspase - 3 fosforilada e de pontos de regulação do ciclo celular dependentes de CDKs, como a ciclina D1. O aumento significativo e gradual na expressão da ciclina D-1 nos períodos de 15° e 25° dias expressa a fase exponencial do crescimento tumoral; os resultados estão apresentados na Figura 22.

Marcadores de morte celular programada, tais como a cisteína protease 32, conhecida como caspase-3, responsável pela clivagem proteolítica de várias proteínas. A ativação sequencial das caspases desempenha um papel central na fase de execução da apoptose celular. As caspases existem como pró-enzimas inativas que depois sofrem um processamento proteolítico em resíduos de aspartato, para produzirem duas subunidades, uma pequena e outra grande, que dimerizam para formar a enzima ativa. Os resultados mostraram diminuição significativa na expressão da caspase-3 fosforilada após o 25° dia de implantação, fase exponencial final do crescimento tumoral, quando foi observado aumento das áreas macroscópicas de necrose e nos experimentos para a determinação das

fases do ciclo celular, aumento da fração de células com DNA fragmentado; os resultados estão apresentados na Figura 23.

Dependência específica de aminoácidos é uma das anormalidades metabólicas em células tumorais e também pode ser considerada como a base metabólica para seu comportamento maligno e invasivo. Em outras palavras, os comportamentos malignos de células de melanoma podem ser dependentes ou estarem relacionadas com a sua dependência específica de aminoácidos. No entanto, a dependência específica relativa destes aminoácidos de câncer não foi devidamente estudada e a grande maioria dos estudos é descritiva. Assim, o mecanismo pelo qual a restrição específica de aminoácidos causa anormalidades metabólicas e podem inibir o comportamento maligno de melanoma é praticamente desconhecido.

A restrição seletiva de diversos aminoácidos específicos causa apoptose de células de melanoma e é um processo relativamente lento. Células de melanoma são dependentes de adesão focal. FAK (adesão focal dependente de quinases) é necessária para a sobrevivência celular em células de adesão dependente, que são responsáveis pela fosforilação de resíduos de Tyr (tirosina) e assim executar sua função. Embora a inibição da fosforilação da FAK pela restrição específica de aminoácidos é consistente com a indução de apoptose em células de melanoma, alteração da FAK por si não explica todo o processo de apoptose induzida por este mecanismo.

115-117

A indução de apoptose é uma opção viável e uma importante abordagem terapêutica para o controle do crescimento de tumores. A restrição dos aminoácidos tirosina (Tyr) e fenilalanina (Phe) bloqueia a progressão do ciclo celular na fase G₀/G₁ em células de melanoma B16BL6 e em células de melanoma humano A375. O controle da apoptose está intimamente ligado ao ciclo celular e os aminoácidos estão ligados ao controle da progressão do ciclo celular através da regulação da expressão genética. Assim, iniciamos este estudo para testar a hipótese de que a restrição Tyr Phe induz apoptose em células de melanoma que é relativamente específico. Células de melanoma são especialmente sensíveis

à indução de apoptose em resposta à privação de Tyr combinado a Phe, mas não à privação de soro fetal bovino ou à presença de glutamina no meio de cultura, apesar de soro ou privação de glutamina também inibirem o crescimento de melanoma. Além disso, a inibição do crescimento induzida pela privação de soro ou glutamina não é refletido na inibição da metástase de melanoma. Assim, os efeitos da privação do Phe e Tyr em células de melanoma não são devidos a uma fonte generalizada das células de fatores de crescimento porque a privação desses aminoácidos induz apoptose em presença de 10% de soro fetal bovino. Células de melanoma são especialmente sensíveis à disponibilidade de Tyr e Phe, e estes dois aminoácidos podem ser considerados como fatores de sobrevivência para esse tumor.¹¹⁸

Em tumores sólidos que normalmente invadem a corrente sanguínea, diretamente ou através de vasos linfáticos, a sobrevivência na circulação é um passo crítico para a formação de metástases à distância. Como as células de melanoma são dependentes da aderência, são possíveis que essas células sejam mais sensíveis aos efeitos da privação Tyr e Phe. A privação de Tyr e Phe e *in vitro* reduz a sobrevivência de células de melanoma em suspensão. Se esses dados podem ser extrapolados para uma situação *in vivo*, é razoável especular que células de melanoma submetidos a metástase hematogênica são especialmente sensíveis à restrição de Tyr e Phe. Esse fato poderia explicar, pelo menos em parte, por que metástase espontânea é inibida em camundongos alimentados com dietas restritas em Tyr e Phe.^{119,120}

Em estudos com humanos, voluntários saudáveis podem ser mantidos em ambiente ambulatorial, pelo menos, quatro semanas em uma dieta restrita à fórmula Tyr e Phe¹²⁰⁻¹²². A restrição dietética de Tyr e Phe aumenta os efeitos potenciais da quimioterapia experimental da l-dopa em melanoma B16 *in vivo* e pode até evitar o aparecimento de resistência às drogas durante a quimioterapia.¹²³ Yoshioka e colaboradores¹²⁴ demonstraram que doses múltiplas de uma enzima recombinante metioninase foram eficientes contra tumores humanos implantados em

camundongos nudes, sem provocar efeitos colaterais adversos. O esgotamento da metionina devido à falta da enzima metioninase potencializou a eficácia antitumoral do quimioterápico 5-fluorouracil. Assim, o uso de depleção de aminoácidos para retardar a formação de metástase e a eficiência da quimioterapia é uma nova abordagem para o controle do câncer.

As mitocôndrias são organelas metabólicas importantes que geram ATP para fornecer energia e contêm enzimas e/ou proteínas funcionais que regulam a apoptose. Apoptoses induzidas por restrição específica de aminoácidos estão relacionadas ao perfil metabólico. Este tipo de morte celular de apoptose é mais lento e também depende das alterações da integridade e função mitocondrial. Aminoácidos específicos modulam os membros da família Bcl-2 que desempenham importantes papéis na manutenção da integridade mitocondrial e na progressão de melanoma humano. A perda de integridade mitocondrial leva à liberação de citocromo c, que pode resultar em morte celular caspase-dependente, e à liberação do fator de indução de apoptose, o que pode levar à morte celular caspase-independente. A privação de Tyr/Phe modula o potencial transmembrana mitocondrial e conseqüentemente esta modulação leva à fuga do citocromo c da mitocôndria para o citosol e à ativação das caspases em células de melanoma humano A375. Além de alterações na integridade mitocondrial, também se verificou que outras funções mitocôndriais são alteradas pela restrição de Tyr/Phe, Met e Gln. A produção de energia (síntese de ATP) é diminuída e o conteúdo de ATP é diminuído 2 dias após a privação de Tyr/Phe e Met, no entanto, o máximo esgotamento não é atingido pela privação Gln até o 3º dia de experimentação.

Espécies reativas de oxigênio intracelulares participam de uma diversificada variedade de processos biológicos, incluindo o crescimento celular, apoptose e senescência. Células tumorais produzem elevados níveis de espécies reativas de oxigênio e as suas principais fontes são encontradas nas mitocôndrias. A geração de espécies reativas de oxigênio está aumentada pela restrição Tyr Phe, Met e Gln em células de melanoma

humano A375¹²⁵⁻¹²⁷, no entanto, a restrição Gln não induziu à apoptose dessas células. Além disso, como também há a diminuição dos níveis de ATP em resposta à privação de Gln, este fato sugere ainda que as gerações de espécies reativas de oxigênio e inibição da produção de ATP não se correlacionam com a indução de apoptose em células de melanoma A375. Estudo utilizando linhagem de células de melanoma SK-MEL-5 evidenciou níveis elevados de expressão da enzima prolidase. Estes achados conduziram a uma segmentação da expressão da prolidase indireta como uma ferramenta para o tratamento de melanoma quando modificados os sítios de ligação da enzima por agentes antitumorais.

A síntese de estrogênio *in situ* em tumores indica a proliferação celular através de mecanismos autócrinos e parácrinos, especialmente em mulheres pós-menopáusicas. Estudos recentes demonstraram atividade da aromatase, uma enzima que desempenha um papel crítico nos níveis da síntese do estrógeno em tumores de mama.

Níveis de prolina, glutamato e leucina rica em proteína-1 (PELP1/MNAR) mostraram-se desregulados em tumores de mama. A superexpressão de PELP1, receptor de estrogênio (ER) co-regulador, promoveu o crescimento de tumores de mama e a síntese de estrogênio local.

As fases da disseminação do tumor parecem ser regidas por proteases que digerem as proteínas da matriz celular secretadas pelas células tumorais, criando um caminho pelo qual as células podem se mover através do seu meio circundante da matriz extracelular. No entanto, as funções reais das proteases na mobilidade e invasão do câncer ainda são imperceptíveis. As serinoproteases e seus inibidores endógenos claramente mostram padrões de expressão alterada durante a tumorigênese de tumores de mama. As análises de metabólicos são geralmente baseadas na medida da quantidade e, não, na atividade funcional.

Há uma necessidade de medir a atividade dos metabólicos em uma mistura complexa como as células tumorais. Medidas simples e estáticas de metabólicos são insuficientes para explicar a natureza da dinâmica das

interações que ocorre no ambiente dos tumores. Um sinônimo para o sucesso da disseminação do tumor é uma produtiva migração celular invasiva, um processo pelo qual a matriz extracelular possui papel de substrato para as células se moverem e atingirem um sítio secundário. Para degradar a matriz extracelular, as peptidases participam ativamente deste processo. A atividade destas enzimas é regulada por inibidores, ativadores e receptores. Entretanto, no câncer, ocorre uma quebra do balanço da atividade proteolítica-antiproteolítica. As peptidases, enzimas que clivam ligações peptídicas, podem atuar de forma direta, ao degradar componentes da matriz extracelular, ou de forma indireta, ao ativar outras peptidases a gerar fragmentos bioativos, interagir com receptores da superfície celular e participar no processo angiogênico. A modificação e o remodelamento das matrizes extracelulares causadas por peptidases modificam a ancoragem mediada por integrinas; a adesão focal e a arquitetura do citoesqueleto direcionam moléculas de sinalização que podem afetar a expressão gênica e influenciar no comportamento como proliferação, sobrevivência, diferenciação e mobilidade. Recentemente, alguns trabalhos demonstraram uma correlação inversa entre a baixa expressão de peptidases e o aumento do potencial do desenvolvimento do tumor. Desta forma, apesar de oferecerem uma excelente alternativa mais efetiva e direcionada para o tratamento do câncer, os inibidores de peptidases devem ser específicos, administrados no tempo correto, com o auxílio de biomarcadores, e ser atuados localizadamente.

O conhecimento das principais alterações metabólicas observadas nas células tumorais e suas repercussões clínicas tem grande importância para a melhor compreensão do impacto da terapia sobre a evolução e prognóstico dos pacientes com câncer¹²⁹. Neste projeto, vários marcadores foram encontrados diferencialmente e quantitativamente presentes nos diferentes períodos de crescimento do melanoma B16F10, na tentativa de se correlacionar positivamente os marcadores metabólicos identificados.

Assim, os principais eventos que levam à ativação constitutiva de vias do fator de crescimento, à ativação de HIF-1 e à inativação de p53

constituem a causa comum de programação metabólica como o crescimento autônomo, a resistência contra apoptose, a replicação ilimitada, angiogênese e as alterações nas fases do ciclo celular. A proteína p53 humana pode ser detectada em muitas atividades proliferativas de células saudáveis, mas é praticamente indetectável em células na fase de descanso, ou G0, do ciclo celular. Possui um tempo de meia-vida curto (em torno de 10-20 minutos)¹³⁰, mas, diante de um estado estressante, como radiação ionizante ou ultravioleta, drogas que lesam o DNA ou hipóxia, ocorrem a estabilização e o acúmulo de proteínas p53 recém-sintetizadas. O p53 ativado rapidamente é transportado para o núcleo, funcionando como um fator de transcrição específico de sequência de DNA¹³¹. A partir daí, há a indução de vários genes envolvidos na parada do ciclo celular, reparo de DNA e apoptose¹³⁹. A estabilização da proteína p53 é realizada pelo proto-oncogene Mdm2¹³³, o qual atua tanto como um alvo transcricional como um supressor da função do p53, formando como uma alça auto-reguladora negativa de feedback¹³⁴. O Mdm2 se liga com o terminal amina (N) do p53 (nos resíduos 17-22) e, conseqüentemente, bloqueia sua interação com a maquinaria transcricional da célula¹³³. Além disso, faz a mediação da exportação nuclear do p53 e direciona a sua destruição via proteólise mediada por ubiquitinação¹³⁵. O gene MDM2 está amplificado em fração significativa nos mais comuns sarcomas humanos e, conseqüentemente, a superexpressão do MDM2 ocorre para interferir com a atividade do p53¹³³.

Shieh e colaboradores¹³³ demonstraram que, uma vez ocorrido o dano ao DNA, o p53 é fosforilado na serina 15 e este evento faz com que o p53 reduza a sua interação com o Mdm2, seu regulador negativo. Além disso, foi demonstrado que a fosforilação das serinas 15 e 37 por uma proteína quinase dependente de DNA impede a habilidade do Mdm2 para inibir a transativação dependente de p53. Estes efeitos são mais comuns através da mudança conformacional induzida pela fosforilação do p53.

Os mesmos autores propuseram o seguinte mecanismo para o envolvimento do p53 na lesão do DNA: sob condições normais de estresse, o p53 associa-se com seus inibidores e a transativação dependente de p53

é reprimida. Se houver um dano ao DNA, o p53 é fosforilado na serina 15, a qual induz uma mudança conformacional que torna o Mdm2 incapaz de se ligar ao p53, resultando na inibição do efeito do Mdm2 sobre o p53.

A ativação do p53 quase sempre resulta na parada do ciclo celular, presumidamente para que o DNA seja reparado antes da replicação ou da mitose. Foi demonstrado que a inibição da progressão do ciclo celular pelo p53 é, em grande parte, devida à sua habilidade de ativar genes transcricionais que diretamente controlam a atividade de quinases dependentes de ciclina ¹³¹.

Um desses mecanismos pelo qual o p53 controla negativamente o ciclo celular é através da ativação transcricional do P21 (WAF1, Cip-1). O produto da expressão do P21 é a proteína p21 que, em células normais, se liga a vários complexos ciclinas dependentes de quinases (cdk), prevenindo a fosforilação do Rb e tendo, como consequência, a parada das células na fase G1 e G2/M. ¹³⁶

A via do p53 é ativada a partir de um dano ao DNA, cabendo a decisão de ativação de genes apoptóticos, como PUMA e PIG3, que culminarão na morte celular; ou a decisão pela via antiapoptótica, através da ativação transcricional do p21. Assim, este aumento do p21 permite a sobrevivência da célula até a finalização do processo de reparo do DNA.

Além de funcionar como um supressor negativo do p53, o p21 participa como um inibidor da ciclina quinase G1 ¹³⁷, na diferenciação celular ¹³⁸ e na progressão da fase G1 para a fase S do ciclo proliferativo em alguns tipos celulares, podendo ser reconhecida como uma proteína antiapoptótica e promotora do crescimento ¹³⁹.

Os produtos metabólicos intermediários formados foram definidos nas análises RMN 1D e 2D e, sem dúvidas, confirmam a participação desses produtos na ativação de vias gênicas integradas ao processo de carcinogênese; por exemplo, a colina produzida por células tumorais tem a capacidade de se ligar aos receptores do fator de crescimento epidermal (EGFR). A importância da sua caracterização é o alvo para a terapia seletiva em cânceres de cabeça e pescoço, como o gefitinib e erlotinib. ¹⁴⁰

O metabolismo energético é definido como a soma de reações químicas complexas e integradas, por meio das quais tanto os seres humanos quanto os demais animais obtêm energia do ambiente e, assim, mantêm o funcionamento adequado de todos os processos biológicos. O gasto energético estimado por calorimetria indireta não tem padrão uniforme, esses pacientes podem ser hipermetabólicos, normometabólicos ou hipometabólicos, a depender do tipo de tumor, estágio e formas de tratamento empregadas. Um estado de hipermetabolismo ou catabolismo persistente é comum em estados avançados da doença.^{141,142} Em pacientes portadores de carcinoma de pequenas células de pulmão foram relatados aumentos de 37% do gasto energético basal com redução importante no grupo que respondeu à quimioterapia. Elevações nas taxas metabólicas basais têm sido descritas em pacientes portadores de vários tipos de tumores, desde câncer gástrico até sarcomas. Além disso, existem relatos de correlação das alterações do gasto energético em pacientes que se submeteram a ressecções curativas dos tumores¹⁴¹.

O metabolismo dos carboidratos em células tumorais apresenta-se com anormalidades importantes no metabolismo, incluindo intolerância à glicose e resistência periférica à insulina^{141, 142}. As células normais utilizam eficientemente oxigênio para a produção de energia pela via glicolítica, ciclo do ácido cítrico e fosforilação oxidativa. Quando ocorre redução de O₂, o piruvato não é metabolizado no ciclo do ácido cítrico, sendo convertido em lactato para regenerar o NAD (coenzima que constitui o principal receptor de elétrons na oxidação de moléculas alimentares). As células tumorais não conseguem utilizar eficientemente a via glicolítica para produção de ATP, mesmo na presença de O₂. Alterações genéticas nas células transformadas permitem expressão da lactato desidrogenase com desvio metabólico para a produção de lactato e regeneração do NAD em condições de hipóxia.¹⁴³

As células tumorais têm aumento significativo do uso de carbonos de glicose, sendo capazes de captar cerca de 10 a 50 vezes mais em relação às células normais. O aumento da taxa de captação de glicose pelas células tumorais está diretamente relacionado com grau de malignidade e poder de

invasão celular do câncer^{142,143}. Por outro lado, as células normais utilizam glicose preferencialmente na via oxidativa para obtenção de energia. As células tumorais, apesar da diversidade genética para expressar variados fenótipos que correspondem a diferentes graus de diferenciação, são metabolicamente caracterizadas por possuírem alta especificidade na utilização da glicose pelo ciclo da pentose, via metabólica não oxidativa, que libera substratos para síntese de nucleotídeos com regeneração do cofator enzimático NAD reduzido (NADH⁺). As células neoplásicas priorizam a glicose para processos anabólicos, como síntese de nucleotídeos e ribose necessários para produção de RNA e DNA, em detrimento de outras reações, como oxidação da glicose para obtenção de energia e síntese de lipídios e proteínas. Esse desvio metabólico possibilita às células tumorais síntese de purinas e pirimidinas novamente, capacitando-as à rápida proliferação, mesmo em condições de hipóxia¹⁴³. Alterações no metabolismo da glicose secundária ao intenso *turnover* da glicose corpórea em células tumorais podem ser explicadas, em parte, pelo incremento do ciclo de Cori. Nesta via metabólica, a glicose é degradada até lactato pelas células tumorais e o lactato é reconvertido em glicose no nível hepático; neste processo, o lactato proveniente da glicólise anaeróbica liberado pelos tecidos extra-hepáticos (principalmente músculos) é reciclado no fígado, com alto custo energético¹⁴³.

No metabolismo lipídico, as células tumorais apresentam um estímulo à mobilização lipídica (lipólise), aumento da oxidação de ácidos graxos, decréscimo da lipogênese e do clareamento plasmático pela reduzida ação da lipoproteína lípase, resultando geralmente no quadro de caquexia e hiperlipidemia¹⁴³. A perda de tecido adiposo observada em pacientes com câncer que desenvolvem caquexia vem acompanhada por aumento da concentração plasmática de glicerol e ácidos graxos livres, evidenciando aumento de lipólise e diminuição de lipogênese no tecido periférico. Dois mecanismos têm sido propostos para explicar as alterações metabólicas do tecido adiposo: as alterações induzidas por citocinas e as mediadas por fatores produzidos pelo tumor¹⁴³. As perdas de tecido adiposo podem ser

mediadas por citocinas pró-inflamatórias, principalmente o fator de necrose tumoral alfa, por meio da mobilização de ácidos graxos pela inibição da atividade da enzima lipoproteína lípase. A inibição da atividade da lipoproteína lípase nessas condições leva ao aumento da lipólise no tecido adiposo e de ácidos graxos livres no sangue. Essas alterações metabólicas no tecido adiposo, em particular a lipólise, podem ocorrer via adenosina monofosfato cíclico (AMPc), através da ação dos hormônios lipolíticos. Hormônios lipolíticos (epinefrina, glucagon e glicocorticoides) ligam-se ao receptor específico, desencadeando ativação da enzima adenilato ciclase, com consequente aumento de AMPc. O aumento de AMPc leva à ativação de proteína quinase A, que fosforila e ativa a lípase hormônio-sensível. Essa, por sua vez, hidrolisa ácidos graxos a partir de triacilgliceróis, diacilgliceróis e monoacilgliceróis. Os ácidos graxos são então liberados dos monoacilgliceróis através da ação da lípase monoacilglicerol ¹⁴².

A análise metabolômica do melanoma B16F10 por espectroscopia RMN sugere que as células tumorais de melanoma B16F10, em seu crescimento e progressão, tenham uma adaptação e uma reprogramação do metabolismo celular. A carga lipídica e os produtos do metabolismo secundário da via glicolítica estão relacionados com o crescimento e progressão dos tumores dorsais. Isto demonstra que o metabolismo energético sofre variações durante a progressão. Outros aspectos evidenciados nos espectros é a presença de metabólitos, como a prolina, serina e fenilalanina, que sugerem estarem relacionadas com a invasão, progressão e metastização dos tumores dorsais de melanoma B16F10, achados que foram observados nas análises macroscópicas dos animais portadores de melanoma B16F10. Novos achados obtidos recentemente demonstram claramente o perfil metabólico do melanoma e de suas relações entre a carga tumoral, e as proporções das taxas de proliferação e as áreas de necrose e células em processo de apoptose.

A utilização de animais experimentais para o estudo de hepatotoxicidade induzida por drogas tem sido estudada. A hepatotoxicidade é comum e potencialmente grave em resposta adversa à exposição de

drogas, por exemplo, o acetaminofeno (paracetamol). Em análises metabolômicas em ratos Sprague-Dawley tratados com três hepatotoxinas, galactosamina, alilo álcool e acetaminofeno, amostras de urina destes animais submetidas RMN mostraram perfis metabólicos distintos e a existência de pró-drogas específicas para cada toxina. Análises histopatológicas demonstraram correlação entre o grau de necrose hepática e a presença da pró-droga. O *score* da lesão neste modelo foi classificada em classe 1, nenhuma ou mínima necrose hepática, até a classe 3, necrose moderada. Os principais compostos existentes na urina associados à hepatotoxicidade após a administração do acetaminofeno foram a taurina, a trimetilamina-N-óxido (TMAO) e a betaína. A taurina, o composto de maior concentração na urinária, foi associado com maior classe da lesão de necrose, enquanto as maiores concentrações combinadas a TMAO e a betaína foram associados com menor grau da lesão de necrose. Condições observadas neste projeto, animais portadores de melanoma B16F10, após 5º, 15º e 30º dias da implantação e crescimento do tumor dorsal, apresentaram aumento significativo da massa tumoral e área de necrose.

Como já descrito anteriormente, fatores preditivos e diagnósticos em Oncologia são fundamentais e necessitam ser elucidados; para tanto, as análises metabolômicas, fisiopatológicas e da cinética de crescimento e metastatização em cânceres cutâneos mostram neste estudo as evidências de marcadores de progressão e agressividade no modelo de melanoma murino B16F10.

Apoptose e necrose representam dois mecanismos diferentes pelos quais as células morrem. A apoptose é desencadeada por diferentes estímulos e desempenha um papel-chave na supressão de células durante a embriogênese fisiológica, o crescimento e a regressão do tumor. Morfologicamente, é caracterizada por encolhimento da célula, *blebbing* membrana, condensação profunda e marginalização da cromatina nuclear, formação de corpos apoptóticos e fragmentação do DNA em sítios ligantes internucleossômica que dão origem aos múltiplos de 180-200 pares de bases. A apoptose pode também ocorrer após a exposição a muitos

tratamentos, incluindo radiação ionizante e drogas quimioterapêuticas. Em radiação, que é um dos protocolos utilizados no tratamento de câncer, a apoptose tem sido amplamente descrita como o principal mecanismo de radiação induzido a morte celular. Por outro lado, os tratamentos quimioterapêuticos levam à morte celular *in vitro* e *in vivo* através da ativação das vias apoptóticas, como a antraciclina e a doxorubicina. Entretanto, a morte celular por necrose pode ocorrer em resposta a insultos fortes, como isquemia, toxinas, hipertermia e trauma. Necrose é caracterizada por inchaço das células, destruição de organelas, rompimento de membranas, lise da cromatina nuclear, sem condensação, e DNA degradação em um espectro contínuo de tamanhos de pares de bases.

Nestes estudos, a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (^1H -RMN) é uma técnica versátil, dinâmica, não invasiva e não destrutiva extremamente útil na obtenção de informações da bioenergética metabólica e estrutural de células e tecidos. Portanto, tem sido amplamente utilizada para caracterizar o tecido tumoral do tecido normal, para monitorar a progressão do tumor ou a resposta a tratamentos terapêuticos e para identificar sinais associados com a apoptose. Sinais especialmente importantes estreitamente associados a processos de morte celular são os originários de metil (CH_3) e de metileno (CH_2) de cadeias lipídicas.

No presente estudo o objetivo principal foi identificar o perfil espectral específico ^1H -RMN, evidenciando aspectos da fisiopatologia do melanoma e as suas implicações histopatológicas e na expressão de marcadores relacionados às características da apoptose e/ou necrose, vias de sinalização, vias bioenergéticas preferenciais e alternativas do metabolismo intermediário e da proliferação celular.

Os resultados 1D e 2D nas amostras dos tumores de melanoma B16F10 mostraram claramente o aumento significativo dos lipídeos celulares, especialmente na porção CH_2 , nos diferentes períodos de crescimento tumoral, que foram correlacionados positivamente a taxas de proliferação, apoptose e área de necrose. Estudos *in vitro* de RMN demonstraram que a apoptose é induzida em diferentes linhagens de células

tumorais, incluindo as células Jurkat, linfócitos T e B, linfoma Daudi, linfoma de Burkitt, células HUT78, fibroblastos NIH 3T3, células MT4, HeLa e células de leucemia HL60, após a exposição de diferentes estímulos de apoptose, como a privação de soro, doxorrubicina, dexametasona, colcemide, etoposideo e anti-Fas. A RMN nestes casos foi acompanhada pelo aumento da intensidade do sinal dos grupos CH₂ e CH₃, principalmente do grupo CH₂, inversamente, a morte por necrose. Além disso, uma correlação quantitativa entre a progressão da apoptose e das características espectrais dos grupos CH₂ e CH₃ também foi encontrada em células de linfoma T de Jurkat ¹⁴⁴.

Estudos *in vivo* demonstraram que a acúmulo destes lipídeos pode ser um potencial marcador de apoptose. No entanto, deve ser enfatizado que outros estudos mostraram que a acúmulo de lipídeos móveis não pode ser limitada ou específica à apoptose, mas também podem ocorrer no processo de necrose. O aumento destes lipídeos celulares foi observado em regiões necróticas do tumor. Variações quantitativas nos lipídeos por 1H-RMN móveis podem também ser correlacionadas com o estado proliferativo das células tumorais, portanto nossos resultados, ao demonstrar no melanoma B16F10 diferenças significativas nos índices proliferativos nos períodos de 5°, 15° e 25° dias após a implantação do tumor, são pontos importantes na interpretação do perfil metabólico e a progressão tumoral.

A diminuição metabólica da colina foi observada em células de leucemia mieloide HL60 no processo de apoptose induzida por quimioterápicos, como também detectado no modelo deste projeto. Em diminuição acentuada da colina também foi encontrada em tumores cerebrais em resposta à terapia por radiação ¹⁴⁵. Além disso, uma diminuição em fosfocolina é frequentemente observada em tecidos após a quimioterapia e tem sido proposta como um indicador de sucesso no tratamento ¹⁴⁵. É sabido que a colina neste processo contribui para a ressonância da colina, e é uma hipótese, por conseguinte, de que a diminuição na colina seja devida, pelo menos em parte, à degradação da fosfocolina dentro das células; condições que foram definidas nos espectros RMN obtidos e analisadas em

2D. Ademais, também foi demonstrado que a apoptose induzida por quimioterápicos em células de leucemia HL60 é acompanhada pela inibição da biossíntese ou da captação de colina necessárias na formação da fosfatidilcolina.¹⁴⁵

Durante o processo de apoptose induzida, a presença de ceramida também deve ser considerada, especialmente no que diz respeito à colina. As ceramidas são lipídios endógenos pertencentes à classe dos esfingolipídios, presentes em grandes quantidades no estrato córneo da derme, protegendo o organismo contra as constantes agressões químicas e físicas. Desempenham também papel fundamental nos fenômenos de estruturação e manutenção da dupla camada lipídica, exercendo em decorrência disso um papel direto e indireto na função de barreira da epiderme e nos fenômenos de retenção de água. São importantes nos processos de diferenciação, de proliferação e de apoptose celular e podem modular a atividade dos queratinócitos e, portanto, a regeneração cutânea. Tem sido demonstrado que a deficiência de colina induz à apoptose tanto *in vitro* como *in vivo*. Em particular, a deficiência de colina em células PC12 apoptose é mediada por acumulação de ceramida e ativação da caspase.

Um aumento significativo de colina demonstrado nas amostras de melanoma B16F10 foi acompanhado pela diminuição significativa da caspase 3. O aumento significativo no conteúdo de CH2 observado no presente estudo pode ser devido, pelo menos em parte, a uma contribuição da presença de classe dos esfingolipídios de cadeias longas.

Glicerolfosfocolina (GPC) é um metabólito que está diretamente relacionado ao estado da membrana celular, uma vez que não há vias de anabolizantes conhecidas até o presente momento que conduzam à sua produção, mas é constituída exclusivamente por quebra catabólica de fosfatidilcolina. Em nossos resultados possivelmente há uma relação direta entre o aumento da GPC em células em apoptose nos períodos de 5° e 15° dias de implantação das células tumorais B16F10, o que não ocorre após 25° dias de crescimento, quando foi detectado um aumento significativo das células em processo de necrose e redução da taxa de proliferação celular.

Uma diminuição significativa na taurina também foi observada em tumores melanoma, após 5°, 15° e 25° dias de crescimento. Estes dados estão de acordo com estudo realizado utilizando-se a sonda HRMAS-¹H-RMN, no qual foi observada uma diminuição significativa de taurina em células de glioma de ratos submetidos à fase tardia de apoptose.¹⁴⁶

Além dos compostos acima identificados, destaca-se a taurina. A taurina ou ácido 2-aminoetanossulfônico é um ácido orgânico contendo enxofre, encontrado na bile. É um dos aminoácidos não essenciais mais abundantes do nosso organismo, especialmente no sistema nervoso central, nos músculos esqueléticos, no coração e no cérebro, bem como nos intestinos e ossos esqueléticos. Não é utilizado para a síntese de proteína, mas é encontrado desacoplado no compartimento intracelular de diferentes tipos celulares. Atua em conjunto com a glicina e o ácido gama-aminobutírico como um neurotransmissor inibidor. É sintetizado, no fígado e no cérebro, a partir da metionina e cisteína, juntamente com a vitamina B6. Atua como emulsionante dos lipídeos, no intestino delgado, promovendo a sua absorção intestinal, já que é um dos ácidos mais abundantes da bile (ácido quenodesoxicólico). A taurina age ainda como transmissor metabólico, responsável pela estabilização da membrana celular, formação dos sais biliares, antioxidação, manutenção da homeostase do cálcio e osmorregulação.¹⁴⁷

O aumento das áreas de necrose nos tumores a partir do 15º dia de implantação do melanoma B16F10; o acúmulo da taurina pode ser devido à desregulação osmótica em associação ao aumento da glutamina e glutamato encontrado em células de melanoma em processo de necrose, uma vez que estes metabólitos também são importantes osmólitos. O lactato foi aumentado significativamente durante o crescimento e o aumento das áreas de necrose no melanoma B16F10.

O inositol (C₆H₁₂O₆) é um composto que atua como fator de crescimento em células e microrganismos, frequentemente utilizado como vitamina associada ao complexo B. Também é chamado de dambose. Inositol (que é encontrado de modo mais abundante na forma de mio-

inositol, cis-1,2,3,4-trans-4,6-cicloexanoexol) é um poliálcool cíclico que desempenha um importante papel como base estrutural para mensageiros secundários em células eucarióticas tais como inositol fosfatos (IPn). Participa de inúmeras vias de sinalização e mensageiros secundários, estando envolvido em vários processos biológicos, tais como montagem do citoesqueleto, controle da concentração intracelular do íon Ca^{2+} , manutenção do potencial de membrana das células, modulador da atividade da insulina, quebra das gorduras e redução dos níveis de colesterol no sangue.

Estudos correlacionam o Mio-inositol (MI) com o grau de diferenciação de tumores cerebrais. Por ser uma molécula que está localizada no interior dos astrócitos, presume-se sua atuação como um osmólito. Sua concentração é alterada em muitos distúrbios cerebrais. MI também está envolvida na ativação da proteína C quinase. Proteína quinase C leva à produção de enzimas proteolíticas, que são encontrados com mais frequência em tumores primários cerebrais malignos e agressivos. Assim, Castilho e colaboradores demonstraram que os níveis de MI, como visto pela espectroscopia de ressonância magnética (HMRS), podem ser úteis para prever o grau histológico de tumores cerebrais, sabendo-se que níveis elevados de colina sugerem celularidade aumentada ou renovação celular. Embora a maioria dos tumores malignos possua aumento dos níveis de colina (CHO), estes podem também ser vistos em tumores benignos. Os tumores malignos também demonstram a presença de lipídios e de lactato, mas estes metabólitos também estão presentes em tumores tratados anteriormente, independente do seu grau histológico. Estas observações condizem com os achados, referente aos níveis de MI, colina e creatina.

Em tumores, há aumento da produção de lactato pela via glicolítica anaeróbica, nas células tumorais e, em consequência, ocorre acentuação do ciclo de Cori e da gliconeogênese hepática. Este processo ocorre a partir de precursores, tais como o lactato e aminoácidos gliconeogênicos, em especial, a alanina, largamente mobilizado das proteínas do músculo esquelético pela ação de mediadores liberados pela neoplasia maligna. Há

também um aumento na utilização de glicose, uma característica que confere a este carboidrato a fonte energética preferencial dos tumores malignos.²⁸

Kallinowsky e colaboradores mostraram, *in vitro* e *in vivo* com dois tipos de cânceres humanos transplantados para ratos deficientes de células T, que o consumo de glicose estava elevado e que 97% dos tumores liberavam uma quantidade de lactato linearmente relacionada com a utilização de glicose. O lactato também é fragmentado, liberando íons de hidrogênio (H⁺) que se acumulam no interior das células tumorais. Em consequência, o tumor torna-se levemente ácido, com um pH de 6,5 a 6,9, a acidez é o resultado de um metabolismo anormal de glicose.

Outro aspecto que pode ser avaliado é a interação entre o metabolismo intermediário e estresse oxidativo normal em células tumorais. As moléculas energéticas são inicialmente degradadas no citoplasma e a degradação continua nas mitocôndrias pelas enzimas do ciclo de Krebs e da fosforilação oxidativa, produzindo água, CO₂ e energia. Partículas arredondadas de mais ou menos 9 nm de diâmetro, que se prendem por um pedúnculo à face interna da membrana interna da mitocôndria, contêm as enzimas da fosforilação de ADP (difosfato de adenosina) transformando-a em ATP. As partículas elementares são constituídas por várias proteínas formando um complexo que apresenta atividade ATP sintetase capaz de formar ATP a partir de ADP e fósforo inorgânico. A teoria mais aceita sobre o funcionamento das mitocôndrias (teoria quimiosmótica) admite que a síntese de ATP ocorra por um fluxo de prótons através das partículas elementares. Os produtos metabólicos formados diretamente por esta organela estão implicados no metabolismo intermediários de vários tipos de tumores e têm-se relacionado aos níveis de apoptose e necrose com potencial prognóstico.¹⁴⁹

A quantidade de mitocôndrias e o número de cristas por organela são proporcionais ao metabolismo das células. As que apresentam alto metabolismo, como é o caso das células do músculo estriado cardíaco, têm grande quantidade de mitocôndrias, com elevado número de cristas

dispostas compactamente. As mitocôndrias podem ter funções especializadas em tipos particulares de células. O ciclo da ureia, por exemplo, é a rota metabólica central pela qual os mamíferos eliminam os produtos finais do metabolismo celular que contenham nitrogênio. Esses produtos são excretados na urina na forma de ureia. Enzimas da matriz mitocondrial codificadas pelo núcleo são responsáveis por várias etapas do ciclo. A síntese de ureia ocorre somente em alguns tecidos, como o fígado, e as enzimas necessárias são sintetizadas e importadas para as mitocôndrias somente nestes tecidos. Adicionalmente, os complexos enzimáticos respiratórios da membrana mitocondrial interna de mamíferos contêm várias subunidades proteicas, que são tecido específico e codificado pelo núcleo, acreditando-se que atuem como reguladoras do transporte de elétrons. Dados bioquímicos apresentados nesta etapa do projeto demonstram as interações entre as vias e os compostos produzidos e as suas interações durante o período de crescimento tumoral, a diferenças significativas no início (5º dias) e após os 25º dias da implantação, que nesta análise deve-se destacar a relação de aumento das áreas de necrose e a perda funcional hepática e renal.

Portanto, componentes produzidas dependentes da via intrínseca mitocondrial podem favorecer a produção de metabólitos, como a d-glicose, entre outros, como as cargas lipídicas, e nas concentrações de glicerol, colina, fosfocolina, lactato, aspartato, alanina, mioinositol, taurina, acetato e creatina, para servirem de substratos para o catabolismo anaeróbico e a indução de apoptose, como também a produção de radicais livres oxidantes de moléculas bioativas, como a liberação do citocromo-c e a lipoperoxidação de lipídeos poli-insaturados de membrana celular. (Figuras 28 – 39)

7 CONCLUSÃO

As alterações no metabolismo das células tumorais estão intrinsecamente ligadas à origem ou ao tipo celular do tumor. Estas ligações estão estabelecidas em muitos cenários distintos.

Em primeiro lugar, a reprogramação metabólica pode ocorrer por eventos oncogênicos e não metabólicos. Assim, os principais eventos oncogênicos, como a ativação constitutiva de vias do fator de crescimento, a ativação de fatores de transcrição e a inativação de p53, podem ser a causa comum de programação metabólica, porque induzem ao crescimento autônomo, à resistência a apoptose, à replicação ilimitada, e à angiogênese.

Em segundo lugar, a característica clássica do câncer pode ser condicionada pela reprogramação metabólica. Assim, os principais defeitos metabólicos podem contribuir para a resistência à apoptose, à invasão, à metástase e à imunossupressão.

Por último, é necessário considerar a evolução das distintas características de malignidade. A relação causa-efeito entre os metabólicos específicos do tumor e os agentes não metabólicos é também condicionada pela necessidade das células tumorais de se proliferarem ao mesmo tempo e subverterem vários mecanismos celulares intrínsecos e extrínsecos num microambiente.

Neste estudo, a análise metabolômica do melanoma B16F10 por espectroscopia RMN 1D e 2D mostrou que as células tumorais de melanoma B16F10, em seu crescimento e progressão, têm uma adaptação e uma reprogramação do metabolismo celular.

A carga lipídica e os produtos do metabolismo secundário da via glicolítica estão relacionados com o crescimento e a progressão dos tumores dorsais e com a formação de metástases, os quais foram quantitativamente determinados durante o crescimento tumoral.

A cinética das proporções desses metabólitos representam potentes marcadores tumorais. Isto demonstra que metabolismo energético sofre variações durante a progressão dos tumores e que este processo

seguramente é um dos fatores que em conjunto regulam as atividades de morte celular do tipo apoptose e das vias intrínsecas na mitocôndria.

A taurina, outro composto obtido neste estudo, talvez possa ser um biomarcador metabólico, atuando como um transmissor metabólico. É responsável, entre outras funções, pela estabilização da membrana celular, que seguramente, no melanoma ou em outros tipos tumorais, pode ser de fundamental importância no desenvolvimento de mecanismo de escape de defesa e de regulação do crescimento celular.

A presença de metabólitos como a prolina, serina, fenilalanina cargas lipídicas e, nas concentrações de glicerol, colina, fosfocolina, lactato, aspartato, alanina, mioinositol, taurina, acetato e creatina estão relacionados com a invasão, a progressão e a metastização dos tumores dorsais de melanoma B16F10 dos animais no 5^o e 25^o de crescimento tumoral diferencialmente obtidos no RMN-2D. Estes dados corroboram as determinações dos marcadores celulares que mostraram correlações positivas na progressão deste tipo tumoral.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Jimbow K, Quevedo WC, Prota G et al. Biology of melanocytes. In: Freedberg, IM, Eisen, AZ, Wolff, K et al., editores. *Dermatology in General Medicine*. 5th ed. New York: McGraw-Hill, 1999: v.1, 192–220.
2. Meyskens FL Jr, McNulty SE, Buckmeier JA et al. Aberrant redox regulation in human metastatic melanoma cells compared to normal melanocytes. *Free Radical Biology and Medicine*. 2001;31:799–808.
3. Nappi AJ, Vass E. Hydrogen peroxide generation associated with the oxidations of eumelanogenic precursors 5,6-dihydroxyindole and 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid. *Melanoma Research*. 1996;6:341–9.
4. Slominski A, Wortsman J, Carlson AJ et al. Malignant melanoma: an update. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 2001;125:1295–305.
5. Brown TJ, Nelson BR. Malignant melanoma: a clinical review. *Cutis: Cutaneous Medicine for the Practitioner*. 1999;63:275–84.
6. Lejeune FJ. The management of malignant melanoma revisited. *Acta Chirurgica Belgica*. 1997;97:209–14.
7. Bostock DE. Neoplasms of the skin and subcutaneous tissues in dogs and cats. *British Veterinary Journal* 1986;142:1–19.
8. Patnaik AK, Mooney S. Feline melanoma: a comparative study of ocular, oral, and dermal neoplasms. *Veterinary Pathology* 1988;25:105–12.
9. LaBonne C, Bronner-Fraser M. Induction and patterning of the neural crest, a stem cell like precursor population. *Journal of Neurobiology* 1998;36:175–89.
10. Rawles ME. Origin of melanophores and their role in development patterns in vertebrates. *Physiological Reviews*. 1948;28:383.
11. Eisenger M, Marko O. Selective proliferation of normal human melanocytes in vitro in the presence of phorbol ester and cholera toxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 1982;79:2018–22.
12. Tsatmali M, Ancans J, Thody AJ. Melanocyte function and its control by melanocortin peptides. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 2002;50:125–33.
13. Olivares C, Jimenez-Cervantes C, Lozano JA. et al. The 5,6-dihydroxyindole-2 carboxylic acid (DHICA) oxidase activity of human tyrosinase. *Biochemistry Journal*. 2001;354:131–9.

14. Ortonne JP, Prota G. Hair melanins and hair color: ultrastructural and biochemical aspects. *Journal of Investigative Dermatology*. 1993;101:82S–9S.
15. Hunt G, Kyne S, Ito S. et al. Eumelanin and pheomelanin contents of human epidermis and cultured melanocytes. *Pigment Cell Research*. 1995;8:202–8.
16. Potterf SB, Virador V, Wakamatsu K et al. Cysteine transport in melanosomes from murine melanocytes. *Pigment Cell Research*. 1998;12:4–12.
17. Hearing VJ. Biochemical control of melanogenesis and melanosomal organization. *Journal of Investigative Dermatology*. 1999. Symposium Proceedings. 4:24–48.
18. Barsh GS. Pigmentation, pleiotropy and genetic pathways in humans and mice. *American Journal of Human Genetics*. 1995;57:743–7.
19. Barsh GS. The genetics of pigmentation: from fancy genes to complex traits. *Trends in Genetics*. 1996;12:229–305.
20. Smith R, Healy E., Siddiqui S et al. Melanocortin 1 receptor variants in an Irish population. *Journal of Investigative Dermatology*. 1998;111:119–22.
21. Astner S et al. Skin phototypes 2003. *J Invest Dermatol*. 2004;122:xxx-xxxi.
22. Cleaver JE. Cancer in Xeroderma pigmentosum and related disorders of DNA repair. *Nat Rev Cancer*. 2005;5:564-73
23. Varley JM. Germline TP53 mutations and Li-Fraumeni syndrome. *Hum Mutat*. 2003;21:313-20
24. Dancy AL. A review of diagnostic imaging in melanoma. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2008.
25. Daviss B. Growing pains for metabolomics. *The Scientist*. 2005; 19(8):25-28.
26. Oliver SG, Winson MK, Kell DB, Baganz F. Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends Biotechnol*. 1998; 16(10):373–378.
27. Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. Metabonomics: understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica*. 1999; 11:1181-9.

28. Harrigan GG, Goodacre R. *First book on metabolomics — Metabolic Profiling: Its Role in Biomarker Discovery and Gene Function Analysis*. Kluwer Academic; 2003.
29. Fiehn O, Kloska S and Altmann T. Integrated studies on plant biology using multiparallel techniques. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2001; 12(1):82–6.
30. Lindon JC, Holmes E, Nicholson JK. Toxicological applications of magnetic resonance. *Nuclear Reson Spectrosc.* 2004; 45:109-143.
31. Fiehn O. Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks. *Comp. Funct. Genomics.* 2001; 2(3):155–68.
32. Wishart DS, Tzur D, Knox C, Eisner R, Guo AC, Young N, Cheng D, Jewell K, Arndt D, Sawhney S, Fung C, Nikolai L, Lewis M, Coutouly MA, Forsythe I, Tang P, Shrivastava S, Jeroncic K, Stothard P, Amegbey G, Block D, Hau DD, Wagner J, Miniaci J, Clements M, Gebremedhin M, Guo N, Zhang Y, Duggan GE, Macinnis GD, Weljie AM, Dowlatabadi R, Bamforth F, Clive D, Greiner R, Li L, Marrie T, Sykes BD, Vogel HJ, Querengesser L. The Human Metabolome Database. *Nucleic Acids Research (Database Issue)*. 2007; 6:523.
33. Saghatelian A. Assignment of endogenous substrates to enzymes by global metabolite profiling. *Biochemistry.* 2004; 16:43-5.
34. Tomita M, Nishioka T. *Metabolomics: The Frontier of Systems Biology*. Springer; 2005.
35. Wolfram J, Weckwerth W. *Metabolomics: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology)*. Humana Press; 2006.
36. Mazurek S, Grimm H, Boschek CB, Vaupel P, Eigenbrodt E. Pyruvate kinase type M2: a crossroad in the tumor metabolome. *The British Journal of Nutrition.* 2002; 87: 23–9.
37. Mazurek S, Eigenbrodt E. "The tumor metabolome". *Anticancer Research.* 2003; 23:1149–54.
38. Santini MT, Ferrante A, Romano R, Rainaldi G, Motta A, Donelli G, Vecchia P, Indovina PL. A 700 MHz 1H-NMR study reveals apoptosis-like behavior in human K562 erythroleukemic cells exposed to a 50 Hz sinusoidal magnetic field. *International Journal of Radiation Biology.* 2005;81:97-113.
39. Wu H, Southam AD, Hines A, Viant MR. High-throughput tissue extraction protocol for NMR and MS-based metabolomics. *Analytical Biochemistry.* 2008; 372:204–12.
40. Kim YS, Maruvada P, Milner JA. Metabolomics in biomarker discovery: future uses for cancer prevention. *Metabolomics.* 2007; 3:12-78.

41. Fan TW, Lane AN, Higashi RM. The promise of metabolomics in cancer molecular therapeutics. *Curr Opin Mol Ther.* 2004; 6(6):584-92.
42. Ou-Yang J, Wu MH, Huang C, Li D, Zhou M, Li XL, Li GY. Metabolomics and its application in malignant tumors. *Cancer Research.* 2007; 32(2):221-5.
43. Frickenschmidt A, Frohlich H, Bullinger D, Zell A, Laufer S, Gleiter CH, Liebich H, Kammerer B. Metabonomics in cancer diagnosis: mass spectrometry-based profiling of urinary nucleosides from breast cancer patients. *Biomarkers.* 2008; 13(4):435-49.
44. Brindle JT, Antti H, Holmes E, Tranter G, Nicholson JK, Bethell HW, Clarke S, Schofield PM, McKilligan E, Mosedale DE, Grainger DJ. Rapid and non-invasive diagnosis of the presence and severity of coronary heart disease using ^1H NMR - metabonomics. *Nature Medicine.* 2002; 8(12):1439-44.
45. Bollard ME, Stanley EG, Lindon JC, Nicholson JK, Holmes E. NMR-based metabonomic approaches for evaluating physiological influences on biofluid composition. *NMR Biomed.* 2005; 18:143–62.
46. Lindon JC, Holmes E, Bollard ME, Stanley EG, and Nicholson JK. Metabonomics technologies and their applications in physiological monitoring, drug safety assessment and disease diagnosis. *Biomarkers.* 2004; 9:1-31.
47. Lindon JC, Holmes E, Bollard ME, Stanley EG, and Nicholson JK. Metabonomics technologies and their applications in physiological monitoring, drug safety assessment and disease diagnosis. 2004; *Biomarkers.* 9:1-31.
48. Rabi S, Millman P, Kusch JR, Zacharias. The Molecular Beam Resonance Method for Measuring Nuclear Magnetic Resonance. *Phys. Rev;* 1939.
49. Gil VM; Geraldés CF. *Ressonância Magnética Nuclear.* Fundamentos, Métodos e Aplicações. 2.^a ed. 2002.
50. Purcell EM, Torrey EC, Pound RV. Resonance Absorption by Nuclear Magnetic Moments in a Solid. *Phys. Rev.* 1946; 69:37-38.
51. Bloch F. Nuclear induction. *Phys. Rev.* 1946; 460–474,.
52. Bloembergen N, Pound RV; Purcell E M. Nuclear Magnetic Relaxation. *Phys. Rev.* 1947; 70:989,.
53. Grant DM, Harris RK. *Encyclopedia of Nuclear Magnetic Resonance.* Historical Perspectives. 1. 1996.

54. Berden JA, Cullis PR, Hoult DI, McLaughlin AC, Radda GK, Richards RE. Frequency dependence of ^{31}P NMR linewidths in sonicated phospholipid vesicles: Effects of chemical shift anisotropy. *FEBS Lett.* 1974;46:55-8.
55. Burt CT, Glonek T, Barany M. Analysis of phosphate metabolites, the intracellular pH, and the state of adenosine triphosphate in intact muscle by phosphorus nuclear magnetic resonance. *J Biol Chem.* 1976;251:2584-91.
56. Hoult DI, Busby SJ, Gadian DG, Radda GK, Richards RE, Seeley PJ. Observation of tissue metabolites using ^{31}P nuclear magnetic resonance. *Nature.* 1974; 252:285-7.
57. Lauterbur PC. Image formation by induced local interactions: Examples employing nuclear magnetic resonance. *Nature.* 1973; 242:190-1.
58. Andrew ER, Bottomley PA, Hinshaw WS, Holland GN, Moore WS, Simaraj C. NMR images by the multiple sensitive point method: Application to larger biological systems. *Phys Med Biol.* 1977; 22:971-974.
59. Hinshaw WS, Bottomley PA, Holland GN. Radiographic thin-section image of the human wrist by nuclear magnetic resonance. *Nature.* 1977; 270:722-3.
60. Podo F. Tumour phospholipid metabolism. *NMR Biomed.* 1999; 12:413-39.
61. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science.* 1956; 123:309-14.
62. Pedersen PL. Tumor mitochondria and the bioenergetics of cancer cells. *Prog Exp Tumor Res.* 1978; 22:190-274.
63. Morton R, Waite M, Hartz J, Cunningham C, Morris HP. The composition and metabolism of microsomal and mitochondrial membrane lipids in the Morris 7777 hepatoma. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1977; 92:381-403.
64. Crain RC, Clark RW, Harvey BE. Role of lipid transfer proteins in the abnormal lipid content of Morris hepatoma mitochondria and microsomes. *Cancer Res.* 1983; 43:3197-202.
65. Nishizuka Y. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science.* 1992; 258, 607-14.
66. Podo F, Certaines JD. Proceedings of the Special Symposium on Lipid Metabolism and Function in Cancer. Significance of Magnetic Resonance Spectroscopy (MRS) Measurements in Relation to Biochemical Processes and Cellular Control. *Anticancer Res.* 1996; 16:1305-594.
67. Chatham JC, Blackband. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy and Imaging in Animal Research. *ILAR Journal.* 2001; 42(3): 189-208.

68. Tomlins A, Foxall PJD, Lindon JC, Lynch JM, Spraul M, Everett JR, Nicholson JK. High resolution magic angle spinning ^1H nuclear magnetic resonance analysis of intact prostatic hyperplastic and tumour tissues. *Anal Commun.* 1998; 35:113-5.
69. Garrod SL, Humpfer E, Spraul M, Connor SC, Polley S, Connelly J, Lindon JC, Nicholson JK, Holmes E.. High-resolution magic angle spinning ^1H NMR spectroscopic studies on intact rat renal cortex and medulla. *Magn Reson Med.* 1999; 41:1108-18.
70. Cheng LL, Chang IW, Louis DN, Gonzalez RG. Correlation of high-resolution magic angle spinning proton magnetic resonance spectroscopy with histopathology of intact human brain tumor specimens. *Cancer Res.* 1998; 58:1825-32.
71. Lindon JC, Holmes E, Nicholson JK. Metabonomics Techniques and Applications to Pharmaceutical Research & Development. *Pharmaceutical Research.* 2006; 23:6.
72. Odunsi K. Cancer diagnostics using ^1H -NMR-based metabonomics. *NMR in medicine.* 2006; 32:123.
73. Foxall PJ, Lenz EM, Lindon JC, Neild GH, Wilson ID, Nicholson JK. NMR and HPLC-NMR studies on the toxicity and metabolism of ifosfamide. *Ther Drug Monit.* 1996; 18:498-505.
74. Kaplan O, Jaroszewski JW, Clarke R, Fairchild CR, Schoenlein P, Goldenberg P, Gottesman MM, Cohen JS. The multidrug resistance phenotype: ^{31}P nuclear magnetic resonance characterization and 2-deoxyglucose toxicity. *Cancer Res.* 1991; 51:1638-44.
75. Stegman LD, Benyoseph O, Freyer JP, Ross PB. In Vivo ^{31}P MRS Evaluation of Ganciclovir Toxicity in C6 Gliomas Stably Expressing the Herpes Simplex Thymidine Kinase Gene. *NMR Biomed.* 1996; 9:364-8.
76. Morvan D, Demidem A, Papon J, Madelmont JC. Melanoma Tumors Acquire a New Phospholipid Metabolism Phenotype under Cysteamine As Revealed by High-Resolution Magic Angle Spinning Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy of Intact Tumor Samples. *Cancer Res.* 2002; 62:1890-7.
77. Morvan D, Demidem A, Papon J, Madelmont JC. Quantitative HRMAS Proton Total Correlation Spectroscopy Applied to Cultured Melanoma Cells Treated by Chloroethyl Nitrosourea: Demonstration of Phospholipid Metabolism Alterations. *Magnetic Resonance in Medicine.* 2003; 49:241-8.
78. Hoult DI, Busby SJ, Gadium DG, Radda GK, Richards RE, Seeley PJ. Observation of tissue metabolites using ^{31}P nuclear magnetic resonance. *Nature.* 1974; 252:285.

79. Gadian DG, Radda GK. NMR Studies of Tissue Metabolism. *Ann Rev Biochem.* 1981;50:69.
80. Scott AI, Baxter RL. Applications of ¹³C NMR to metabolic studies. *Ann Rev Biophys Bioeng.* 1981;10:151.
81. Brown FF, Campbell ID. NMR studies of red cells. *Phil Trans R Soc London.* 1980;289:395.
82. Robey RB, Hay N. *Oncogene.* 2006; 25: 4683–96. Warburg O. *The metabolism of tumours.* Constable: London; 1930.
83. Kroemer G. Mitochondria in cancer. *Oncogene.* 2006; 25, 4630–2
84. SOENGAS, M. S.; LOWE, S. W. Apoptosis and melanoma hemoresistance. *Oncogene.* 2003;22:3138-51.
85. Butler M, Dawson M. *Cell culture labfax*, 1st ed. Academic Press; 1992: 247.
86. Bottomley PA. NMR imaging techniques and applications: a review. *Rev Sci Instrum.* 1982 Sep; 53(9):1319-37.
87. Hernandez-Vargas H, Palacios J, Moreno-Bueno G. Telling cells how to die: docetaxel therapy in cancer cell lines. *Cell Cycle.* 2007;6:780–3.
88. Ramirez de Molina A, Gallego-Ortega D, Sarmentero-Estrada J, Lagares D, Gomez Del Pulgar T, Bandres E, Garcia-Foncillas J, Lacal JC. Choline kinase as a link connecting phospholipid metabolism and cell cycle regulation: implications in cancer therapy. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008;40:1753–63.
89. Amores-Sanchez MI, Medina MA. Glutamine, as a precursor of glutathione, and oxidative stress. *Mol Genet Metab.* 1999;67:100-5.
90. Loiseau D, Morvan D, Chevrollier A, Demidem A, Douay O, Reynier P, Stepien G. Mitochondrial bioenergetic background confers a survival advantage to HepG2 cells in response to chemotherapy. *Mol Carcinog.* 2009;48:733–41.
91. Griguer CE, Oliva CR, Gillespie GY. Glucose metabolism heterogeneity in human and mouse malignant glioma cell lines. *J Neurooncol.* 2005;74:123–33.
92. Howe FA, Opstad KS. ¹H MR spectroscopy of brain tumours and masses. *NMR Biomed.* 2003;16:123-131.
93. Tate AR, Underwood J, Acosta DM, Julia-Sape M, Majos C, Moreno-Torres A, Howe FA, Graaf van der M, Lefournier V, Murphy MM, et al. Development of a decision support system for diagnosis and grading of brain

tumours using in vivo magnetic resonance single voxel spectra. *NMR Biomed.* 2006;19:411-34.

94. Calli C, Kitis O, Yuntan N, Yurtseven T, Islekel S, Akalin T. Perfusion and diffusion MR imaging in enhancing malignant cerebral tumors. *Eur J Radiol.* 2006;58:394-403.

95. Cheng LL, Ma MJ, Becerra L, Ptak T, Tracey I, Lackner A, Gonzalez RG. Quantitative neuropathology by high resolution magic angle spinning proton magnetic resonance spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997;94:6408-13.

96. Cheng LL, Anthony DC, Comite AR, Black PM, Tzika AA, Gonzalez RG. Quantification of microheterogeneity in glioblastoma multiforme with ex vivo high-resolution magic-angle spinning (HRMAS) proton magnetic resonance spectroscopy. *Neuro Oncol* 2000, 2:87-95.

97. Cheng LL, Chang IW, Louis DN, Gonzalez RG. Correlation of high-resolution magic angle spinning proton magnetic resonance spectroscopy with histopathology of intact human brain tumor specimens. *Cancer Res.* 1998;58:1825-32.

98. Martinez-Bisbal MC, Marti-Bonmati L, Piquer J, Revert A, Ferrer P, Llacer JL, Piotta M, Assemat O, Celda B. ¹H and ¹³C HR-MAS spectroscopy of intact biopsy samples ex vivo and in vivo ¹H MRS study of human high grade gliomas. *NMR Biomed.* 2004;17:191-205.

99. Opstad KS, Bell BA, Griffiths JR, Howe FA. Toward accurate quantification of metabolites, lipids, and macromolecules in HRMAS spectra of human brain tumor biopsies using LCModel. *Magn Reson Med.* 2008;60:1237-42.

100. Jeener J, Broekaert P. "Nuclear Magnetic Resonance in Solids : Thermodynamic Effects of a Pair of rf Pulses". *Phys Rev.* 1967;157:232-40. doi:10.1103/PhysRev.157.232.

101. Alger JR. "The 1991 Nobel Prize in chemistry awarded to an MRI investigator.". *Journal of computer assisted tomography.* 1992;16(1):1-2. doi:10.1097/00004728-199201000-00001. PMID 1729287

102. Broberg A, Kenne L, Pedersén M. In-situ identification of major metabolites in the red alga *Gracilariopsis lemaneiformis* using high-resolution magic angle spinning nuclear magnetic resonance spectroscopy. 1998;206(2): 300-7. DOI: 10.1007/s004250050404

103. Pedersen PL. Tumor mitochondria and the bioenergetics of cancer cells. *Prog Exp Tumor Res.* 1978;22:190-274.

104. Scott AI, Baxter RL. Applications of ¹³C NMR to metabolic studies. *Ann Rev Biophys Bioeng.* 1981;10:151.

105. Brown FF, Campbell ID. NMR studies of red cells. *Phil Trans R Soc London*. 1980;289:395.
106. Robey RB, Hay N. *Oncogene*. 2006;25:4683–96. Warburg O. *The metabolism of tumours*. Constable: London; 1930
107. Jackowski S. Cell cycle regulation of membrane phospholipid metabolism. *J. Biol. Chem*. 1996; 271:20219–222.
108. Jackowski S. Coordination of membrane phospholipid synthesis with the cell cycle. *J Biol Chem*. 1994;269,3858–67.
109. Szwegold BS, Shaller C, Kappler F, Aiken NR, Stoyanova R, Brown T. R. Effects of mitogenic stimulation on choline and phosphatidylcholine metabolism in mammalian cells. In: Abstracts of the 4th Annual Meeting of the International Society for Magnetic Resonance in Medicine. 1996;268.
110. Griffiths JR, Cady E, Edwards RHT, McCready VR, Wilkie DR, Wiltshaw E. ³¹P-NMR studies of a human tumour in situ. *The Lancet i*. 1983;1435–36.
111. Proietti E, Carpinelli G, Di Vito M, Belardelli F, Gresser I, Podo F. ³¹P nuclear magnetic resonance analysis of interferon induced alterations of phospholipid metabolism in interferon sensitive and interferon-resistant Friend leukemia cell tumors in mice. *Cancer Res*. 1986;46:2849–57.
112. Podo F, Carpinelli G, Di Vito M, Giannini M, Proietti E, Fiers W, Gresser I, Belardelli F. Nuclear magnetic resonance analysis of tumor necrosis factor-induced alterations of phospholipid metabolites and pH in Friend leukemia cell tumors and fibrosarcomas in mice. *Cancer Res*. 1987;47:6481–6489.
113. Belardelli F, Proietti E, Ciolli V, Sestili P, Carpinelli G, Di Vito M, Ferretti A, Woodrow D, Boraschi D, Podo F. Interleukin-1-b induces tumor necrosis and early morphologic and metabolic changes in transplantable mouse tumors. Similarities with the anti-tumor effects of tumor necrosis factor a or b. *Int J Cancer*. 1989;44:116-23.
114. Kroemer G. Mitochondria in cancer. *Oncogene*. 2006;25:4630–2
115. Fu Y-M, Yu Z-X, Pelayo BA, Ferrans VJ, Meadows GG. Focal adhesion kinase-dependent apoptosis of melanoma induced by tyrosine and phenylalanine deficiency. *Cancer Res*. 1999;59:758–65.
116. Fu Y-M, Yu Z-X, Ferrans VJ, Meadows GG. Tyrosine and phenylalanine restriction induces G0/G1 cell cycle arrest in murine melanoma in vitro and in vivo. *Nutr Cancer*. 1997;29:104–13.
117. Fu Y-M, Zhang H, Ding M, Li Y-Q, Fu X, Yu Z, Meadows GG. Specific amino acid restriction inhibits attachment and spreading of human melanoma via modulation of the integrin/focal adhesion kinase pathway and actin cytoskeleton remodeling. *Clin Exp Metastasis*. 2004;21:587–98.

118. Abdallah RM, Starkey JR, Meadows GG. Dietary restriction of tyrosine and phenylalanine: inhibition of metastasis of three rodent tumors. *J Natl Cancer Inst.* 1987;78:759-66.
119. Elstad CA, Meadows GG, Abdallah RM. Specificity of the suppression of metastatic phenotype by tyrosine and phenylalanine restriction. *Clin Exp Metastasis.* 1990;8:393-416.
120. Norris JR, Meadows GG, Massey LK, Starkey JR, Sylvester DM, Liu S-Y. Tyrosine- and phenylalanine-restricted formula diet augments immunocompetence in healthy humans. *Am J Clin Nutr.* 1990;51:188-96.
121. Norris JR, Meadows GG., Massey LK, Starkey JR, Sylvester DM, Liu S-Y. Tyrosine- and phenylalanine-restricted formula diet augments immunocompetence in healthy humans. *Am J Clin Nutr.* 1990;51:188-96.
122. Furuya Y, Ohta S, Yasuda K, Ito H. Enhanced expression of cyclindependent kinase inhibitor in apoptosis of androgen-independent prostatic cancer line induced by calcium ionophore. *Anticancer Res.* 1997;17:2391-4.
123. Meadows GG, Abdallah RM, Starkey JR. Interaction between specific dietary factors and experimental chemotherapy of metastatic melanoma. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 1986;16:229-36.
124. Yoshioka T, Wada T, Uchida N, Maki H, Yoshida H, Ide N, Kasai H, Hojo K, Shono K, Maekawa R, Yagi S, Hoffman RM, Sugita K. Anticancer efficacy in vivo and in vitro, synergy with 5-fluorouracil, and safety of recombinant methioninase. *Cancer Res.* 1998;58:2583-7.
125. Ge X, Fu Y-M, Li Y-Q, Meadows GG. Activation of caspases and cleavage of Bid are required for tyrosine and phenylalanine deficiency induced apoptosis of human A375 melanoma cells. *Arch Biochem Biophys.* 2002;403:50-8.
126. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science.* 1998;281:1312-6.
127. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P et al. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature.* 1999;397:441-6.
128. Kumar RJ, Barqawi A, Crawford ED. Adverse events associated with hormonal therapy for prostate cancer. *Rev Urol.* 2005;7(Suppl 5):S37-43.
129. Waitzberg AF, Nonogaki S, Nishimoto IN, Kowalski LP, Miguel RE, Brentani RR, Brentani MM. Clinical significance of c-myc and p53 expression in head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer Detect Prev.* 2004;28(3):178-86.

130. Gronostajski RM, Goldberg AL, Pardee AB. The role of increased proteolysis in the atrophy and arrest of proliferation in serum-deprived fibroblasts. *J Cell Physiol.* 1984 Oct;121(1):189-98.
131. El-Deiry WS, Kern SE, Pietenpol JA, Kinzler KW, Vogelstein B. Definition of a consensus binding site for p53. *Nat Genet.* 1992 Apr;1(1):45-9.
132. Zhao GH, Xie GQ, Miao YY. Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi [Expression and clinical significance of cyclin E2 in nasopharyngeal carcinoma]. 2012 Mar;28(3):291-3. Chinese
133. Shieh SY, Ikeda M, Taya Y, Prives C. DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell.* 1997 Oct 31;91(3):325-34.
134. Momand J, Zambetti GP, Olson DC, George D, Levine AJ. The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell.* 1992 Jun 26;69(7):1237-45.
135. Freedman DA, Levine AJ. Nuclear export is required for degradation of endogenous p53 by MDM2 and human papillomavirus E6. *Mol Cell Biol.* 1998 Dec;18(12):7288-93.
136. Amundson SA, Myers TG, Fornace AJ Jr. Roles for p53 in growth arrest and apoptosis: putting on the brakes after genotoxic stress. *Oncogene.* 1998 Dec 24;17(25):3287-99.
137. Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature.* 1993 Dec 16;366(6456):701-4.
138. Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* 1999 Jun 15;13(12):1501-12.
139. Weiss HL, Niwas S, Grizzle WE, Piyathilake C. Receiver operating characteristic (ROC) to determine cut-off points of biomarkers in lung cancer patients. *Dis Markers.* 2003-2004;19(6):273-8.
140. Oxnard GR, Schwartz LH. Early changes in tumor size in patients treated for advanced stage nonsmall cell lung cancer do not correlate with survival. *Cancer.* 2010 Mar 15;116(6):1615; author reply 1616.
141. Matias JEF, Campos ACL. Terapia Nutricional no Câncer. In: Campos ACL, *Nutrição em Cirurgia.* São Paulo: Atheneu, 2001. v. 1, cap. 16, 281-95.
142. Silva MPN da. Síndrome da anorexia-caquexia em portadores de câncer. *Revista Brasileira de Cancerologia (Maceió).* 2006 ago;52(1):59-77.
143. Inui A. Cancer Anorexia-Cachexia Syndrome: Current Issues in Research and Management. *A Cancer Journal for Clinicians.* 2002 mar./abr; 52(2):72-91.

144. Bezabeh T, Mowat MR, Jarolim L, Greenberg AH, Smith IC. Detection of drug-induced apoptosis and necrosis in human cervical carcinoma cells using ¹H NMR spectroscopy. *Cell Death Differ.* 2001 Mar;8(3):219-24.
145. Ronen SM, DiStefano F, McCoy CL, Robertson D, Smith TA, Al-Saffar NM, Titley J, Cunningham DC, Griffiths JR, Leach MO, Clarke PA. Magnetic resonance detects metabolic changes associated with chemotherapy-induced apoptosis. *Br J Cancer.* 1999 Jun;80(7):1035-41.
146. Chunmeng S, Xiaoxia W, Shaoxiong W, Ying Z, Leland C, Hui M. HRMAS ¹H-NMR measured changes of the metabolite profile as mesenchymal stem cells differentiate to targeted fat cells in vitro: implications for non-invasive monitoring of stem cell differentiation in vivo. *J Tissue Eng Regen Med.* 2008;2:482–90.
147. Lambert H. Multiple PLA2 Isoforms Regulate Taurine Release in NIH3T3 Mouse Fibroblasts *Advances in Experimental Medicine and Biology.* 2006;583(1):99-108. doi: 10.1007/978-0-387-33504-9_10
148. Griffiths JR, et al. Metabolic changes detected by in vivo magnetic resonance studies of HEPA-1 wild-type tumor deficient in hypoxia-inducible factor-1 β (HIF-1 β): evidence of an anabolic role for the HIF-1 pathway. *Cancer Res.* 2002;62:688–95.
149. Griffiths JR, Stubbs M. Opportunities for studying cancer by metabolomics: preliminary observations on tumors deficient in hypoxia-inducible factor 1. *Adv. Enzyme Regul.* 2003; 43:67–76.

9 ANEXOS



A CEUA do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 07/03/2012, APROVOU o Protocolo de Pesquisa nº 009/12 intitulado: "ANÁLISE METABOLÔMICA DE ANIMAIS PORTADORES DE MELANOMA MURINO B16F10 POR ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)" que utilizará 30 animais da espécie Camundongos isogênicos da linhagem C57BL/6J, apresentado pelo Programa de FISIOPATOLOGIA EXPERIMENTAL

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei Nº 11.794 -8 de outubro de 2008).

Pesquisador (a) Responsável: Durvanei Augusto Maria

Pesquisador (a) Executante: Thiago Antonio Fedele

CEP-FMUSP, 08 de Março de 2012.

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Prof. Dr. Roger Chammas
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa