**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS
QUÍMICA ORGÂNICA E BIOLÓGICA**

VINÍCIUS GUIMARÃES FERREIRA

**Explorando o metabolismo como ferramenta para investigação e tratamento de
doenças**

TESE DE DOUTORADO

**SÃO CARLOS
2020**

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS
QUÍMICA ORGÂNICA E BIOLÓGICA**

VINÍCIUS GUIMARÃES FERREIRA

**Explorando o metabolismo como ferramenta para investigação e tratamento de
doenças**

Tese apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em ciências.

Área de concentração: Química Orgânica e Biológica

Orientador: Prof. Dr. Emanuel Carrilho

Supervisor exterior: Prof. Dr. Anthony G. Letai

Exemplar revisado

O exemplar original encontra-se em
acervo reservado na Biblioteca do IQSC-USP

**SÃO CARLOS
2020**

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.

Assinatura: *Vinícius Guimarães Ferreira*
Data: 01/07/2020

Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Referência e Atendimento ao Usuário do SBI/IQSC

Ferreira, Vinícius Guimarães

Explorando o metabolismo como ferramenta para investigação e tratamento de doenças / Vinícius Guimarães Ferreira. — São Carlos, 2020.
121 f.

Tese (Doutorado em Química Orgânica e Biológica) — Instituto de Química de São Carlos / Universidade de São Paulo, 2020.

Orientador: Prof. Dr. Emanuel Carrilho

1. Câncer de mama. 2. BH3 profiling. 3. Apoptose. 4. Metabolômica. 5. Cri-du-chat. I. Título.

Sonia Alves - CRB: 4280/8

*Dedico este trabalho àquele que,
mesmo antes de nascer, tornou tudo mais claro.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, pela vida que me foi dada, pela família que me foi cedida e pelos amigos aos quais confio e tanto me auxiliaram nesta jornada;

Aos meus pais, Walter e Rosana, sem os quais absolutamente nada em minha vida seria conquistado, agradeço o apoio, suporte, conversas e por estarem ao meu lado nos bons e maus momentos;

Aos meus irmãos, Rodolfo e Carla, por me alegrarem a vida e ao Rodolfo também pelo auxílio no desenvolvimento do software para alinhamento dos dados;

Aos meus avós, Rosário, Elza, Odeti e Alice, por terem me dado amor, carinho, educação, e muitos doces;

Ao professor Emanuel Carrilho, por ter aceito a difícil missão de me guiar por todo o doutorado e, por vezes, também fora deste;

Aos meus grandes amigos de dentro e fora do laboratório, que de alguma forma contribuíram com meu crescimento, científico e pessoal, e em especial à: Cleyton, Jonatan, Letícia M, Bruno, Letícia P, Juliana A, Juliane B, Thiago, Beatriz, Weliton, Vinícius, Carlos, Graziela, Diego, Ricardo, Isabela, Larissa, Lucas, Felipe, Jéssica e Rafael.

Ao professor Anthony Letai, do Dana-Farber Cancer Institute/Harvard Medical School, por ter me recebido com tamanho carinho em seu laboratório por 12 meses durante meu estágio sanduíche;

A todos os amigos em Boston, no Dana-Faber e em Harvard, em especial à Dra Veerle Daniels, por sua mentoria, por partilhar seus conhecimentos, pela paciência, pelos ensinamentos de vida e pela confiança durante meus 12 meses na Universidade de Harvard;

Aos técnicos que auxiliaram neste trabalho, Silmara e Cláudia no IQSC, Jeremy, Mirra, Binyan, Vineeth, Hilda, Tenzin, Jennifer e Rachel na universidade de Harvard;

Ao professor Nilson Assunção, pelas parcerias, amostras e ensinamentos;

Aos meus sogros e cunhados, por se tornarem minha segunda família e porto seguro;

Aos funcionários da USP e IQSC, desde os funcionários da limpeza, aos professores da instituição, pelo suporte que dão à todas as pesquisas feitas no instituto;

A CNPq pelo suporte financeiro no Brasil e no exterior;

Agradeço por último a ela, sem a qual eu jamais teria galgado meu caminho na pós-graduação, minha noiva Samarah, por toda a dedicação, todos os ensinamentos, pela paciência e pelo maior presente da minha vida;

A todos, meu muito obrigado.

RESUMO

O estudo do conjunto de metabólitos produzidos por um organismo, ou a ação interventiva de compostos metabólicos na atividade celular, podem ser utilizados como ferramentas para a otimização de tratamentos de diversas doenças. Este trabalho teve como foco o metabolismo para buscar formas efetivas de melhorar o tratamento de duas doenças: câncer de mama triplo negativo (TNBC) e síndrome de *cri-du-chat*. A primeira parte do trabalho consistiu na avaliação da ação tóxica de 192 compostos metabólicos em células de TNBC, a partir dos seus efeitos na proximidade da morte celular programada (*priming*) pela técnica de BH3 *profiling*, a qual se baseia na quantidade de citocromos C liberados mediante a presença de proteínas da família Bcl-2, desta forma, o aumento da liberação de citocromo C devido ao tratamento com o composto metabólico, implica que este composto induz o *priming* na célula. Foram encontrados 4 compostos metabólicos capazes de induzir um aumento do *priming* especificamente nas células de câncer: *elesclomol*, *spautin-1*, *artemisinin* e CHR2797. A combinação de CHR2797 com quimioterápicos convencionais e de última geração apresentou um aumento significativo na potência e na eficiência do tratamento de câncer de mama. O segundo alvo do trabalho visou à análise metabolômica de pacientes com síndrome de *cri-du-chat* (SCDC), em busca de metabólitos que evidenciem rotas deficientes em pacientes, e que podem ser utilizadas para melhoramento do tratamento desta doença e até diagnóstico. Com esta finalidade, foram obtidas amostras de plasma de portadores e não portadores de SCDC, submetidas à extração de metabólitos por microextração em fase sólida biocompatível (bio-SPME), utilizando fibras de fase C18 em 150 µL de amostra e, posteriormente, 150 µL de metanol como solvente de dessorção. As amostras foram extraídas e dessorvidas durante 10 min e 1200 RPM de agitação. Após a extração e dessorção dos metabólitos, as amostras foram analisadas por espectrometria de massas por inserção direta (DIMS). Anteriormente a extração das amostras por Bio-SPME, foram realizados planejamentos experimentais com plasma de paciente saudável para otimização de parâmetros de extração e dessorção de metabólitos. Para viabilizar o tratamento dos dados de DIMS, foi desenvolvido um software para o alinhamento dos espectros. A análise dos dados por PLS-DA permitiu a separação dos grupos de controle e pacientes de acordo com faixas etárias, sendo os principais responsáveis pela separação os íons com m/z igual a 109,97, 304,28 e 347,14.

Palavras-chave: Mebolômica, compostos metabólicos, microextração em fase sólida biocompatível, síndrome de cri-du-chat, câncer de mama.

ABSTRACT

The study of the set of metabolites produced by an organism, or the interventional action of metabolic compounds on cellular activity, can be used as tools for the optimization of treatments of various diseases. This study focused on the use of metabolism to seek effective ways to improve treatment of two diseases: triple-negative breast cancer (TNBC) and *cri-du-chat* syndrome. The first part of the work consisted of evaluating the toxic action of 192 metabolic compounds in TNBC cells, from their effects on the proximity of programmed cell death (priming) by the BH3 profiling technique, that is based in the cytochrome C release by the cell, under presence of Bcl-2 peptides, therefore, as higher the cytochrome C release, higher the priming inducing effect by the metabolic compound. Four metabolic compounds were found capable of inducing an increase in priming, specifically in cancer cells: elesclomol, spautin-1, artemisinin, and CHR2797. The combination of CHR2797 with conventional and last generation chemotherapy has significantly increased the potency and efficiency of breast cancer treatment. The second part of the work aimed at the metabolomic analysis of patients with the *cri-du-chat* syndrome (SCDC), looking for metabolites that show deficient paths in patients, and that can be used to improve the treatment of this disease. For this purpose, plasma samples were obtained from SCDC carriers and non-carriers, submitted to metabolite extraction by biocompatible solid-phase microextraction (bio-SPME) and subsequently analyzed by direct insertion mass spectrometry (DIMS). Before sample extraction by Bio-SPME, experimental designs were performed with healthy patient plasma to optimize metabolite extraction and desorption parameters. To be able to process the DIMS data, one software for spectra alignment was developed. Data analysis by PLS-DA allowed the separation of control groups and patients according to age groups, and the main responsible for the separation were ions with m/z equal to 109.97, 304.28, and 347.14.

Keywords: Mebolomics, metabolic compounds, biocompatible solid phase microextraction, *cri-du-chat* syndrome, breast cancer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Morte celular por apoptose e o papel das proteínas BCL-2.	17
Figura 2. Nível de <i>priming</i> e proximidade da morte celular.....	19
Figura 3. Delineamento experimental.....	20
Figura 4. Estruturas químicas dos quimioterápicos empregados.....	23
Figura 5. Representação do procedimento de análise por HT-BH3 <i>profiling</i> para descoberta de fármacos.	27
Figura 6. Exemplos de imagens de microscopia de fluorescência obtidas por HT-BH3 <i>profiling</i> . (a) Marcação de DNA em azul com o corante Hoechst e de citocromo C em verde com o corante Cyt C, levando a uma sobreposição de imagem que contém informações do local da célula e do citocromo C. (b) Aumento da concentração do peptídeo BIM, levando a maior liberação de citocromo C de dentro das células.	28
Figura 7. Experimento promovido para a combinação entre o composto metabólico selecionado e os agentes quimioterápicos.....	28
Figura 8. (a) Delta <i>priming</i> em função da contagem de células. Cada ponto representa uma diferente concentração de um diferente composto testado. Foram utilizados 192 compostos em 10 diferentes concentrações para cada composto. (b) Exemplo de perfil de <i>priming</i> e contagem de células em função da concentração do composto metabólico estudado.....	31
Figura 9. Gráficos de delta <i>priming</i> versus contagem de células para as linhagens utilizadas na análise de confirmação.....	33
Figura 10. Gráficos de correlação entre as replicatas dos experimentos de BH3 <i>profiling</i> ..	35
Figura 11. Gráfico de delta <i>priming</i> em função da contagem de células para as duas linhagens de células saudáveis utilizadas.	37
Figura 12. Gráfico de correlação entre replicatas de células MCF10A.....	38
Figura 13. Estrutura química do composto CHR2797 (tosedostat).....	39
Figura 14. Efeito do composto CHR2797 para cada uma das linhagens celulares avaliadas.	39
Figura 15. Efeito de CHR2797 em células SUM149, em combinação com diferentes quimioterápicos.....	40
Figura 16. Gráficos de contagem de células para SUM149, após tratamento com CHR2797 em diferentes concentrações. (a) contagem de células vivas em função do tempo; (b) contagem de células mortas em função do tempo; (c) contagem de células vivas e mortas para as duas concentrações selecionadas; (d) curva de contagem de células vivas normalizada em função da taxa de crescimento.	43
Figura 17. Efeito de CHR2797 em células SUM149 após tratamento dos dados utilizando a ferramenta GRcalculator.....	45
Figura 18. Efeito do pré-tratamento com CHR2797 por 24 h em células SUM149. (a) Efeito do tratamento com CHR2797 em células SUM149 em combinação com diferentes quimioterápicos, adicionados 24 h após o tratamento com CHR2797; (b) <i>priming</i> das células após pré-tratamento com CHR2797.....	46
Figura 19. Efeito do pré-tratamento com CHR2797 por 48 h em células SUM149. (a) Efeito do tratamento com CHR2797 em células SUM149 em combinação com diferentes quimioterápicos, adicionados 48 h após o tratamento com CHR2797; (b) <i>priming</i> das células após pré-tratamento com CHR2797.....	47
Figura 20. Comparação do efeito do tratamento com CHR2797 em células SUM149 em combinação com diferentes quimioterápicos em diferentes tempos. (a) dados do tratamento	

com quimioterápico ao mesmo tempo do tratamento com CHR2797; (b) tratamento com quimioterápicos 24 h após tratamento com CHR2797; (c) tratamento com quimioterápicos 48 h após tratamento com CHR2797.	49
Figura 21. Dispositivo de microextração em fase sólida (SPME): (a) <i>in-vitro</i> e (b) <i>in-vivo</i>	53
Figura 22. Representação gráfica do modelo <i>simplex centroid</i> utilizado para a otimização do solvente de dessorção, com 10 pontos.	62
Figura 23. Contagem de sinais na extração dos analitos ao longo do tempo.	65
Figura 24. Perfil de extração dos analitos ao longo do tempo, utilizando a intensidade total de sinais como resposta.	65
Figura 25. Diagramas de Pareto para as respostas avaliadas no segundo planejamento 2 ⁴ : (a) número de picos com intensidade superior ao branco, (b) soma das intensidades, (c) Soma das intensidades normalizada e (d) desejabilidade global.	70
Figura 26. Diagramas de Pareto para as respostas avaliadas no segundo planejamento 2 ⁴ no modo negativo: (a) número de picos com intensidade superior ao branco, (b) soma das intensidades, (c) Soma das intensidades normalizada e (d) desejabilidade global.	72
Figura 27. Espectros de massas obtidos no modo positivo para diferentes condições.	74
Figura 28. Espectros de massas obtidos no modo negativo para diferentes condições.	75
Figura 29. Diagramas de Pareto das respostas utilizadas para o planejamento 2 ³ no modo positivo: (a) número de picos com intensidade superior ao branco, (b) soma das intensidades, (c) Soma das intensidades normalizada e (d) desejabilidade global.	78
Figura 30. Diagramas de Pareto das respostas utilizadas para o planejamento 2 ³ no modo negativo: (a) soma das intensidades, (b) número de picos com intensidade superior ao branco, (c) Soma das intensidades normalizada e (d) desejabilidade global.	79
Figura 31. Superfície de resposta para a desejabilidade global no modo positivo e negativo de análise em (a) 2D e (b) 3D.	84
Figura 32. Espectros de massas representativos da análise de pacientes (a) portadores e (b) não portadores da síndrome de <i>cri-du-chat</i> , análises no modo positivo são apresentadas ao lado esquerdo, e análises no modo negativo ao lado direito.	86
Figura 33. Exemplo de arredondamento de m/z 's para menor número de casas decimais. Inicialmente os dados inseridos nas colunas A e B são os dados brutos extraídos diretamente do software do equipamento, em seguida utiliza-se a função “arred” do excel, na coluna D, para arredondar os números presentes na coluna “Mass” para o número de casas decimais desejado. Em seguida copia-se e cola-se a coluna B (valores de intensidade), na coluna E, de modo que os valores de intensidade permaneçam constantes para cada massa (coluna E igual a coluna B). Por fim, insere-se uma tabela dinâmica referente à coluna D e E. Desta forma, é feito o agrupamento de todos os m/z 's iguais e suas respectivas intensidades.	88
Figura 34. Interface do software para pareamento das amostras.	89
Figura 35. Análises multivariadas de (a) PCA e (b) PLS-DA de todas as amostras, sem separação por sexo ou idade.	91
Figura 36. Gráficos de (a) PCA e (b) PLS-DA para os dados obtidos de amostras de crianças, adolescentes e adultos.	92
Figura 37. Importância das variáveis para a separação (VIP scores) para crianças, adolescentes e adultos.	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista de compostos metabólicos utilizados para o estudo.....	21
Tabela 2. Compostos metabólicos selecionados para a continuidade dos experimentos.....	32
Tabela 3. Compostos selecionados para a análise de combinação entre compostos metabólicos e quimioterápicos. DMSO é utilizado como branco.....	38
Tabela 4. Valores de GR50 para a combinação de CHR2797 com diferentes quimioterápicos.....	44
Tabela 5. Planejamento fatorial 2^4 com ponto central.	60
Tabela 6. Planejamento fatorial 2^3	61
Tabela 7. Variáveis e respostas do segundo planejamento fatorial 2^4 com 4 pontos centrais, para o modo positivo.....	69
Tabela 8. Variáveis e respostas do segundo planejamento fatorial 2^4 com 4 pontos centrais para o modo negativo.....	71
Tabela 9. Variáveis e respostas para o planejamento fatorial 2^3 , obtidos para o modo positivo.....	77
Tabela 10. Variáveis e respostas para o planejamento fatorial 2^3 , obtidos para o modo negativo.....	77
Tabela 11. Resultados da otimização para diferentes respostas e desejabilidade global, no modo positivo de análise.....	81
Tabela 12. Resultados da otimização para diferentes respostas e desejabilidade global, no modo negativo de análise.....	82
Tabela 13. Desejabilidade global considerando modo positivo e negativo juntos	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL	Microlitros
μM	Micromolar
Bio-SPME	Microextração em fase sólida biocompatível
DIMS	Espectrometria de massas por inserção direta
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EC10	Concentração efetiva de 10% da atividade
EC50	Concentração efetiva de 50% da atividade
EDTA	Ácido etilenodiamino tetraacético
EGTA	Ácido egtazico
ER	Receptor de estrogênio
ESI	Ionização por <i>electrospray</i>
FBS	Soro fetal Bovino
GR50	Concentração efetiva corrigida pela taxa de crescimento para 50%
HER2	Receptor tipo 2 do fator de crescimento epitelial humano
HT-BH3 <i>profiling</i>	<i>High throughput BH3 profiling</i>
IC50	Concentração de inibição de 50% da atividade
MEB	Solução tampão experimental de manitol
MOMP	Permeabilização da membrana externa mitocondrial
MS	Espectrometria de massas
PBS	Tampão fosfato-salino
PFA	Paraformaldeído
PR	Receptor de progesterona
RMN	Ressonância magnética nuclear
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SCDC	Síndrome de <i>cri-du-chat</i>
SPME	Microextração em fase sólida

SUMÁRIO

I. CAPÍTULO I.....	13
1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Câncer	14
1.2 Câncer de mama.....	14
1.3 Tratamentos para câncer	15
1.4 BH3- <i>profiling</i>	18
2 OBJETIVOS	19
3 MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1 Compostos metabólicos	20
3.2 Etapas experimentais	20
3.3 Linhagens Celulares.....	24
3.4 BH3 profiling	24
3.5 Dye drop assay.....	30
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
4.1 Etapa 1: primeira avaliação.....	31
4.2 Segunda etapa: análise de confirmação	32
4.3 Terceira etapa: análise dos controles	36
4.4 Quarta etapa: análise em combinação.....	38
5 CONCLUSÕES	50
II. CAPÍTULO II.....	51
1. INTRODUÇÃO.....	52
1.1 Metabolômica – encontrando biomarcadores	52
1.2 Microextração em fase sólida (SPME)	52
1.3 Planejamento experimental.....	55
1.4 Síndrome de <i>cri-du-chat</i>	57
2 OBJETIVOS	58
3 MATERIAIS E MÉTODOS	58
3.1 Coleta do sangue de portadores e não portadores de SCDC.....	58
3.2 Extração de metabólitos por Bio-SPME.....	59
3.2.1 Planejamentos experimentais utilizando plasma de não portadores de SCDC.....	59
3.3 Espectrometria de massas por inserção direta (DIMS).....	62
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	64

4.1 Otimização do processo de extração por Bio-SPME.....	64
4.1.1 Perfil de tempo de extração.....	64
4.1.2 Resultados obtidos pelo planejamento fatorial 2^3	75
4.1.3 Otimização do solvente de dessorção	80
4.2 Análise metabolômica do plasma de portadores de SCDC	85
4.2.1 Desenvolvimento do software para pareamento dos dados - MSdataAlign	87
4.2.2 Tratamento estatístico das análises por DIMS.....	90
5 CONCLUSÕES	94
REFERÊNCIAS.....	94
ANEXOS	101

I. CAPITULO I

Avaliação *in vitro* de compostos metabólicos para o melhoramento da resposta de quimioterápicos para câncer de mama triplo negativo

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

A Organização Mundial da Saúde (OMS) afirma que em 2012 o câncer foi responsável por 8,2 milhões de mortes e estima o aumento no número de casos em cerca de 70% em apenas duas décadas, de 14 milhões em 2012 para 22 milhões em 2032.¹ Câncer é uma classe de doenças em que um grupo de células se multiplica de forma incontrolável, sem permitir qualquer tipo de controle do organismo. Este fenômeno resulta de uma série de eventos moleculares que alteram as propriedades normais da célula. As células cancerosas são definidas por duas propriedades, que juntas tornam o câncer perigoso: *i*) reproduzem-se desobedecendo aos limites normais da divisão celular e *ii*) invadem e colonizam regiões normalmente destinadas a outras células.²

As anomalias em células cancerosas normalmente resultam de mutações em genes que codificam proteínas responsáveis pela divisão celular e pelo reparo do DNA. Uma vez que os genes responsáveis pelo reparo do DNA sofrem mutações, este sistema de controle deixa de funcionar normalmente, possibilitando a propagação desta mutação para as próximas gerações de células e, com o tempo, possibilitando o acúmulo de mutações genéticas e consequentemente, o aumento no número de mutações na célula.² As mutações genéticas tornam o câncer passível de hereditariedade, porém este não é apenas o único fator a ser considerado, visto que a exposição a agentes externos como carcinógenos físicos (radiação ionizante e ultravioleta A), carcinógenos químicos (tabaco, amianto, arsênico) e carcinógenos biológicos (infecções de certos vírus, bactérias ou parasitas), estão relacionados a diversos tipos de câncer.¹

1.2 Câncer de mama

Atualmente um dos tipos de câncer com maior incidência é o câncer de mama, sendo o mais frequente entre as mulheres no mundo e no Brasil, depois do câncer de pele não melanoma, e responsável por 14.388 mortes em 2013, sendo 181 homens e 14.206 mulheres.^{1,3} Antes do ano 2000, o câncer de mama era visto como um tipo único de câncer, no entanto, Perou⁴ e colaboradores promoveram uma avaliação detalhada da expressão genética de câncer de mama de 46 pacientes e foram capazes de diferenciar 4 diferentes tipos de câncer de mama, de acordo com características moleculares dos mesmos. Os subtipos foram denominados luminal A, luminal B, HER2 e triplo negativo.

Os subtipos luminal A e luminal B são caracterizados por serem tumores que possuem receptores hormonais para estrogênio (ER) e/ou progesterona (PR), ou seja, as

células do tumor se multiplicam em resposta à presença de hormônio estrogênio e/ou progesterona.⁵⁻⁸ No caso destes tumores, tratamentos envolvendo terapia hormonal tendem a ser eficazes. O subtipo luminal B se diferencia do subtipo Luminal A pela alta expressão do gene Ki-67, responsável pela proteína de mesmo nome, que é uma das proteínas responsáveis pelo controle da reprodução celular.^{6,9} O subtipo HER2 é relacionado à ausência de receptores hormonais de ER e PR, porém possuem maior quantidade de receptores para o fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2), assim, são tumores que se multiplicam excessivamente em resposta à presença deste fator de crescimento. O tratamento deste subtipo de câncer de mama envolve drogas que sequestram os fatores de crescimento da corrente sanguínea.¹⁰

Câncer de mama triplo negativo (TNBC, *triple-negative breast cancer*) refere-se aos tumores que não possuem receptores de estrogênio, progesterona e HER2, e consequentemente, o controle dos níveis destas substâncias não pode ser utilizado como tratamento. Este subtipo de câncer de mama geralmente apresenta tumores maiores que os demais, de maior grau e é recorrente o comprometimento de linfonodos já no momento do diagnóstico, caracterizando um tumor mais agressivo e de pior prognóstico.^{6,11,12}

1.3 Tratamentos para câncer

Existem atualmente diversos métodos para tratamento de câncer, entre eles a cirurgia, radioterapia, quimioterapia e terapia alvo. A cirurgia consiste na retirada do tumor e do tecido que o circunda, chamado de margem cirúrgica, no entanto esta metodologia possui maior eficiência em estágios iniciais, antes de ocorrer a proliferação do tumor para outras regiões do corpo. Terapias alvo consistem em medicamentos que atuam a partir de marcadores tumorais e agem apenas nas células do câncer, no entanto ainda é uma área em desenvolvimento e a maioria dos medicamentos apenas visam impedir o crescimento do tumor, e não promovem a redução do mesmo. Radioterapia consiste na aplicação de radiação gama diretamente na região do tumor, atacando diretamente o DNA das células e promovendo modificações estruturais no DNA das células afetadas, o que impede a proliferação e a sobrevivência das células. A radiação proveniente deste tratamento também afeta as células normais adjacentes às células cancerosas, porém em células normais os danos ao DNA são reparados durante o ciclo celular, enquanto nas células tumorais os pontos de reparo não funcionam propriamente, de modo que o dano ao DNA das células tumorais é fatal à célula.¹³ As drogas quimioterápicas são medicamentos que podem efetuar diferentes mecanismos de ação

contra as células cancerosas, como por exemplo afetando a reprodução celular através de interferências na replicação de DNA e/ou na interceptação de fatores de crescimento; ou podem ainda modificar o metabolismo da célula a ponto de promover a senescência ou a morte celular.¹⁴

Embora agentes quimioterápicos sejam amplamente utilizados, seus efeitos colaterais como queda de cabelo, ânsia, dor de cabeça, entre outros, têm levado a um grande esforço para o desenvolvimento de novos e melhores medicamentos. Neste contexto, o presente trabalho teve como foco o estudo de compostos metabólicos, compostos que atuam no metabolismo celular, que auxiliam os quimioterápicos a combater células cancerígenas, aumentando a potência do medicamento e consequentemente diminuindo a quantidade necessária do quimioterápico e seus efeitos colaterais. Uma vez que as células tumorais têm como uma das características chave a evasão ao processo de morte celular programada (apoptose), o metabolismo celular é alterado para dar suporte as necessidades da célula cancerígena, e portanto composto metabólicos que tem a capacidade de modificar rotas metabólicas podem agir como bloqueadores desse suporte, levando a célula mais próxima da apoptose.¹⁵

Mecanismos diferentes estão relacionados à indução de apoptose nas células, porém a indução da cascata bioquímica da apoptose na célula é coordenado pela ação de uma classe de proteínas, chamada de BCL-2 (*B-cell lymphoma 2*). No processo de apoptose, as proteínas da família BCL-2 controlam a permeabilização da membrana externa da mitocôndria (MOMP, *mitochondrial outer membrane permeabilization*), que é responsável pela liberação de citocromo C (presente no espaço intermembrânico da mitocôndria) no citoplasma. Uma vez no citoplasma, o citocromo C liga-se às proteínas pró-caspase 9 e Apaf-1, gerando um complexo proteico chamado de apoptossomo que ativa às proteínas caspases 3 e 7, e ocasionam a morte da célula.¹⁴⁻¹⁶

Dentro da família BCL-2 existem proteínas que induzem o processo de apoptose (proteínas pró-apoptóticas), e proteínas que previnem o processo de apoptose (proteínas anti-apoptóticas) (**Figura 1**). As proteínas envolvidas no processo de apoptose possuem até 5 domínios em suas estruturas, no entanto, as proteínas pró-apoptóticas, como BAD, BIM, BID e PUMA, possuem em sua estrutura apenas o domínio BH3, por isso a grande relevância deste domínio em específico para a indução da apoptose. As proteínas pró-apoptóticas são responsáveis pela indução da formação de poros na membrana externa da mitocôndria através da ligação destas proteínas à outras proteínas da família BCL-2, como BAX e BAK, que são as proteínas indutoras da permeabilização da membrana externa da

mitocôndria. Já as proteínas que agem contra a morte celular, como BCL-XL, BCL-2 e MCL-1, são capazes de se ligar às proteínas BH3 (BIM, BID e PUMA) e inibir sua ligação à BAX e BAK, impedindo assim o processo de apoptose. A indução da permeabilização da membrana externa da mitocôndria depende da interação e equilíbrio entre proteínas pró e anti-apoptóticas da família BCL-2.¹⁵⁻²⁰

Figura 1. Morte celular por apoptose e o papel das proteínas BCL-2.

Fonte: Adaptado da referência 21.²¹

O estudo da morte celular via apoptose e a busca de novos tratamentos capazes de induzir a apoptose em células tumorais vêm sendo o foco de pesquisa do grupo do professor Dr. Anthony Letai, do Instituto do Câncer Dana-Farber, Harvard Medical School, Estados Unidos. O grupo foi o criador de uma metodologia chamada *BH3-profiling*, capaz de avaliar as interações entre as proteínas BCL-2 pró e anti-apoptóticas nas células.^{17,18}

1.4 BH3-profiling

A partir da técnica de BH3-profiling nas células de um tumor, é possível prever o quão próximo estas células estão de sofrer apoptose. Esta proximidade à apoptose é chamada de *priming* da célula. Uma célula com alto *priming* (*primed cell*), está no limiar da morte celular, enquanto uma célula com baixo *priming* (*unprimed cell*) está mais distante de sofrer apoptose. O *priming* normalmente é utilizado em termos relativos, de modo que é mais usual dizer que uma célula possui maior ou menor *priming* que outra célula ou outra condição, no entanto também existem métricas que podem ser empregadas quando comparamos populações de células diferentes, que é o caso de EC50 e EC10, que são as concentrações de peptídeo (normalmente utiliza-se BIM, BID ou PUMA), onde 50% e 10% das células sofreram permeabilização da membrana externa da mitocôndria, respectivamente.^{22,23}

O princípio básico da técnica de BH3-profiling é a exposição da célula avaliada à peptídeos sintéticos derivados do domínio BH3 de proteínas BCL-2 (pró e anti-apoptóticas) e a medição da permeabilização da membrana externa da mitocôndria. O nível de *priming* da célula é determinado em função da liberação de citocromo C frente à exposição da célula às proteínas testadas, desta forma, uma célula com maior liberação de citocromo C em relação a outra célula, possui um maior *priming*.^{22,23}

A grande vantagem da técnica de BH3 profiling está na correlação entre a variação no *priming* das células (antes e após um tratamento, chamado delta *priming*) e a resposta ao tratamento com um determinado quimioterápico. De forma objetiva, um paciente com células *unprimed* antes do tratamento com um quimioterápico, mas que passam a ser *primed* após este tratamento, responderá de maneira positiva ao tratamento com este medicamento, por outro lado, um medicamento que não promova a mudança do status da célula, não ocasionará um tratamento eficaz para este paciente (**Figura 2**).^{18,19,21,23–25}

Figura 2. Nível de *priming* e proximidade da morte celular.

Fonte: autoria própria.

De maneira análoga, pode-se utilizar o BH3 *profiling* para encontrar medicamentos capazes de aumentar o *priming* de um determinado tipo de tumor, como por exemplo câncer de mama. Esta abordagem consiste no tratamento de diversas linhagens celulares e/ou amostras primárias com diferentes drogas em busca de quais são capazes de promover o aumento do *priming* na maior diversidade de amostras possível. A seleção de compostos baseado em sua habilidade de promover o *priming* das células possui uma grande vantagem, que é possibilidade de encontrar compostos que sozinhos não são capazes de matar as células tumorais, porém por serem capazes de aumentar o *priming* das células, ou seja, por serem capazes de aproximar as células à morte celular, são ótimos candidatos à terapias combinatórias.

2 OBJETIVOS

Analisar a influência de 192 diferentes compostos metabólicos, todos os constantes na biblioteca de compostos sintetizados pelo Ludwig Center, na proximidade da morte celular programada (*priming*) de diferentes linhagens celulares de câncer de mama triplo negativo, utilizando a técnica de BH3 *profiling*, a fim de testar a hipótese de que compostos metabólicos capazes de causar estresse metabólico nas células de câncer, podem gerar uma aproximação das mesmas à apoptose e, com isso, aumentar a eficiência do tratamento com quimioterápicos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Compostos metabólicos

Foram selecionados 192 compostos metabólicos (**Tabela 1**), que possuem alvos conhecidos no metabolismo celular, para encontrar dentre as substâncias avaliadas, quais são capazes de promover um aumento no nível de *priming* das células de câncer de mama triplo negativo, sem promover o aumento no *priming* das células saudáveis. Todos os compostos metabólicos foram obtidos em parceria com o laboratório Ludwig, na Universidade de Medicina de Harvard (Harvard Medical School).

3.2 Etapas experimentais

Devido ao grande número de compostos metabólicos e ao alto custo agregado ao projeto, foi feita uma divisão desta abordagem em 4 diferentes etapas (**Figura 3**) Fonte: autoria própria.. A primeira etapa foi chamada de “primeira avaliação”, com o objetivo de testar todos os compostos metabólicos obtidos, em 10 concentrações diferentes para cada (entre 0,003 μ M e 20 μ M variando 1/3 entre as concentrações), mas utilizando apenas uma linhagem celular (SUM-149). A avaliação dos tratamentos foi realizada por BH3 *profiling* e por ensaios de viabilidade celular. Foram selecionados apenas compostos que apresentaram concentrações capazes de aumentar o *priming* das células, mas sem promover a morte das células, assim, apenas compostos que não seriam descobertos utilizando metodologias convencionais foram selecionados para dar continuidade ao projeto.

Figura 3. Delineamento experimental.

Fonte: autoria própria.

Tabela 1. Lista de compostos metabólicos utilizados para o estudo, totalizando todos os 192 compostos metabólicos sintetizados pelo Ludwig center.

Compostos metabólicos avaliados		
Actinomycin D	Castanospermine	Hydroxyurea
6-Aminonicotinamide	Cyclopentenyl cytosine	Mefloquine HCl
968	CCCP	Isotretinoin
6-Azauridine	Dapagliflozin	Menadione
(R)-(+)-Etomoxir sodium	CD 437	JZL184
6-Mercaptopurine	DCA	Metformin hydrochloride
1-Deoxynojirimycin	Celecoxib	Ketoconazole
6-Thioguanine	Zalcitabine	Methotrexate
17-AAG (Tanespimycin)	Cerulein	Kifunensine
Leflunomide	Digitoxin	(±)-Jasmonic Acid methyl
2-Deoxy-D-glucose	CGP-37157	L-Canaline
A922500	Dimesna	Methylmalonate
2-Methoxyestradiol	CHC	Lapachol
ABT-737	Diphenyleneiodonium	Metyrapone
3-Nitropropionic acid	Chloramphenicol	LCS-1
Acivicin	Dipyridamole	Miglitol
3,3'-Methylene-bis(4-Actinonin	Chlorogenic acid	Linezolid
3PO	Disulfiram	Miglustat hydrochloride
AESBF	CHR 2797	Lometrexol hydrate
4mu8C	DL-α-	Mitotane (Lysodren)
AGI-5198	CJ-13610	Meclizine 2HCl
5-Fluorouracil	DMF	Mizoribine
AGI-6780	Cladribine	Vincristine sulfate
AICAR	2,4-Dinitrophenol	ML 171
Azaserine	Dorsomorphin	ML 240
Allopurinol Sodium	Finasteride	Oligomycin A
beta-Lapachone	Dorzolamide	ML309 HCl
Alrestatin	Fingolimod (FTY720) HCl	Orlistat
Betulinic acid	Eeyarestatin I	Mycophenolic Acid
Aminooxyacetate	FK 866 hydrochloride	TAK-700 (Orteronel)
BPTES	Elesclomol	N,N-Dimethylsphingosine
Anastrozole	Fludarabine	PABA/NO
BMS 309403	(-)-Epigallocatechin Gallate	ABT-263 (Navitoclax)
Antimycin A	Fluoxetine hydrochloride	Phenethyl isothiocyanate
BRD56491	Erastin	NCGC00188636
Apigenin	Fomepizole	Pentostatin
Brequinar sodium salt	Ethidium Bromide	Nitisinone
Artemisinin	Gemcitabine hydrochloride	PF 4981517
Bromopyruvic acid	Fatostatin A	Nomifensine maleate
Artesunate	Gossypol	PF-04620110
Butenafine HCl	FCCP	NPP
Aspirin	GPP 78 hydrochloride	Phenformin Hcl
C 75	Febuxostat	AEM1
Auranofin	GSK 2194069	Pioglitazone HCl
Canagliflozin	Fedratinib (SAR302503,	Olaparib (AZD2281, Ku-
Avasimibe	GSK2656157	Piperlongumine
Taxol	Fenretinide	Oleylethanolamide
Plumbagin	Hispidulin	PK 11195
Rosiglitazone HCl	SKI II	Ro 48-8071 fumarate
PluriSIn 1	Raltitrexed	Streptozocin
Rosuvastatin Calcium	Sodium Azide	Sulfasalazine
Pravastatin sodium salt	Ranolazine dihydrochloride	Toyocamycin
Rotenone	Spautin 1	Sulforaphane
PX 12	Resveratrol	Tretinoin
Rottlerin	STF 083010	Sulindac
Pyrazofurin	Ribavirin	Triclosan
SB 204990	STF 31	Swainsonine
Pyrimethamine	TEPP-46	Tunicamycin
SC 26196	VAS2870	TC-G 1005
Pyrvinium pamoate salt	Terbinafine HCl	U-104
Tolcapone	Venlafaxine hydrochloride	Telintra
Zileuton	Teriflunomide	Valproic acid, sodium salt
Torcetrapib	WWL 113	AR-C155858
	Thapsigargin	Xanthohumol

Fonte: Autoria própria.

A segunda etapa consistiu na análise de confirmação dos compostos selecionados na etapa anterior, a partir de ensaios em outras linhagens celulares de câncer de mama triplo negativo (HCC1937, MDA-MB-231 e HCC1143). Novamente, apenas compostos capazes de aumentar o *priming* da maioria das células, mas sem matar as células, foram selecionados para a próxima etapa.

A terceira etapa consistiu na “análise dos controles”, onde foi testada a especificidade dos compostos selecionados. Para isso os compostos restantes foram testados em duas linhagens celulares de células não tumorais, MCF10A e HMEC. Nesta etapa foram selecionados apenas compostos que não eram capazes de aumentar o *priming* das células não tumorais, sem promover também a morte destas células.

Os compostos remanescentes foram então submetidos à quarta etapa, chamada de “análise em combinação”, que consistiu na análise do efeito destes compostos em combinação com seis quimioterápicos já estabelecidos na literatura, como ABT199 (Venetoclax®), ABT263 (Navitoclax®), A133, doxorubicina (Adriamicina®), paclitaxel (Taxol®) e S63845, Figura 4. Doxorubicina e Paclitaxel são drogas atualmente utilizadas na clínica, enquanto as demais são drogas em fase avançada de teste, e mimetizam o domínio BH3 das proteínas da família BCL-2, agindo diretamente na cascata de apoptose das células.

Doxorubicina é um quimioterápico que age de duas maneiras nas células cancerígenas, a primeira é inibindo a proliferação celular, através da sua inserção na dupla hélice do DNA, impedindo a ação da topoisomerase II na síntese de novas fitas de DNA; a segunda forma de ação é a formação de radicais livres no interior das células, que por sua vez irão reagir com as membranas e com o DNA nas células, gerando um dano irreversível que dará início ao processo de apoptose.²⁶

Paclitaxel, também conhecido como taxol, age nas células de câncer causando o congelamento da divisão celular na etapa de mitose, através da formação de um complexo estável com a tubulina, impedindo a formação de microtúbulos, e consequentemente impedindo a separação dos cromossomos no processo de divisão celular. Além de gerar o congelamento da divisão celular, o paclitaxel também é citotóxico para as células tumorais, no entanto, o mecanismo de ação da droga na morte das células ainda é pouco conhecido.²⁷

ABT263, navitoclax, é um composto mimético BH3, capaz de se ligar seletivamente às proteínas anti-apoptóticas BCL-2 e BCL-XL, que uma vez inibidas,

possibilitam a ação das proteínas pró-apoptóticas na célula, dando início à cascata de apoptose.²⁸

Figura 4. Estruturas químicas dos quimioterápicos empregados.

Doxorrubicina

Paclitaxel

ABT263

A199

S63845

A133

Fonte: Autoria própria.

ABT 199 (venetoclax) faz parte de uma segunda geração de inibidores de proteínas anti-apoptóticas da família BCL-2 e, assim como navitoclax, foi desenvolvida para ser ingerida de forma oral. Seu mecanismo de ação também é relacionado ao sequestro de proteínas anti-apoptóticas, mas diferentemente da droga ABT-263, ela é

específica para BCL-2, não se ligando à BCL-XL. Esta diferença diminui os riscos dos pacientes de sofrerem de trombocitopenia, a diminuição no número de plaquetas no sangue e consequentemente maior risco de hemorragias.²⁹

A133 (A-1331852) também faz parte do grupo de miméticos do domínio BH3, mas diferentemente das drogas anteriores, liga-se especificamente com BCL-XL, desta forma é mais eficaz no tratamento de células que apresentam dependência desta proteína para evadir a apoptose.³⁰

S63845, diferentemente dos demais compostos miméticos de BH3, é capaz de se ligar à proteína MCL-1, sendo eficaz no tratamento de tumores que possuem dependência desta proteína para sobreviver.³⁰

Os experimentos foram realizados em duplicata no mesmo dia, e repetido em três dias diferentes, com exceção dos experimentos com células HMEC, onde não foi possível promover análise em triplicatas biológicas.

3.3 Linhagens Celulares

Para o desenvolvimento deste trabalho foram empregadas diferentes linhagens celulares, sendo quatro linhagens de câncer de mama (SUM149, MDA-MB-231, HCC1937 e HCC1143) e duas linhagens celulares de células não tumorais (MCF10A e HMEC).

As células SUM 149 (SUM149PT, Asterand[®]) foram desenvolvidas a partir de um carcinoma ductal invasivo, com ER e PR negativos, e HER2 positivo, porém não ativado. MDA-MB-231, HCC1937 e HCC1143 foram obtidas diretamente da ATCC[®] e são negativas para ER, PR e HER2. As células MCF10A foram também obtidas da ATCC[®], e são células epiteliais não tumorais, porém imortalizadas, de modo a tornar viável sua cultura em laboratório. As células HMEC, ATCC[®], são células epiteliais primárias e não imortalizadas, o que torna desafiadora a cultura destas células.

Os meios de cultura empregados e procedimentos de armazenamento e passagem foram aplicados de acordo com os protocolos descritos pelos fornecedores.

3.4 BH3 profiling

A técnica padrão de BH3 *profiling* convencional, é normalmente promovida em placas de cultura de células de 96 poços e medida por citometria de fluxo, levando a uma análise relativamente lenta e cara. Uma alternativa atual para realização de experimentos mais rápidos e com menor custo é a utilização de BH3 *profiling* de alto rendimento (*high throughput* BH3 *profiling* - HT-BH3 *profiling*), que é realizado em placas de 384 poços

e analisado por microscopia de fluorescência^{23,31}. A **Figura 5** Fonte: autoria própria.apresenta um esquema ilustrativo do procedimento de análise de HT-BH3 *profiling*, enquanto a **Figura 6** apresenta um exemplo de imagens de microscopia de fluorescência coletadas para uma curva de diluição com o peptídeo BIM.

O princípio da técnica BH3 *profiling* é a inserção de peptídeos com domínio BH3 no interior das células, e observar a liberação de citocromo C que ocorrerá para cada um dos peptídeos inseridos. Para estes experimentos, serão sempre necessários 4 componentes principais: Tampão de análise (i), Digitonina (ii), peptídeos (iii) e formaldeído (iv). O tampão de análise é uma solução contendo solutos não iônicos para manter a osmolaridade, além de fontes de carbono, como succinato e sequestradores de cálcio, como EDTA e EGTA. Digitonina é um detergente brando, utilizado em concentrações por volta de 10-50 µg/mL (final), a fim de formar poros nas camadas celulares e viabilizar a entrada dos peptídeos na célula. Os peptídeos são o coração do experimento, e são responsáveis pela resposta da liberação de citocromo C da célula. Formaldeído é utilizado como fixador das células, e após 10 minutos de exposição, é utilizada uma solução de neutralização para o formaldeído.

Os princípios do BH3 *profiling* convencional e o HT-BH3 *profiling* são os mesmos, sendo promovidas apenas modificações experimentais para viabilizar o uso de microscopia para a medição de liberação de citocromo C, e a utilização de um único peptídeo, BIM, uma vez que este é um peptídeo não específico, e se liga a qualquer membro da família BCL-2. O protocolo HT-BH3 *profiling* é indicado para obtenção do *priming* geral das células, e não para a identificação de dependências.

O protocolo do ensaio de BH3 *profiling*, incluindo o preparo das soluções e concentrações de peptídeos e corantes pode ser encontrado na página da web do grupo do professor Anthony Letai, <https://letailab.dana-farber.org/bh3-profiling.html>, onde constam os protocolos de todos os tipos de BH3 *profiling* desenvolvidos pelo grupo e todas as soluções e tampões empregados no ensaio (incluindo o tampão de análise, MEB, o tampão de neutralização, N2, e o tampão para marcação de citocromo C, Cyt C Stain Buffer). O protocolo padrão é denominado iBH3 *profiling* na página do grupo. Uma cópia do protocolo pode ser encontrada no ANEXO II. Segue abaixo o protocolo resumido para os experimentos HT-BH3 *profiling*:

- 1- As células foram previamente cultivadas em placas de 384 poços, na densidade de 1500 células por poço.

- 2- O tratamento das células com os compostos metabólicos foi feito utilizando uma *HP Digital dispenser* D300, HP, USA, após 24 horas do plaqueamento das células.
- 3- 48 horas após o tratamento, uma placa contendo as células avaliadas foi submetido a *BH3 profiling* pela manhã, utilizando uma curva de diluição de BIM para determinação do EC10 do peptídeo. No período da tarde a concentração de EC10 determinada pela manhã foi utilizada como a concentração de BIM para o *BH3 profiling* das demais placas. O protocolo de análise é o mesmo entre o prato da manhã e os demais pratos, variando apenas a concentração de BIM.
- 4- O meio de cultura foi removido utilizando uma *EL406 Microplate Washer Dispenser* (BioTek). Os poços foram lavados com tampão fosfato-salino (PBS) 3 vezes e mantidas em 20 μ L de PBS.
- 5- Foram adicionados os peptídeos (curva de diluição de BIM na placa analisada pela manhã, e a concentração de EC10 nas demais placas analisadas no dia).
- 6- Foram adicionados 20 μ L de solução 2 $\times$ solução tampão experimental de manitol (MEB) e 0,004% de digitonina. Após a adição, as placas foram incubadas a 25 °C por 60 min;
- 7- Foram adicionados 15 μ L de solução 8% paraformaldeído (PFA) em todos os poços para fixação das células;
- 8- As placas foram incubadas a 25 °C por 10 min;
- 9- Foram adicionados 40 μ L de tampão neutralizante em todos os poços, a fim de neutralizar o PFA;
- 10- Os poços foram lavados 3 vezes com PBS utilizando uma *EL406 Microplate Washer Dispenser* (BioTek), e deixando um volume final de 20 μ L;
- 11- Foi adicionado tampão de coloração, contendo DAPI e Alexa-Fluor Anticorpo anti-citocromo C, em todos os poços.
- 12- A análise dos pratos foi realizada por microscopia de fluorescência, utilizando um equipamento ImageXpress Micro.

Figura 5. Representação do procedimento de análise por HT-BH3 *profiling* para descoberta de fármacos.

Fonte: autoria própria.

Figura 6. Exemplos de imagens de microscopia de fluorescência obtidas por HT-BH3 *profiling*. (a) Marcação de DNA em azul com o corante Hoechst e de citocromo C em verde com o corante Cyt C, levando a uma sobreposição de imagem que contém informações do local da célula e do citocromo C. (b) Aumento da concentração do peptídeo BIM, levando a maior liberação de citocromo C de dentro das células.

Fonte: Autoria Própria.

Para a quarta etapa experimental, chamada de análise em combinação, foi realizado um protocolo de HT-BH3 *profiling* diferente, utilizando mais de um peptídeo, em várias concentrações cada, análises paralelas de viabilidade celular, e adição de quimioterápicos após 0, 24 e 48 h da adição do composto metabólico (**Figura 7**).

Figura 7. Experimento promovido para a combinação entre o composto metabólico selecionado e os agentes quimioterápicos.

Fonte: autoria própria.

Foram utilizadas diferentes concentrações dos peptídeos BH3: BIM (0,01, 0,0316, 0,1, 0,316, 1, 3,16, 10 e 100 μ M), PUMA (1, 10 e 100 μ M), HRK (10 e 100 μ M), BAD (10, 50 e 100 μ M), MS1 (3 e 10 μ M) e FS1 (1 e 10 μ M). Adicionalmente foram utilizados compostos miméticos de BH3, que exercem a função de peptídeo no BH3 *profiling*: A133 (1 e 10 μ M), A199 (1 μ M), ABT-263 (1 μ M) e S63845 (1 μ M). Os diferentes compostos miméticos de BH3 atuam em proteínas específicas da família BCL-2, portanto o uso destes compostos como peptídeos no BH3 *profiling* também pode fornecer informações interessantes do ponto de vista de quais são as proteínas específicas BCL-2 que as células se apoiam para evadir a apoptose.

Foram feitas análises de BH3 *profiling* 24 e 48 horas após o tratamento das células com o composto metabólico. Uma vez que a finalidade destes experimentos era avaliar o nível de *priming* das células antes do tratamento com quimioterapia, esta análise foi feita em pratos contendo células tratadas apenas com composto metabólico, e nenhum tratamento com quimioterápicos.

Foram testadas 10 concentrações de cada quimioterápico (incluindo branco), entre 0,001 μ M e 10 μ M variando 1/2 Log entre as concentrações, com exceção dos quimioterápicos Doxorubicina e Paclitaxel, para os quais as concentrações variaram entre 10^{-8} μ M e 1 μ M, para paclitaxel e entre 10^{-7} μ M e 10 μ M para doxorubicina, variando 1 Log entre elas. O tratamento foi dado em diferentes estágios, sendo o tratamento com o composto metabólico no dia 1, e os tratamentos com as demais drogas dadas em 3 diferentes situações: *i*) ao mesmo tempo do tratamento com o composto metabólico; *ii*) 24 horas após o tratamento com o composto metabólico e *iii*) 48 horas após o tratamento com o composto metabólico. A viabilidade das células foi medida no dia de cada um dos tratamentos, e após 72 horas do tratamento com o composto metabólico.

A viabilidade foi mensurada utilizando Hoechst como corante, e o mesmo protocolo de BH3 *profiling*, com a exceção do uso de tampão MEB e de proteínas BH3, que não são necessários para a simples análise de viabilidade das células.

Foi utilizado ainda, na quarta etapa desta abordagem, uma correção dos dados de viabilidade celular em função da taxa de crescimento celular, chamada *GR metric*. O cálculo desta correção é feito em uma ferramenta online chamada *GR calculator*. Para os cálculos são utilizados dados de contagem de células do dia do tratamento e a contagem de células após o término do experimento.^{32,33}

3.5 Dye drop assay

Para a quarta etapa de análise em combinação, foi escolhido o composto metabólico com melhor desempenho, o composto CHR2797, para o qual foi avaliado seu efeito no crescimento celular (efeito citotóxico ou citostático).

Foram realizados experimentos de contagem de células vivas e mortas, chamado *dye drop assay*, que é descrito em detalhes por Niepel, 2017³⁴, onde é utilizado os corantes Hoechst e *Live Dead Red* (LDR), para marcação das células vivas e mortas, respectivamente. Nas células com membranas comprometidas, o corante LDR reage com aminas livres, tanto no interior da célula quanto na superfície da célula, produzindo uma intensa coloração fluorescente. Nas células vivas, a reatividade do corante é restrita às aminas da superfície celular, resultando em uma menor intensidade de fluorescência. A diferença de intensidade é geralmente maior que 50 vezes entre células vivas e mortas, permitindo a fácil discriminação.

Para realização do *dye drop assay* foi seguido o seguinte protocolo:

- 1- As células foram previamente cultivadas em placas de 384 poços, na densidade de 1500 células por poço.
- 2- O tratamento das células com os compostos metabólicos foi feito utilizando uma *HP Digital dispenser* D300, HP, USA.
- 3- Foi preparado a solução de corantes, contendo 1:1000 LDR + 1: 5000 Hoechst 33342 em 10% Optiprep em PBS.
- 4- Foi adicionado 15 µl de solução de corantes por poço para uma placa de 384 poços, pipetando suavemente a solução ao longo da parede do poço.
- 5- Incubação em temperatura ambiente por 30 min.
- 6- Foi preparado uma solução 3,7% de formaldeído em 20% Optiprep em PBS, e adicionado 20 µl por poço, pipetando suavemente a solução ao longo da parede do poço
- 7- Incubação em temperatura ambiente por 30 min.
- 8- O meio foi aspirado para 15 µL e adicionado 100 µL de PBS.
- 9- A análise dos pratos foi realizada por microscopia de fluorescência, utilizando um equipamento ImageXpress Micro, após 24, 48 e 72 h de tratamento e anteriormente a adição do composto metabólico (chamado de 0 h).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Etapa 1: primeira avaliação

Nesta etapa os 192 compostos foram avaliados em células SUM149, um tipo de célula de câncer de mama triplo negativo. A **Figura 8a** apresenta os resultados de delta *priming* em função da contagem de células, onde cada ponto no gráfico representa uma concentração de um composto, totalizando 1920 pontos. Como mencionado anteriormente, o foco do projeto é encontrar compostos que possam melhorar o tratamento de câncer de mama triplo negativo, através do aumento do *priming* especificamente das células de câncer. Desta forma, o interesse é selecionar compostos capazes de aumentar o *priming* (maior delta *priming*), mas que não matam as células, de modo que não seriam descobertos utilizando análises convencionais de viabilidade celular. As linhas tracejadas nos gráficos representam os valores de corte da região de interesse para *priming*, linha vertical, e contagem de células, linha horizontal.

Figura 8. (a) Delta *priming* em função da contagem de células. Cada ponto representa uma diferente concentração de um diferente composto testado. Foram utilizados 192 compostos em 10 diferentes concentrações para cada composto. (b) Exemplo de perfil de *priming* e contagem de células em função da concentração do composto metabólico estudado.

Fonte: autoria própria.

Foi considerado um aumento no *priming* das células as concentrações e compostos capazes de aumentar o *priming* em três vezes o desvio padrão do branco (DMSO). Com relação à morte das células, estipulou-se um corte em 80% da contagem de células do branco, assim, concentrações de compostos que causaram a diminuição do número de células para valores abaixo desta linha de corte, foram excluídas das etapas futuras. Os valores no quadrante superior direito (pontos em verde claro) indicam as concentrações e compostos que foram selecionados, seguindo os parâmetros de corte mencionados

anteriormente, totalizando 32 compostos. Os compostos selecionados para a segunda etapa são apresentados na **Tabela 2**, incluindo o branco (DMSO) e controle positivo (ABT263).

Tabela 2. Compostos metabólicos selecionados para a continuidade dos experimentos.

Compostos selecionados para a segunda etapa	
DMSO	GSK 2194069
6 Thioguanine	Isotretinoin
ABT-263	Ketoconazole
AEBSF	Lometrexol
AEM1	Meclizine
AGI_5198	ML309
Artemisinin	Oligomycin A
Artesunate	Orlistat
BPTES	Pyrrinium pamoate
Canagliflozin	Ro 48 8071
CHR 2797	Rosiglitazone
Diphenyliodonium chloride	Rotenone
Elesclomol	SKI II
Finasteride	Spautin 1
FK 866	TEPP_46
Fluoroxetine	Terbinafine
GPP_76	U104

Fonte: Autoria própria.

A **Figura 8b** apresenta o gráfico comparativo entre *priming* (azul) e contagem de células (verde) *versus* a concentração do composto, para ABT-263, que foi utilizado nas etapas como um controle positivo ao *priming*, uma vez que sua ação é diretamente relacionada à apoptose. Podemos observar que existe uma janela terapêutica, onde o *priming* é elevado, mas não existe a diminuição excessiva no número de células. Os compostos selecionados apresentaram janelas terapêuticas semelhantes ao ABT-263.

4.2 Segunda etapa: análise de confirmação

A etapa seguinte consistiu na avaliação dos compostos selecionados na etapa anterior (**Tabela 2**) em outras três linhagens celulares de câncer de mama triplo negativo, MDA-MB-231, HCC1937 e HCC1143, a fim de avaliar a ação dos compostos em células de câncer de mama triplo negativo em geral, não em apenas uma linhagem específica.

Os resultados obtidos são apresentados na **Figura 9**, em gráficos de delta *priming* *versus* contagem de células. Os mesmos parâmetros de corte foram utilizados para estas

células. A partir desta análise observou-se que apenas 16 compostos, dentre os 32 testados, foram capazes de promover um aumento no *priming* de todas as linhagens testadas.

Figura 9. Gráficos de delta *priming* versus contagem de células para as linhagens utilizadas na análise de confirmação.

Fonte: autoria própria.

Os experimentos com as linhagens celulares foram promovidos em triplicatas em três ensaios independentes, e a

Figura 10 apresenta gráficos de correlação entre duas replicatas biológicas para cada uma das linhagens celulares. Nestes gráficos, caso os valores absolutos de *priming* forem idênticos nos dois experimentos, os pontos formarão uma reta diagonal com $R^2 = 1$ e Pearson r também igual a 1. Podemos observar que existiram diferenças nos valores absolutos de *priming*, porém existe uma alta correlação entre os experimentos, significando que o aumento do *priming* pelos compostos, apesar de variável, é uma tendência fixa dos compostos. Os gráficos de correlação de replicata 2 *versus* replicata 3 e de replicata 1 *versus* replicata 3 não são apresentados devido aos valores de R^2 e Pearson r serem semelhantes aos dos gráficos apresentados.

Figura 10. Gráficos de correlação entre as replicatas dos experimentos de BH3 *profiling*.

Fonte: autoria própria.

4.3 Terceira etapa: análise dos controles

Após a seleção dos 16 compostos com atividade nas quatro linhagens de câncer de mama triplo negativo, foram feitas análises destes compostos em células normais de MCF10A e HMEC. O objetivo desta análise foi de verificar, dentro dos compostos, quais também afetariam o *priming* das células normais, que é um indicativo de possíveis efeitos colaterais nos pacientes. Estes experimentos foram chamados de análise contrária, uma vez que os compostos selecionados não serão aqueles capazes de aumentar o *priming* destas células, e sim os que não promovem este efeito.

Os resultados obtidos são apresentados na **Figura 11**. Podemos observar que alguns compostos foram capazes de aumentar o *priming* das células não tumorais e também afetar a contagem de células, ou seja, apresentaram algum efeito nas células não tumorais. A **Figura 12** apresenta o gráfico de correlação entre replicatas para células MCF10A, onde observamos um perfil semelhante ao encontrado nas células de câncer de mama triplo negativo. As análises em células HMEC não foram promovidas em triplicata, uma vez que estas células são de difícil acesso e difícil cultura. Análises em replicata destas análises estão em andamento pela doutora Veerle Daniels, bem como experimentos *in vivo* para comprovação da eficiência do tratamento.

A partir dos dados obtidos na segunda e terceira etapas, foram selecionados 4 compostos que apresentaram uma janela terapêutica para todas as linhagens de células de câncer testadas e não alteraram o *priming* ou o número das células não tumorais testadas (**Tabela 3**): Spautin-1, que atua no mecanismo de autofagia das células, através da degradação de Beclin1³⁵; Elesclomol e Artemisinina que geram espécies reativas de oxigênio (ROS) no interior das células^{36,37} e CHR2797, que atua como um inibidor de aminopeptidases.³⁸

Figura 11. Gráfico de delta *priming* em função da contagem de células para as duas linhagens de células sadias utilizadas.

Fonte: autoria própria.

Figura 12. Gráfico de correlação entre replicatas de células MCF10A.

Fonte: autoria própria.

Tabela 3. Compostos selecionados para a análise de combinação entre compostos metabólicos e quimioterápicos. DMSO é utilizado como branco.

Compostos selecionados para a quarta etapa	
DMSO	CHR 2797
Artemisinin	Spautin 1
Elesclomol	

Fonte: Autoria própria.

4.4 Quarta etapa: análise em combinação

A quarta e última etapa consistiu na análise dos compostos selecionados a partir das etapas anteriores em combinação com os seis agentes quimioterápicos descritos anteriormente. Esta etapa não pode ser finalizada durante o período de estágio no exterior, no entanto a pesquisa continua em andamento.

Durante o estágio foi possível analisar um dos compostos selecionados, CHR2797 (**Figura 13**), em células SUM 149. CHR2797 é um inibidor de aminopeptidases, que é convertido em sua forma ativa no interior das células³⁸. Os gráficos de *priming* e contagem de células deste composto para todas as linhagens celulares testadas são apresentados na **Figura 14**. Podemos observar que existe uma janela terapêutica nas concentrações de 0,082 μ M (log = -1,1) e 0,247 μ M (log = -0,6).

Figura 13. Estrutura química do composto CHR2797 (tosedostat).

Fonte: Autoria própria.

Figura 14. Efeito do composto CHR2797 para cada uma das linhagens celulares avaliadas.

Fonte: autoria própria.

Os resultados obtidos na análise combinatória entre CHR2797 e os agentes quimioterápicos, adicionados simultaneamente, são apresentados na **Figura 15**. Os dados apresentados neste gráfico são de contagem de células em função da concentração de quimioterápico. As diferentes linhas nos gráficos são relacionadas às concentrações de CHR2797 utilizadas e DMSO, utilizado como branco.

Os experimentos combinatórios foram avaliados em função do número de células 72 h após o tratamento com as combinações, enquanto as análises de *priming* e contagem de células para os experimentos anteriores foram promovidos 48 h após o tratamento com os compostos. A análise após 72 h é o tempo padrão para análise de citotoxicidade de drogas, e 48 h é o tempo padrão para análise de *priming*.

Figura 15. Efeito de CHR2797 em células SUM149, em combinação com diferentes quimioterápicos.

Fonte: autoria própria.

Podemos notar na **Figura 15** que em todas as combinações, as células com tratadas apenas com CHR2797, sem a presença de quimioterápicos, apresentaram uma contagem de células inferior ao número de células do branco. Esta observação é importante, pois indica que o composto metabólico está por si só diminuindo a contagem das células, o que não foi observado nos experimentos anteriores. Assim, existem duas hipóteses para explicar este fenômeno: *i*) o composto metabólico apresenta citotoxicidade após 48 h ou *ii*) o composto metabólico afeta a taxa de crescimento das células. Como o crescimento celular é exponencial, caso o composto atue na taxa de crescimento das células, quanto maior o tempo de análise, mais acentuado o efeito.

A fim de solucionar esta questão, foi feita a análise de “dye drop”, que consiste em uma metodologia desenvolvida no laboratório LSP, da Escola de Medicina de Harvard, em que são utilizados dois corantes celulares, Hoechst, para marcar DNA e LDR (*live-dead red*), que marca células mortas. Neste experimento as células são tratadas com o composto avaliado, no caso CHR2797, e são feitas análises de contagem de células vivas e mortas a cada 24 h, com início no próprio dia do tratamento das células (dia 0).

Os resultados são então avaliados em um gráfico de contagem de células *versus* concentração do composto, utilizando dados de células vivas e células mortas. Caso o número de células vivas seja menor que o branco, e o número de células mortas seja maior, temos a indicação que o composto é citotóxico. Caso o número de células vivas seja menor que o branco, mas o número de células mortas seja igual, temos indícios de que o composto possui comportamento citostático. Estes dados podem também ser avaliados utilizando uma métrica específica para avaliar o comportamento citotóxico ou citostático de uma droga, chamada métrica GR (*GR metrics*), desenvolvida também na Escola de Medicina de Harvard.³⁴

O gráfico de GR (*growth rate* – taxa de crescimento) varia entre -1 e 1 , de modo que concentrações com valores de GR abaixo de 0 indicam comportamento citotóxico, e valores positivos de GR indicam comportamento citostático daquelas concentrações. A Figura 16 apresenta os resultados da avaliação do comportamento citotóxico do composto CHR2797. A **Figura 16a** apresenta os dados do número de células vivas para diferentes concentrações de CHR2797, em função do tempo. Podemos observar que 72 h após o tratamento, o número de células vivas diminui conforme aumentamos a concentração de CHR2797, no entanto podemos observar na **Figura 16b** que o número de células mortas não apresenta um aumento proporcional à diminuição no número de células vivas. A **Figura 16c** apresenta os dados de células vivas e mortas no mesmo gráfico, para as

concentrações utilizadas nas combinações com quimioterápicos, 0,082 μM e 0,247 μM . Podemos observar que o número de células vivas é menor para as células tratadas com as concentrações de CHR2797, porém não observamos um aumento significativo no número de células mortas, indicando um comportamento citostático, e não citotóxico, do composto. A **Figura 16d** apresenta o gráfico de GR, calculado a partir da ferramenta online *GRcalculator*.³⁹ Podemos observar que em nenhuma das concentrações avaliadas os valores de GR são negativos, o que corrobora com a hipótese de que CHR2797 não está matando as células após 48 h, mas sim afetando o crescimento das células.

Após a constatação do efeito citostático de CHR2797, as análises de combinação entre o composto e os quimioterápicos foram submetidos à normalização em função da taxa de crescimento das células, que é diferente para cada concentração de CHR2797, utilizando o *GRcalculator*. Para estes cálculos é necessário promover a contagem de células (apenas células vivas) no dia do tratamento (dia 0) e após 72 h (dia 3), incluindo os dados de células tratadas com branco, células tratadas apenas com CHR2797 e células tratadas com a combinação de compostos.

Figura 16. Gráficos de contagem de células para SUM149, após tratamento com CHR2797 em diferentes concentrações. (a) contagem de células vivas em função do tempo; (b) contagem de células mortas em função do tempo; (c) contagem de células vivas e mortas para as duas concentrações selecionadas; (d) curva de contagem de células vivas normalizada em função da taxa de crescimento.

Fonte: autoria própria.

Os dados obtidos a partir da análise da combinação entre CHR2797 e os quimioterápicos, e normalizados em função da taxa de crescimento das células, é apresentado na **Figura 17**. Pode-se observar que com a normalização é possível verificar de forma clara que a combinação com CHR2797 gerou um aumento na potência do tratamento com S63845, A133 e ABT263, que podem ser observados devido ao deslocamento dos valores de GR_{50} (concentração necessária para gerar 50% do efeito da droga, após a normalização em função da taxa de crescimento da célula). Podemos observar ainda que o tratamento em combinação gerou um aumento na eficiência do tratamento com todos os quimioterápicos, com exceção de ABT199. O aumento de eficiência pode ser observado pelo valor de $GR_{máx}$ dos compostos, que é o ponto de resposta máxima obtida pelo tratamento, desta forma, quanto menor o valor de $GR_{máx}$, menor a quantidade de células sobreviventes e, portanto, maior a eficácia do tratamento. Os dados de GR_{50} e $GR_{máx}$ são apresentados na **Tabela 4**.

Tabela 4. Valores de GR_{50} e $GR_{máx}$ para a combinação de CHR2797 com diferentes quimioterápicos.

	GR ₅₀			GR _{máx}		
	DMSO	CHR2797 0,082 µM	CHR2797 0,247 µM	DMSO	CHR2797 0,082 µM	CHR2797 0,247 µM
ABT263	3,19	1,88	0,685	-0,132	-0,33	-0,57
ABT199	8,75	4,06	3,5	0,211	-0,181	-0,214
A133	0,167	0,535	0,0276	-0,519	-0,657	-0,804
S63845	0,535	0,0276	0,0195	-0,0135	-0,598	-0,519
Doxorrubicina	0,00252	0,000376	0,000611	-0,508	-0,636	-0,783
Paclitaxel	0,00019	0,000191	0,000235	-0,477	-0,645	-0,742

Fonte: Autoria própria.

Buscando melhorias ainda mais significativas na potência e na eficiência dos tratamentos convencionais, o tratamento das células com CHR2797 em combinação com os quimioterápicos foi promovido em diferentes tempos, como ilustrado na **Figura 7**. Os resultados obtidos de cada um dos diferentes tempos de tratamento foram submetidos a normalização em função da taxa de crescimento das células, calculados utilizando o *GRcalculator*. A **Figura 17** apresenta os resultados obtidos no tratamento combinatório em paralelo, com o tratamento quimioterápicos + CHR2797 ao mesmo tempo. A **Figura 18a** apresenta os resultados obtidos a partir do tratamento com os diferentes quimioterápicos 24 h após o tratamento das células com CHR2797, enquanto a **Figura**

19a apresenta os resultados do tratamento com os quimioterápicos 48 h após a adição de CHR2797. O tempo final da análise foi mantido constante, sendo 72 h após o tratamento com CHR2797.

Figura 17. Efeito de CHR2797 em células SUM149 após tratamento dos dados utilizando a ferramenta GRcalculator.

Fonte: autoria própria.

Uma vez que o tratamento com os quimioterápicos foi promovido após o tratamento com o composto metabólico, foi realizada a análise de BH3 *profiling* (utilizando diferentes peptídeos) das células após 24 e 48 h do tratamento com CHR2797, sem a adição de nenhum quimioterápico, em busca de compreender as alterações causadas pelo composto no processo de apoptose em relação às proteínas BCL-2. Os resultados de *priming* são apresentados na **Figura 18b** e **Figura 19b** para 24 e 48 h após o tratamento com CHR2797, respectivamente.

Assim como o tratamento concomitante com CHR2797 e quimioterápicos, o pré tratamento de 24 h com o composto metabólico aumentou a potência e a eficiência do

tratamento com os quimioterápicos. O maior aumento de potência e eficiência de tratamento pode ser observado no tratamento com S63845, o que indicaria um aumento na dependência das células para a proteína MCL-1. A análise de BH3 *profiling* no entanto não evidencia a indução na dependência à MCL-1 após 24 h, uma vez que a liberação de citocromo C com o peptídeo MS1 e S63845 (utilizado como peptídeo), após o tratamento com CHR2797 (colunas verdes), não é maior que a liberação de citocromo C do branco (DMSO). Nesta análise, podemos observar um aumento na dependência das células para a proteína BCL-XL, através do aumento na liberação de citocromo C quando são utilizados BAD, HRK, A133 e A115 como peptídeos, **Figura 18b**. Este aumento na dependência por BCL-XL é o responsável pela melhoria no tratamento com A133 e ABT-263, uma vez que ambas atuam diretamente na inibição desta proteína.

Figura 18. Efeito do pré-tratamento com CHR2797 por 24 h em células SUM149. (a) Efeito do tratamento com CHR2797 em células SUM149 em combinação com diferentes quimioterápicos, adicionados 24 h após o tratamento com CHR2797; (b) priming das células após pré-tratamento com CHR2797.

Fonte: autoria própria.

Figura 19. Efeito do pré-tratamento com CHR2797 por 48 h em células SUM149. (a) Efeito do tratamento com CHR2797 em células SUM149 em combinação com diferentes quimioterápicos, adicionados 48 h após o tratamento com CHR2797; (b) *priming* das células após pré-tratamento com CHR2797.

Fonte: autoria própria.

O pré-tratamento das células com CHR2797 por 48 h também evidenciou melhorias no tratamento com os quimioterápicos avaliados, mesmo com um menor tempo de ação dos quimioterápicos, uma vez que o experimento foi encerrado em 72 h após o tratamento com CHR2797, totalizando apenas 24 h de ação dos quimioterápicos. Para esta abordagem o tratamento combinatório que se mostrou mais eficaz foi com CHR2797 + S63845, enquanto o mais potente foi com CHR2797 + A133. Estes resultados indicam que o tratamento com CHR2797 induziu nas células de SUM149 um aumento na dependência das células às proteínas MCL-1 e BCL-XL. A análise de BH3 *profiling* das células após 48 h de tratamento com CHR2797 comprova o aumento na dependência para BCL-XL e MCL-1, como pode ser observado na **Figura 19b** nos peptídeos HRK, para

BCL-XL e MS1 para MCL-1. A comparação entre os três diferentes tempos de tratamento é apresentada na **Figura 20**.

Os experimentos de combinação entre CHR2797 e os quimioterápicos foram realizados apenas uma vez, portanto apesar dos resultados se mostrarem promissores, ainda é necessário repetir os experimentos e avaliar as combinações também em outras linhagens celulares, bem como avaliar a ação dos compostos artemisinin, elesclomol e spautin-1 em combinação com os tratamentos quimioterápicos.

Durante o estágio sanduíche foi aperfeiçoado ainda um procedimento de análise para os experimentos de contagem de células e BH3 *profiling*, utilizando um equipamento “pin-transfer”, que é capaz de promover o tratamento das células de modo mais rápido e eficiente. Desta forma, os experimentos futuros poderão ser efetuados com maior rapidez. Estes experimentos estão sendo realizados no laboratório do professor Letai, no Instituto do Câncer Dana Farber e na Escola de Medicina de Harvard, pela Dra Veerle Daniels, com a previsão de término para julho de 2020.

Figura 20. Comparação do efeito do tratamento com CHR2797 em células SUM149 em combinação com diferentes quimioterápicos em diferentes tempos. (a) dados do tratamento com quimioterápico ao mesmo tempo do tratamento com CHR2797; (b) tratamento com quimioterápicos 24 h após tratamento com CHR2797; (c) tratamento com quimioterápicos 48 h após tratamento com CHR2797.

Fonte: autoria própria.

5 CONCLUSÕES

A busca por tratamentos mais eficientes para o câncer de mama triplo negativo, foi realizada a partir da análise do efeito de 192 compostos metabólicos na viabilidade celular e no *priming* diferencial de células de câncer de mama triplo negativo e de células normais.

Após quatro etapas experimentais foram selecionados quatro compostos metabólicos que foram capazes de induzir um aumento do *priming* especificamente nas células de câncer: elesclomol (indução de ROS), spautin-1 (inibição de autofagia), artemisinin (indução de ROS) e CHR2797 (inibição de aminopeptidases).

A combinação de 6 agentes quimioterápicos e CHR2797 apresentou um aumento significativo na potência e na eficiência do tratamento, em relação às células tratadas apenas com os agentes quimioterápicos, e os experimentos de BH3 *profiling* indicaram que CHR2797 induz dependência às proteínas MCL-1 e BCL-XL, em células SUM149. Os experimentos finais, bem como a avaliação da combinação entre elesclomol, spautin-1 e artemisinin com os agentes quimioterápicos em diferentes linhagens celulares estão sendo desenvolvidos no Instituto do Câncer Dana Farber e na Escola de Medicina de Harvard.

II. CAPÍTULO II

Metabolômica de amostras de plasma de portadores e não portadores de síndrome de cri-du-chat visando a compreensão da atividade metabólica da doença

1. INTRODUÇÃO

1.1 Metabolômica – encontrando biomarcadores

Atualmente sabe-se que o metaboloma, conjunto de metabólitos produzidos por um organismo, é o produto final do metabolismo celular e, portanto, a etapa mais próxima da relação entre funcionamento celular e o fenótipo de um organismo.⁴⁰⁻⁴² Um metaboloma é composto por inúmeras moléculas que apresentam diferentes propriedades, podendo ser: compostos inorgânicos, carboidratos hidrofílicos, ácidos orgânicos, lipídios hidrofóbicos, produtos naturais complexos, moléculas voláteis, dentre outros^{43,44}. A determinação dos metabólitos de um organismo saudável, e comparação com um organismo doente, pode levar a obtenção de biomarcadores para a detecção de diversos tipos de doenças.^{40,42} Desta maneira, o estudo dos metabólitos é de grande interesse e, atualmente, é conhecido como metabolômica.

Estudos metabolômicos são realizados em três etapas principais: preparo de amostras, aquisição e tratamento dos dados.⁴⁵ O preparo de amostras, especialmente a etapa de extração, é um procedimento crucial em abordagens metabolômicas sem alvo, ou seja, quando busca-se a obtenção de *fingerprints* abrangentes do metaboloma. Se a metodologia empregada não for capaz de extrair em quantidades detectáveis toda a variedade de metabólitos presentes na matriz, a interpretação dos resultados é prejudicada.⁴⁵⁻⁴⁷ No entanto, inexistente atualmente uma metodologia de extração única capaz de promover a extração de todos os metabólitos, abrangendo os de alta polaridade até os de baixa polaridade.⁴⁷

Uma forma de promover a extração de uma ampla faixa de metabólitos é a utilização de metodologias complementares de extração, como por exemplo o uso de diferentes solventes extrativos e/ou diferentes técnicas. Para estudos biológicos uma técnica que vêm chamando a atenção de pesquisadores devido à praticidade e elevado rendimento é a utilização de microextração em fase sólida (SPME) com fibras biocompatíveis (BioSPME).⁴⁸

1.2 Microextração em fase sólida (SPME)

A técnica de SPME foi originalmente introduzida para a extração de espécies orgânicas voláteis, como uma ferramenta que possibilitaria a unificação da amostragem e do preparo da amostra.^{49,50} Porém, ao longo do tempo diferentes aplicações foram consolidadas, incluindo a utilização de SPME para amostras líquidas e, recentemente, a mais nova abordagem: SPME *in-vivo*, onde a fase de microextração é inserida diretamente

no organismo vivo, utilizando fibras biocompatíveis (**Figura 21**). SPME *in-vivo* possibilita a extração dos metabólitos produzidos em tempo real, minimizando possíveis erros devido a reações, como por exemplo enzimáticas, que podem ocorrer quando a amostra é coletada e armazenada para posterior extração, modificando a composição final da amostra. Desta forma, o uso de SPME *in-vivo* possibilita a obtenção de *fingerprints* com maior representatividade da realidade metabólica, tornando altamente atrativo o seu emprego para estudos metabolômicos.^{48,51–53}

Figura 21. Dispositivo de microextração em fase sólida (SPME): (a) *in-vitro* e (b) *in-vivo*.

Fonte: Adaptado da referência 51.⁵¹

Os dispositivos de microextração em fase sólida são constituídos por um núcleo de sílica fundida, na forma de haste, revestido por uma camada de adsorvente polimérico na ponta que atua como fase extratora, como por exemplo polidimetilsiloxano (PDMS), poliacrilato (PA), carbowax (CW), carboxen (CAR) e divinilbenzeno (DVB). O núcleo do dispositivo (sílica+camada de adsorvente) é envolto por uma haste metálica para proteção, e quando se deseja utilizar o dispositivo para extração, este núcleo é empurrado para baixo e a ponta contendo camada de adsorvente é exposta a amostra.

Na abordagem *in-vivo*, as fibras de SPME são revestidas adicionalmente com materiais biocompatíveis que atuam como peneiras moleculares, impedindo a interação e adsorção de macromoléculas, como por exemplo proteínas, com a fase estacionária (adsorvente)^{48,52}. Pawliszyn publicou recentemente um trabalho envolvendo a comprovação da viabilidade de dispositivos Bio-SPME para estudos metabolômicos, e os resultados indicaram que algumas fibras (modo misto, ácido fenilborônico e poliestireno-divinilbenzeno) são adequadas para este tipo de finalidade.⁵³

Atualmente o único dispositivo Bio-SPME disponível comercialmente é da empresa Sigma-Aldrich, que é composto por uma camada de adsorvente com 45 µm de espessura e 15 mm de comprimento, formada por C18 ligado a partículas de sílica porosas, e revestida por um polímero biocompatível.⁵⁴

A extração dos analitos pela adsorção na camada adsorvente, e a posterior dessorção dos analitos da fibra são as principais etapas do processo de análise por SPME. A quantidade de analito possível de ser extraído por SPME depende principalmente de dois fatores: *i*) tempo de extração, o tempo no qual a fase fica em contato com a amostra, e *ii*) do tempo de dessorção, etapa em que é promovida a retirada dos analitos adsorvidos na fase estacionária. Se o tempo de extração é suficientemente longo, ocorre o equilíbrio dos analitos entre a fase estacionária e a matriz. Quando o equilíbrio é estabelecido, o sistema obedece à Eq. 1:

$$n_e = \frac{C_0 K_{Afs} V_s V_f (C_{fmax} - C_f^\infty)}{V_s + K_{Afs} (C_{fmax} - C_f^\infty)} \quad \text{Eq. (1)}$$

Onde n_e é o número de mols de analito extraído, C_0 representa a concentração inicial do analito na amostra, K_{Afs} é a constante de distribuição do analito entre a fase e a matriz, que nada mais é que a razão da concentração de analito na fase estacionária e a concentração do analito na matriz (no equilíbrio), V_s é o volume da amostra, V_f é o volume do revestimento das fibras, C_{fmax} é a concentração máxima de sítios ativos, da fase extratora e C_f^∞ é a concentração de analito sobre a fibra.^{49,50,55}

Idealmente, a extração por SPME é finalizada quando o equilíbrio dos analitos entre a fase e a matriz é alcançada, assim, o aumento do tempo de extração após atingir o equilíbrio não resulta em qualquer aumento da quantidade de analitos extraída. De fato, alguns analitos com maior afinidade pela fase estacionária podem interagir competitivamente pelos sítios de adsorção, gerando falsos resultados.

A distribuição do analito entre a fibra de SPME e a matriz da amostra pode ser definida como a razão da concentração do analito na fibra C_f^∞ e a concentração da amostra C_s^∞ , onde o esse equilíbrio pode ser representado pela Eq. 2:

$$K_{fs} = \frac{C_f^\infty}{C_s^\infty} \quad \text{Eq. (2)}$$

K_{fs} depende tanto da natureza do analito quanto do tipo de fase presente na fibra selecionada para o trabalho, além de outras propriedades da matriz, como temperatura, pH, adição de algum solvente orgânico ou líquido iônico, fatores os quais devem ser mantidos constantes durante uma análise.

O tempo de dessorção, tempo em que ocorre a retirada das substâncias adsorvidas na matriz, possui a mesma importância do tempo de extração, uma vez que pouco tempo pode ocasionar em uma dessorção incompleta dos analitos. Porém, quanto maior o tempo de dessorção, mais demorado se torna o protocolo de análise (extração dos metabólitos seguida pela análise dos mesmos), portanto, é necessário encontrar o menor tempo possível que mantenha a completa dessorção dos analitos.

A temperatura de dessorção é um parâmetro ligado diretamente à velocidade da dessorção dos analitos. Quanto maior a temperatura do sistema, maior a agitação das moléculas da solução, aumentando a solubilidade dos analitos e a cinética de dessorção dos mesmos. Porém, em temperaturas maiores do que a temperatura ambiente torna-se necessário o uso de banhos aquecedores, dificultando o processo. A integridade dos analitos também pode ser comprometida com a utilização de altas temperaturas.

O solvente de dessorção também está diretamente relacionado à solubilidade dos analitos e ao coeficiente de partição dos analitos entre a fase estacionária e a solução. Solventes que tenham um maior poder de solvatação dos analitos farão com que o processo de dessorção seja mais rápido e mais eficiente, uma vez que os analitos possuem maior afinidade pela solução do que pela fase.

Diferentes parâmetros de extração, como tempos de adsorção e dessorção, tipo de fibra, temperatura, solvente, entre outros, podem gerar a extração de diferentes tipos e concentrações de metabólitos, portanto um planejamento experimental pode fornecer a melhor condição de extração e dessorção, e assim, com uma maior gama de metabólitos, aumenta-se a chance de encontrar biomarcadores para diferenciação entre pacientes saudáveis e doentes.

1.3 Planejamento experimental

O planejamento de experimentos ajuda a investigar os efeitos de diferentes variáveis de um sistema, ao mesmo tempo. No estudo de metabolômica, a utilização de planejamentos experimentais pode ser uma ferramenta essencial para obtenção das condições experimentais que fornecem a maior gama e concentração de metabólitos de um sistema. Existem diversos tipos de planejamento experimental, entre eles os experimentos fatoriais (completo e fracionário), experimentos de superfície de resposta, experimentos de mistura e experimentos de Taguchi.

O planejamento fatorial completo é a principal abordagem utilizada quando se deseja identificar, dentre várias, as variáveis que são mais significativas sobre uma

determinada resposta estudada. Na utilização desse planejamento, geralmente deve-se selecionar k variáveis para serem testadas em dois níveis distintos, assim, determinando o número de experimentos necessários na avaliação por 2^k . Na abordagem fracionada, definida por 2^{k-b} experimentos, onde b é o tamanho da fração, o conhecimento do sistema é ligeiramente diminuído, uma vez que não serão variados todos os parâmetros estudados, porém, matematicamente é possível deduzir o efeito de cada variável.⁵⁶

Experimentos de superfície de resposta são utilizados para refinar e otimizar a resposta após a seleção das variáveis significativas. Modelos como Central Composto, Plackett-Burman e *simplex centroid* são exemplos de modelos de delineamento experimental que possibilitam a obtenção de superfícies de resposta para a variável selecionada. *Simplex centroid* é um modelo experimental especificamente utilizado para otimização de misturas de solventes, enquanto Central Composto e Plackett-Burman são modelos utilizados para otimização de quaisquer variáveis que não incluam misturas de solventes, como por exemplo pH, temperatura, pressão, tempo e etc.^{56,57}

O modelo de experimentos de Taguchi leva em consideração que alguns parâmetros não poderão ser controlados, dessa forma, o modelo considera estes parâmetros como ruído. Os experimentos de Taguchi são utilizados para encontrar condições que minimizem o ruído, de forma que o resultado final possua a menor variação possível independentemente das alterações nos parâmetros ruído.^{56,57}

Quando se utilizam planejamentos experimentais, as respostas obtidas para cada experimento devem ser tratadas estatisticamente, a fim de identificar quais, entre as variáveis estudadas, ou quais as interações entre as variáveis são importantes para a maximização da resposta. Quando mais de uma resposta é importante, pode-se utilizar funções que englobem todas as respostas em um único número, como por exemplo a desejabilidade global do sistema, desenvolvida originalmente por Derringer e Suich em 1980. A função desejabilidade (d) (Eq. 3) é uma normalização entre os valores máximos e mínimos obtidos em cada resposta, de maneira que as mesmas são convertidas em valores entre zero e um. Após a normalização de cada resposta, é feito o cálculo da desejabilidade global (Eq. 4), onde cada desejabilidade é elevada a um exponencial (fator de importância da resposta) e multiplicada pelas demais.

$$Desejabilidade (d) = \left(\frac{R - R_{min}}{R_{max} - R_{min}} \right)^f \quad \text{Eq. (3)}$$

$$Desejabilidade Global = \left(\sum \left(\frac{R - R_{min}}{R_{max} - R_{min}} \right)^f \right)^{\frac{1}{n}} \quad \text{Eq. (4)}$$

Onde R é a resposta, R_{min} é a resposta mínima, $R_{máx}$ é a resposta máxima, f é o fator de peso da resposta, e n é o número de respostas.

Após a obtenção de um valor único que represente as repostas desejadas, é comum a análise estatística entre as amostras estudadas, utilizando a análise de variância, ANOVA, que fornece o valor p para cada experimento. O valor p é definido como um valor de probabilidade, entre 0 e 1, que mede as chances de que o resultado obtido seja apenas ao acaso, e não devido às variações experimentais. Assim, um valor p inferior a 0,05 indica que a probabilidade de que o resultado obtido seja devido ao acaso, é inferior a 5%, e por sua vez, mostra que as variações experimentais foram responsáveis pela resposta com uma certeza maior que 95%.

O diagrama de Pareto é uma abordagem gráfica também utilizada para a seleção de variáveis importantes para determinado processo⁵⁸. Cada variável ou interação entre variáveis é processada na forma de colunas do gráfico, de modo que aquelas com maiores valores de resposta são as variáveis de maior importância. Portanto, a partir da utilização do diagrama de Pareto e análise de variância, as variáveis significativas serão aquelas que apresentam os maiores valores de respostas e que possuem valor p inferior ao valor crítico, usualmente padronizado por 0,05.^{59,60}

1.4 Síndrome de *cri-du-chat*

A síndrome de *cri-du-chat* (SCDC), descoberta pelo francês Jérôme Lejeune, é assim chamada devido ao som emitido pelos portadores desta doença, que se assemelha com o miar de gatos (*cri-du-chat* em francês). A rara síndrome, que acomete um a cada 15.000-50.000 recém nascidos, é causada pela deleção parcial do menor braço do cromossomo 5 (–5p). Entre as deficiências físicas causadas pela doença, estão cabeça pequena (microcefalia), rosto redondo, olhos amplamente espaçados, baixa ponte nasal, desenvolvimento atrasado, baixa estatura, magreza, mandíbula pequena (micrognastia), atraso intelectual, mudanças cardíacas, entre outros.^{61,62}

Apesar de se tratar de uma doença genética e sem cura, intervenções precoces nos portadores possibilitam um melhor desenvolvimento das crianças afetadas, minimizando os efeitos da doença. Uma das possíveis intervenções é o uso de medicamentos capazes de regular diferentes aminoácidos no organismo dos pacientes e estímulo para melhorar a capacidade de alimentação dos pacientes.^{61–63}

Algumas modificações metabólicas são conhecidas nos pacientes com SCDC, como por exemplo alterações no teor de prolina e treonina na urina, além de

concentrações elevadas de aspartato, asparagina e histidina, sendo que as alterações em aspartato e asparagina foram observadas em plasma e urina, enquanto a presença de histidina foi observada na urina de portadores, e não dos controles. As alterações descritas até então apontam diferentes variações em rotas metabólicas do organismo dos portadores, que se tornam possíveis focos para intervenções médicas, a fim de buscar melhoria dos sintomas dos pacientes. No entanto, poucos trabalhos foram reportados a respeito da SCDC, de modo que os efeitos metabólicos da deleção promotora desta doença ainda não são completamente conhecidos.^{61,63}

2 OBJETIVOS

Revelar novas diferenças metabólicas entre portadores e não portadores de síndrome de cri-du-chtat (SCDC), para o desenvolvimento de diagnósticos e terapias capazes de minimizar sintomas da doença. Para isto, análises metabolômicas utilizando Bio-SPME para a extração de metabólitos presentes no sangue dos pacientes (portadores e não portadores de SCDC), e análise por espectrometria de massas por inserção direta (DIMS), de forma *untarget* foram utilizadas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coleta do sangue de portadores e não portadores de SCDC

O sangue de portadores e não portadores de SCDC foi obtido em parceria com o professor Nilson Antônio de Assunção, da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). As coletas de amostras biológicas de portadores da SCDC foram realizadas mediante a aplicação do termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo III) e aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa (Anexo IV) parecer: 226.594 da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

O sangue dos pacientes (n=25) e controles (n=30) foi coletado em tubos contendo EDTA e inibidor de proteases, e em seguida o material foi centrifugado por 20 min à $5000 \times g$. Posteriormente, o plasma foi transferido para tubos eppendorfs estéreis e armazenado à -80°C . O grupo controle é constituído pelos familiares dos portadores de SCDC, sendo estes selecionados em prol de minimizar diferenças ambientais entre os grupos.

3.2 Extração de metabólitos por Bio-SPME

A extração dos metabólitos foi promovida utilizando-se fibras de Bio-SPME comerciais (Sigma-Aldrich, USA), contendo fase extratora de C18 (partículas de 45 µM). Primeiramente foi realizada uma otimização dos parâmetros de extração e dessorção com o plasma de não portadores de SCDC, utilizando planejamentos experimentais. Após a obtenção das melhores condições experimentais, foram então extraídos os metabólitos do plasma de portadores de SCDC.

3.2.1 Planejamentos experimentais utilizando plasma de não portadores de SCDC

O protocolo de extração e dessorção dos metabólitos foi otimizado a partir de experimentos de perfil de tempo de extração (*extraction time profile*), bem como utilizando planejamento fatorial 2⁴ (**Tabela 5**), em seguida um planejamento 2³ (**Tabela 6**), avaliando outros parâmetros e, por fim, a avaliação do solvente de dessorção através do modelo *simplex centroid*.

O experimento de perfil de tempo de extração é utilizado para encontrar o ponto de saturação da fibra, onde independente do tempo, não ocorrerá um aumento na quantidade de analitos adsorvidos na fibra.

Os parâmetros utilizados para o planejamento fatorial 2⁴ foram:

- I. tempo de extração, utilizando 1 min como limite inferior e 30 min como limite superior.
- II. tempo de dessorção, utilizando 1 min como limite inferior e 30 min como limite superior.
- III. temperatura da dessorção, utilizando banho a 40 °C no limite superior e 25 °C para o limite inferior.
- IV. diferente composição do solvente de dessorção, utilizando água como limite superior e solução água:metanol 3:7 (v/v) como limite inferior. Água foi utilizada devido à própria matriz de extração ser uma solução aquosa dos analitos (soro humano), enquanto metanol foi utilizado em busca em aumentar o coeficiente de partição dos analitos entre a fase estacionária e a solução.

Cada extração foi efetuada em alíquotas de 250 µL de um pool amostral de plasma. As fibras foram limpas e recondicionadas após cada dessorção, utilizando mistura de água:metanol 1:1 (v/v) por 60 min, a fim de evitar efeitos de *carryover*.

Tabela 5. Planejamento fatorial 2^4 com ponto central, empregando 1 min como limite inferior de tempo e 30 min como limite superior; para solventes foi-se utilizado 100% água como limite superior (maior semelhança à matriz) e 70% metanol como limite inferior; para temperatura foi-se utilizado 40 °C como limite superior e 25 °C (temperatura ambiente) como limite inferior.

Lote 1 - Soro	Variáveis			
	Tempo de Extração	Tempo de Dessorção	Solvente de Dessorção	Temperatura na dessorção
Experimentos				
1	30 min	30 min	Água	40 °C
2	30 min	30 min	Água	25 °C
3	30 min	30 min	70 %MeOH	25 °C
11	30 min	30 min	70 %MeOH	40 °C
4	30 min	1 min	Água	25 °C
10	30 min	1 min	Água	40 °C
9	30 min	1 min	70 %MeOH	40 °C
12	30 min	1 min	70 %MeOH	25 °C
5	1 min	30 min	Água	25 °C
8	1 min	30 min	Água	40 °C
7	1 min	30 min	70 %MeOH	40 °C
13	1 min	30 min	70 %MeOH	25 °C
6	1 min	1 min	Água	40 °C
14	1 min	1 min	Água	25 °C
15	1 min	1 min	70 %MeOH	25 °C
16	1 min	1 min	70 %MeOH	40 °C
17 - Ponto Central	15,5 min	15,5 min	35% MeOH	32,5 °C
18 - Ponto Central	15,5 min	15,5 min	35% MeOH	32,5 °C
19 - Ponto Central	15,5 min	15,5 min	35% MeOH	32,5 °C
20 - Ponto Central	15,5 min	15,5 min	35% MeOH	32,5 °C

Fonte: Autoria própria.

A partir dos resultados obtidos do planejamento 2^4 , um novo planejamento foi proposto, a fim de avaliar a qualidade da extração por Bio-SPME com volumes menores para extração e dessorção, além de variar o solvente utilizado para dessorção. Os parâmetros avaliados no planejamento 2^3 foram:

- I. Volume de amostra para extração, utilizando 150 µL como limite inferior e 250 µL como limite superior;
- II. Volume de solvente de dessorção, utilizando 150 µL como limite inferior e 250 µL como limite superior;
- III. Solvente de dessorção, utilizando como limite superior uma mistura de 70% de metanol em água e como limite inferior uma mistura de 70% de acetonitrila em água.

Tabela 6. Planejamento fatorial 2^3 , utilizando 250 μL para limite superior de volume de amostra e solvente de dessorção, e 150 μL como limite inferior; para o parâmetro solvente de dessorção, foi-se utilizado metanol 100% como limite superior e acetonitrila 100% como limite inferior.

Soro	Variáveis		
Experimentos	Volume Amostra (μL)	Volume Dessorção (μL)	Solvente
1	250	250	Metanol
2	250	150	Metanol
3	150	250	Metanol
4	150	150	Metanol
5	150	250	Acetonitrila
6	250	150	Acetonitrila
7	150	150	Acetonitrila
8	250	250	Acetonitrila

Fonte: Autoria própria.

A partir dos resultados obtidos pelos planejamentos 2^4 e 2^3 , foram feitos novos experimentos variando a mistura de solvente de dessorção, através do modelo *simplex centroid*, buscando a melhor extração dos analitos. Foram variadas as proporções de água, metanol e acetonitrila, como demonstrado na **Figura 22**.

Figura 22. Representação gráfica do modelo *simplex centroid* utilizado para a otimização do solvente de dessorção, com 10 pontos.

Fonte: autoria própria.

3.2.2 Parâmetros otimizados utilizados para extração de metabólitos do plasma de portadores de SCDC

As melhores condições experimentais encontradas para o processo de extração dos metabólitos foram: condicionamento prévio das fibras utilizando-se uma mistura água: metanol 1:1 (v:v), por 1 h. Após o condicionamento, as fibras foram inseridas em *vials* contendo 150 μ L de plasma. A extração dos metabólitos foi promovida a temperatura ambiente (25 °C) e sob agitação de 1200 rpm, por 10 min. Para a dessorção dos metabólitos foram utilizados os mesmos parâmetros de tempo, agitação e temperatura, porém utilizando 150 μ L de metanol puro como solvente de dessorção. As fibras foram limpas em água ultrapura por 5 s previamente à dessorção, para remoção de proteínas e sais que pudessem estar na superfície da fibra.

3.3 Espectrometria de massas por inserção direta (DIMS)

Os materiais extraídos foram analisados por inserção direta no espectrômetro de massas, Orbitrap Velos (Thermo Fisher Scientific, Bremen) equipado com uma fonte de

ionização por *electrospray* aquecida (HESI). O software utilizado para aquisição dos dados foi o LTQTune, e para processamento dos espectros foi utilizado o Xcalibur. Os dados obtidos foram analisados utilizando o software Statistica 8.0.

As condições experimentais do equipamento de espectrometria de massas foram: *Tuning* para íon 524 m/z , temperatura da fonte de 45 °C, fluxo de *sheath gas* e gás auxiliar de 0 u.a., voltagem no spray de 3,5 kV e temperatura do capilar de 275 °C. As injeções foram realizadas por inserção direta, com fluxo de injeção de 5 $\mu\text{L min}^{-1}$. As análises de DIMS para otimização dos parâmetros de extração e dessorção foram realizadas na faixa de m/z 50-2000.

A fim da obtenção da maior gama de informação possível, as análises metabolômicas das amostras, após a otimização da extração e dessorção dos metabólitos, foram utilizadas quatro faixas de aquisição no espectrômetro de massas: m/z 50-600, m/z 100-600, m/z 50-1500 e m/z 500-2000; em todos os casos foram feitas aquisições no modo positivo e negativo. Foi adicionado 3 μL de solução calibrante (ThermoFisher, USA), como padrão interno em cada amostra final.

Após as análises das amostras de *cri-du-chat*, os dados obtidos em alta resolução não puderam ser submetidos a análise estatística, uma vez que o software LTQtune não possibilita o alinhamento automático dos dados. Normalmente, este procedimento é promovido utilizando-se softwares de terceiros, como por exemplo MZmine, porém, estes softwares foram produzidos para o alinhamento de dados de LC-MS e CG-MS, de modo que faz uso dos tempos de eluição dos metabólitos para o alinhamento dos dados. No caso das análises por inserção direta, não existe a separação cromatográfica dos metabólitos, não existindo, portanto, o parâmetro de tempo de eluição. Sem este parâmetro, os softwares convencionais para alinhamento dos dados não são capazes de promover o alinhamento dos dados obtidos por inserção direta.

Até a data desta etapa, nenhum software comercial de fácil acesso e amigável ao usuário era capaz de promover o alinhamento dos dados obtidos por inserção direta, sendo necessário ao usuário um conhecimento prévio de programação e linguagem Phyton ou R. A partir das dificuldades encontradas, foi então desenvolvido em parceria com o cientista de computação Rodolfo Guimarães Ferreira, um software em linguagem .NET (dot-net) para o alinhamento dos dados, utilizando o software de programação Microsoft Visual Studio Community, 2017, de modo que o software desenvolvido fosse de fácil acesso e fácil usabilidade para leigos em programação. As linhas de programação que compõem o software são mostradas no ANEXO 1.

Após o alinhamento dos dados, estes foram utilizados para análises estatísticas utilizando o software MetaboAnalyst 4.0[®], por se tratar de uma plataforma online e gratuita para análise de dados metabolômicos. Apenas sinais presentes em 80% das amostras foram levados em consideração para a geração dos modelos estatísticos. Foram utilizados análise de componentes principais (*principal component analysis*, PCA) e análise discriminante por mínimos quadrados parciais (*partial least squares - discriminant analysis*, PLS-DA) como métodos de análise multivariada.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Otimização do processo de extração por Bio-SPME

Inicialmente os parâmetros de extração e dessorção dos metabólitos por Bio-SPME foram otimizados utilizando plasma de não portadores de SCDC, a fim de garantir a maior abrangência de metabólitos. Para tal, foi utilizado a curva de perfil de tempo de extração, para encontrar o tempo ideal para a extração de maior variedade de metabólitos, dois planejamentos fatoriais a fim de encontrar os parâmetros experimentais mais importantes para a extração e dessorção dos analitos e, por fim, a otimização do solvente de dessorção através de um modelo *simplex centroid*.

4.1.1 Perfil de tempo de extração

Para a procura de biomarcadores, a metodologia analítica proposta deve ser o mais abrangente possível, dentro da faixa de interesse, abrangendo a maior variedade e quantidade de analitos. Com isso em mente, duas respostas são fundamentais para a avaliação da metodologia: número de sinais e intensidade dos sinais. O número de sinais nos informa a diversidade de metabólitos extraída, em termos de números de analitos diferentes, enquanto a intensidade dos sinais nos adverte a respeito das quantidades extraídas de cada metabólito.

As análises de número de picos (**Figura 23**) e intensidade total do espectro de massas (**Figura 24**) em função do tempo de extração, demonstraram que tempos curtos são suficientes para a extração satisfatória dos metabólitos presentes na amostra, uma vez que a diferença no número de sinais entre tempos curtos e longos de extração, é inferior a 1% dos sinais. O tempo de 1 min apresentou uma baixa intensidade total, porém, o número de sinais no espectro de massas foi semelhante aos demais experimentos. Este fator pode ser indício de que a extração em termos de concentração foi menor no tempo de 1 min, porém em termos de diversidade de analitos, foi igual aos demais tempos. A

extração por 10 min, segundo ponto dos gráficos, apresentou por sua vez uma forte intensidade total e um número de sinais semelhante aos demais experimentos. A partir de 60 min ocorre um aumento na área total dos espectros, porém o tempo de análise se torna muito longo, e ocorre um decréscimo no número de sinais dos espectros. Desta forma, tempos maiores que 10 min não se mostraram necessários e/ou benéficos para a melhor extração dos analitos.

Figura 23. Contagem de sinais na extração dos analitos ao longo do tempo.

Fonte: Autoria própria.

Figura 24. Perfil de extração dos analitos ao longo do tempo, utilizando a intensidade total de sinais como resposta.

Fonte: Autoria própria.

4.1.2 Resultados obtidos pelo planejamento fatorial 2⁴

Para o planejamento fatorial 2⁴ foram variados: *i*) tempo de extração, utilizando 1 min como limite inferior e 30 min como limite superior, *ii*) tempo de dessorção, utilizando 1 min como limite inferior e 30 min como limite superior, *iii*) temperatura da dessorção, utilizando 40 °C no limite superior e 25 °C para o limite inferior, e *iv*) diferente composição do solvente de dessorção, utilizando água como limite superior e solução água:metanol 3:7 (v/v) como limite inferior. Os valores de cada variável foram codificados como +1 para os limites superiores e -1 para os limites inferiores. Os experimentos foram realizados seguindo uma ordem aleatória.

Em análises por inserção direta no espectrômetro de massas a comparação entre intensidades de dois sinais trata-se de uma tarefa complexa, uma vez que um deles pode apresentar um sinal maior devido à melhor ionização deste composto, e não devido à sua maior concentração na amostra. Outro possível problema relacionado à intensidade dos sinais é a possibilidade de ionização diferente em cada amostra. Apesar de serem extraídas da mesma matriz, em algumas amostras a composição do solvente de dessorção varia (água ou água:metanol), podendo acarretar diferenças na ionização dos analitos. Para contornar este problema, é possível normalizar a intensidade de cada sinal em relação ao padrão interno, minimizando este efeito. Portanto, um padrão interno de histidina, 10 µg mL⁻¹, foi adicionado à amostra de soro, previamente à extração dos analitos por Bio-SPME. Além da histidina, um padrão interno de fenilalanina, 10 µg mL⁻¹ foi adicionado na amostra final a ser analisada.

Uma vez que a histidina é adicionada à amostra inicial, sua concentração na amostra final irá variar apenas de acordo com as condições de extração e dessorção utilizadas, fornecendo informações interessantes sobre a extração de compostos polares. Porém, a capacidade de extração e dessorção apenas da histidina não é uma resposta global do sistema, ou seja, a quantidade de histidina extraída e dessorvida não é diretamente relacionada à capacidade de extração/dessorção de todos os analitos presentes na matriz, uma vez que determinada condição experimental pode favorecer, por exemplo, apenas a extração/dessorção de compostos mais ou menos polares. Apesar de não ideal para a avaliação de toda a faixa de metabólitos extraída, o uso da histidina fornece informações relacionadas à sua faixa de polaridade.

A adição do fenilalanina diretamente na amostra, por outro lado, possibilita a normalização dos sinais do espectro de massas em função da intensidade deste padrão,

uma vez que a concentração do mesmo é conhecida dentro da amostra final, e não varia em função da condição de extração utilizada.

A **Tabela 7** apresenta o planejamento fatorial e as respostas obtidas para cada experimento, para análises no modo positivo. As barras vermelhas e verdes presentes nas colunas de resposta representam o valor relativo de cada resposta, sendo que a célula completamente preenchida pela barra corresponde ao valor máximo dentre as respostas. As análises incluíram quatro replicatas do ponto central (uma para cada fibra utilizada nas extrações) e foi considerado como resposta a normalização dos sinais em função do padrão de fenilalanina (concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$). No lugar de número total de picos, foram considerados apenas os sinais com intensidade superior à média do branco.

Para os cálculos de desejabilidade global, foi utilizado a resposta número de picos ($f = 2$), intensidade total ($f = 1$) e intensidade normalizada ($f = 1$), atribuindo maior importância para a quantidade de metabólitos extraídos, ao invés de maior concentração de metabólitos extraídos.

A fim de selecionar quais as variáveis significativas dentro da faixa estudada, as repostas foram analisadas por diagramas de Pareto. O diagrama de Pareto para o número de picos, **Figura 25a**, nos mostra quais variáveis são importantes para a extração do maior número de compostos possível, enquanto os diagramas para a soma das intensidades totais, **Figura 25b**, nos informa qual variável é responsável pela maior intensidade dos íons, podendo ser relacionada à concentração ou à melhor ionização dos metabólitos, e a **Figura 25c** nos apresenta o diagrama de Pareto utilizando como resposta a intensidade total normalizada pelo padrão interno. O diagrama de Pareto da desejabilidade Global, **Figura 25d**, é a principal ferramenta para a avaliação do sistema, uma vez que a função desejabilidade leva em consideração todas as respostas avaliadas. O valor $p = 0,05$ indica o limite de significância (5%), assim, apenas variáveis com valores de $p < 0,05$ são consideradas significativas, uma vez que tem probabilidade menor de 5% de que o efeito tenha ocorrido ao acaso.

Assim, podemos observar que apenas o solvente de dessorção é considerado uma variável significativa, com melhor resposta para o limite inferior, ou seja, proporção 30% água:70% metanol (v/v). Este experimento provou que a utilização de 30% água:70% metanol (v/v) influencia diretamente na concentração de metabólitos extraídos, e não apenas favorece a ionização dos compostos, uma vez que foi feita a normalização com o padrão interno, a fim de corrigir alterações na ionização da amostra.

A **Tabela 8** apresenta as respostas obtidas para os experimentos do planejamento 2^4 , utilizando o modo negativo de ionização. A **Figura 26** apresenta os diagramas de Pareto para as respostas utilizadas: **Figura 26a**, número de picos com intensidade superior ao branco; **Figura 26b**, soma das intensidades; **Figura 26c**, soma das intensidades normalizadas; **Figura 26d**, desejabilidade global.

Tabela 7. Variáveis e respostas do segundo planejamento fatorial 2⁴ com 4 pontos centrais, para o modo positivo. As colunas incluem valores codificados para as variáveis e os resultados relativos a cada uma das respostas empregadas. As respostas de desejabilidade são comparativas entre todos os valores da coluna, sendo desejabilidade igual a 1 para o maior valor, e 0 para o menor valor desta resposta. A desejabilidade global é gerado a partir de todas as respostas de desejabilidade. As barras coloridas indicam visualmente os valores das células, quanto maior a barra, maior o valor em relação aos demais valores desta coluna. Barras vermelhas foram utilizadas nos dados brutos e barras verdes foram utilizadas para os cálculos de desejabilidade.

Experimentos	Variáveis				Respostas						
	Tempo de Extração	Tempo de Dessorção	Solvente de Dessorção	Temperatura da dessorção	Número de sinais com Intensidade maior que a média do branco	Desejabilidade número total de sinais	Soma das Intensidades	Desejabilidade soma das intensidades	Soma das intensidades normalizadas	Desejabilidade Soma das intensidades normalizadas	Desejabilidade Global
1	+1	+1	+1	+1	727	0.174	8038557	0.013	7.825	0.009	0.015
2	+1	+1	+1	-1	541	0.000	7435553	0.008	6.955	0.000	0.000
3	+1	+1	-1	-1	1475	0.874	113573580	0.736	106.237	1.000	0.825
4	+1	-1	+1	-1	783	0.226	8722348	0.017	8.784	0.018	0.025
5	-1	+1	+1	-1	856	0.295	9435403	0.022	14.400	0.075	0.052
6	-1	-1	+1	+1	910	0.345	11347704	0.035	16.992	0.101	0.075
7	-1	+1	-1	+1	1482	0.880	117081412	0.760	60.352	0.538	0.682
8	-1	+1	+1	+1	603	0.058	6201483	0.000	10.622	0.037	0.000
9	+1	-1	-1	+1	1610	1.000	152155603	1.000	55.251	0.486	0.786
10	+1	-1	+1	+1	786	0.229	8504422	0.016	12.645	0.057	0.036
11	+1	+1	-1	+1	1372	0.777	99807269	0.641	57.818	0.512	0.583
12	+1	-1	-1	-1	1443	0.844	132997965	0.869	38.743	0.320	0.583
13	-1	+1	-1	-1	1492	0.890	116328135	0.755	60.857	0.543	0.687
14	-1	-1	+1	-1	842	0.282	9146041	0.020	14.993	0.081	0.051
15	-1	-1	-1	-1	1371	0.776	92494533	0.591	58.382	0.518	0.569
16	-1	-1	-1	+1	1416	0.819	95925286	0.615	62.367	0.558	0.613
17 - Ponto Central	0	0	0	0	1138	0.558	36224668	0.206	36.048	0.293	0.266
18 - Ponto Central	0	0	0	0	1095	0.518	28886837	0.155	34.764	0.280	0.227
19 - Ponto Central	0	0	0	0	1110	0.532	34774763	0.196	37.262	0.305	0.257
20 - Ponto Central	0	0	0	0	1048	0.474	18095599	0.081	17.302	0.104	0.124

Fonte: Autoria própria.

Figura 25. Diagramas de Pareto para as respostas avaliadas no segundo planejamento 2⁴: (a) número de picos com intensidade superior ao branco, (b) soma das intensidades, (c) Soma das intensidades normalizada e (d) desejabilidade global.

Fonte: autoria própria.

Tabela 8. Variáveis e respostas do segundo planejamento fatorial 2⁴ com 4 pontos centrais para o modo negativo. As colunas incluem valores codificados para as variáveis e os resultados relativos a cada uma das respostas empregadas. As respostas de desejabilidade são comparativas entre todos os valores da coluna, sendo desejabilidade igual a 1 para o maior valor, e 0 para o menor valor desta resposta. A desejabilidade global é gerado a partir de todas as respostas de desejabilidade. As barras coloridas indicam visualmente os valores das células, quanto maior a barra, maior o valor em relação aos demais valores desta coluna. Barras vermelhas foram utilizadas nos dados brutos e barras verdes foram utilizadas para os cálculos de desejabilidade.

Experimentos	Variáveis				Respostas						
	Tempo de Extração	Tempo de Dessorção	Solvente de Dessorção	Temperatura da dessorção	Número de sinais com Intensidade maior que a média do branco	Desejabilidade número total de sinais	Soma das Intensidades	Desejabilidade soma das intensidades	Soma das intensidades normalizadas	Desejabilidade Soma das intensidades normalizadas	Desejabilidade Global
1	+1	+1	+1	+1	207	0.272	697,142	0.112	36.19	0.721	0.181
2	+1	+1	+1	-1	206	0.259	690,484	0.098	47.55	1.000	0.188
3	+1	+1	-1	-1	218	0.407	906,130	0.552	8.65	0.044	0.159
4	+1	-1	+1	-1	211	0.321	732,547	0.187	22.85	0.393	0.196
5	-1	+1	+1	-1	221	0.444	787,320	0.302	26.09	0.472	0.304
6	-1	-1	+1	+1	227	0.519	789,505	0.307	26.33	0.478	0.340
7	-1	+1	-1	+1	233	0.593	923,818	0.589	12.76	0.145	0.311
8	-1	+1	+1	+1	185	0.000	643,725	0.000	22.53	0.385	0.000
9	+1	-1	-1	+1	231	0.568	991,877	0.733	9.62	0.068	0.252
10	+1	-1	+1	+1	236	0.630	833,058	0.398	34.28	0.674	0.474
11	+1	+1	-1	+1	245	0.741	1,118,865	1.000	6.87	0.000	0.000
12	+1	-1	-1	-1	223	0.469	871,204	0.479	12.46	0.137	0.244
13	-1	+1	-1	-1	225	0.494	850,299	0.435	14.49	0.187	0.271
14	-1	-1	+1	-1	232	0.580	847,785	0.429	27.10	0.497	0.416
15	-1	-1	-1	-1	266	1.000	1,065,879	0.888	13.22	0.156	0.518
16	-1	-1	-1	+1	253	0.840	1,030,091	0.813	13.46	0.162	0.453
17 - Ponto Central	0	0	0	0	266	1.000	1,060,022	0.876	24.28	0.428	0.721
18 - Ponto Central	0	0	0	0	204	0.235	726,082	0.173	19.09	0.300	0.142
19 - Ponto Central	0	0	0	0	219	0.420	771,199	0.268	23.45	0.408	0.268
20 - Ponto Central	0	0	0	0	206	0.259	704,762	0.128	23.86	0.418	0.153

Fonte: Autoria própria.

Figura 26. Diagramas de Pareto para as respostas avaliadas no segundo planejamento 2⁴ no modo negativo: (a) número de picos com intensidade superior ao branco, (b) soma das intensidades, (c) Soma das intensidades normalizada e (d) desejabilidade global.

Fonte: Autoria própria.

Para as respostas dos experimentos no modo negativo, o número de picos não variou significativamente com as diferentes condições de extração e dessorção. A soma das intensidades, apesar de apresentar maiores valores para o uso de 70% metanol, não apresentou variação suficiente para gerar uma diferença significativa na função da desejabilidade total, ou seja, quando atribuímos os pesos para cada uma das respostas, a variação nas somas das intensidades não foi suficiente para discriminar as variáveis. De acordo com o diagrama de Pareto para a desejabilidade global, **Figura 26d**, nenhuma das variáveis estudadas foi significativa para os experimentos no modo negativo.

Portanto, de acordo com os resultados obtidos com os experimentos do planejamento 2⁴, o tempo de extração e dessorção, dentro dos limites estudados, não apresentaram um efeito significativo sobre o sistema, o que vem de encontro com informações presentes no artigo de Pawliszyn e colaboradores,^{53,64} em que são feitas extrações e dessorções com tempos entre 1 e 10 min, obtendo resultados semelhantes aos de extrações com maiores tempos. Este resultado se mostra interessante do ponto de vista prático, uma vez que ele comprova que a utilização dos limites inferiores de tempo é suficiente para garantir uma boa extração e dessorção, promovendo um ganho significativo no tempo de análise. No caso dos limites testados neste planejamento, utilizando apenas os limites inferiores de tempo, a diminuição do tempo total de análise é de 58 min. O mesmo ocorre para a temperatura de dessorção, a qual também poderá ser aplicada no limite inferior, diminuindo a complexidade do processo de extração/dessorção.

Desta forma, a melhor condição experimental, entre as avaliadas, e levando-se em consideração os ganhos em tempo e simplicidade, foi a utilização de 1 min de tempo de extração, 1 min de tempo de dessorção, 25 °C e a dessorção deverá ser promovida em uma mistura 30% água:70% metanol (v/v). O espectro de massas gerado no modo positivo por essa condição (experimento 15) é apresentado na **Figura 27**, onde é comparada com o espectro de massas do experimento 3, condição com maior desejabilidade global, e com o espectro de massas do experimento 8, que apresentou a menor desejabilidade global. Como pode ser observado na comparação dos espectros, não existe uma diferença qualitativa visível entre os experimentos 3 e 15, indicando que a utilização da condição com menores tempos de extração e dessorção pode ser utilizada sem a perda de sinais. Estes dados vão de encontro com os dados obtidos pelo experimento de perfil de tempo de extração. Apesar do tempo de 1 min ser vantajoso com relação à diminuição no tempo, buscando a melhor logística para a execução dos

experimentos e a maior intensidade dos sinais, a utilização de 10 min como tempo de extração e dessorção é mais indicada, visto que foi o menor tempo em que tanto o número de sinais, quanto a intensidade total dos mesmos foram iguais à tempos grandes de extração (maior que 30 min) **Figura 23** e **Figura 24**.

Figura 27. Espectros de massas obtidos no modo positivo para diferentes condições.

Fonte: Autoria própria.

O espectro do experimento 15 obtido para modo negativo está apresentado na **Figura 28**, onde é comparado com o experimento 8, que gerou a menor desejabilidade global.

Figura 28. Espectros de massas obtidos no modo negativo para diferentes condições.

Fonte: autoria própria.

4.1.2 Resultados obtidos pelo planejamento fatorial 2³

Um novo planejamento foi efetuado, com as seguintes variáveis: *i*) volume de amostra para extração, utilizando 150 µL como limite inferior e 250 µL como limite superior, *ii*) volume de solvente de dessorção, utilizando 150 µL como limite inferior e 250 µL como limite superior, *iii*) solvente de dessorção, utilizando como limite superior uma mistura de 70% de metanol em água e como limite inferior uma mistura de 70% de acetonitrila em água.

Como o solvente de dessorção foi a única variável significativa de acordo com os experimentos anteriores, foi variado também o solvente utilizado, buscando saber se o tipo de solvente influencia também nos analitos dessorvidos, ou se apenas a porcentagem de solvente orgânico é importante para o processo.

Idealmente o volume de amostra e de solvente de dessorção devem ser suficientes para cobrir toda a superfície adsorvente da fibra de Bio-SPME, dessa forma, utilizando insertes de 300 μL , o menor volume possível de ser utilizado é 150 μL , de modo que este foi selecionado como limite inferior. Para limite superior foi selecionado o volume que vinha sendo utilizado até então, 250 μL , e os solventes utilizados foram 30% água:70% metanol (v/v) para limite superior e 30% água:70% acetonitrila (v/v) para limite inferior.

Os resultados obtidos estão apresentados na **Tabela 9**, para as análises do modo positivo e na **Tabela 10** para o modo negativo. De acordo com os diagramas de Pareto para estes experimentos, **Figura 29** e **Figura 30**, a função desejabilidade global para ambas as polaridades, mostrou que não houve nenhuma variável significativa entre as avaliadas.

Um dos indícios que este resultado nos fornece é que apenas a proporção de solvente é importante, e não o tipo de solvente orgânico utilizado. Para elucidar este ponto, experimentos variando a porcentagem de solvente orgânico, para metanol e acetonitrila, foram efetuados e os resultados são mostrados no item 4.1.3.

Outra conclusão importante obtida a partir do planejamento 2^3 é que o volume de amostra e volume de solvente de dessorção, nos limites avaliados, não influenciam na extração e dessorção. Assim, para experimentos futuros serão utilizados como volume de amostra e dessorção 150 μL , a fim de utilizar a menor quantidade possível de amostra.

Tabela 9. Variáveis e respostas para o planejamento fatorial 2^3 , obtidos para o modo positivo. As colunas incluem valores codificados para as variáveis e os resultados relativos a cada uma das respostas empregadas. As respostas de desejabilidade são comparativas entre todos os valores da coluna, sendo desejabilidade igual a 1 para o maior valor, e 0 para o menor valor desta resposta. A desejabilidade global é gerado a partir de todas as respostas de desejabilidade. As barras coloridas indicam visualmente os valores das células, quanto maior a barra, maior o valor em relação aos demais valores desta coluna. Barras vermelhas foram utilizadas nos dados brutos e barras verdes foram utilizadas para os cálculos de desejabilidade.

Experimentos	Variáveis			Respostas						
	Volume amostra	Volume de dessorção	Solvente	Número de sinais com intensidade maior que branco	Desejabilidade - número de sinais	Soma das intensidades	Desejabilidade - soma das intensidades	Soma das intensidades normalizadas	Desejabilidade soma das intensidades normalizadas	Desejabilidade global
1	+1	+1	+1	1623	0.254	121,722,999.00	1.000	81.91	0.900	0.388
2	+1	-1	+1	1593	0.000	109,240,504.00	0.442	88.96	1.000	0.000
3	-1	+1	+1	1597	0.034	113,147,026.00	0.617	66.05	0.677	0.078
4	-1	-1	+1	1622	0.246	116,512,637.00	0.767	69.79	0.730	0.323
5	-1	+1	-1	1694	0.856	107,116,940.00	0.348	20.70	0.037	0.212
6	+1	-1	-1	1711	1.000	99,357,443.00	0.001	25.83	0.110	0.048
7	-1	-1	-1	1682	0.754	99,335,068.00	0.000	18.05	0.000	0.000
8	+1	+1	-1	1684	0.771	107,706,521.00	0.374	18.26	0.003	0.087

Fonte: Autoria própria.

Tabela 10. Variáveis e respostas para o planejamento fatorial 2^3 , obtidos para o modo negativo. As colunas incluem valores codificados para as variáveis e os resultados relativos a cada uma das respostas empregadas. As respostas de desejabilidade são comparativas entre todos os valores da coluna, sendo desejabilidade igual a 1 para o maior valor, e 0 para o menor valor desta resposta. A desejabilidade global é gerado a partir de todas as respostas de desejabilidade. As barras coloridas indicam visualmente os valores das células, quanto maior a barra, maior o valor em relação aos demais valores desta coluna. Barras vermelhas foram utilizadas nos dados brutos e barras verdes foram utilizadas para os cálculos de desejabilidade.

Experimentos	Variáveis			Respostas						
	Volume amostra	Volume de dessorção	Solvente	Número de sinais com intensidade maior que branco	Desejabilidade - número de sinais	Soma das intensidades	Desejabilidade - soma das intensidades	Soma das intensidades normalizadas	Desejabilidade soma das intensidades normalizadas	Desejabilidade global
1	+1	+1	+1	731	0.172	4,780,826.00	0.032	4.10	0.082	0.042
2	+1	-1	+1	665	0.123	5,005,983.00	0.040	3.69	0.000	0.000
3	-1	+1	+1	642	0.106	5,047,327.00	0.041	4.07	0.077	0.033
4	-1	-1	+1	498	0.000	3,899,379.00	0.000	4.15	0.093	0.000
5	-1	+1	-1	1830	0.981	31,871,088.00	1.000	8.65	1.000	0.987
6	+1	-1	-1	1856	1.000	20,665,704.00	0.599	7.91	0.850	0.799
7	-1	-1	-1	1849	0.995	17,078,401.00	0.471	6.55	0.577	0.646
8	+1	+1	-1	1853	0.998	22,703,200.00	0.672	7.26	0.719	0.784

Fonte: Autoria própria.

Figura 29. Diagramas de Pareto das respostas utilizadas para o planejamento 2^3 no modo positivo: (a) número de picos com intensidade superior ao branco, (b) soma das intensidades, (c) Soma das intensidades normalizada e (d) desejabilidade global.

Fonte: autoria própria.

Figura 30. Diagramas de Pareto das respostas utilizadas para o planejamento 2^3 no modo negativo: (a) soma das intensidades, (b) número de picos com intensidade superior ao branco, (c) Soma das intensidades normalizada e (d) desejabilidade global.

Fonte: autoria própria.

4.1.3 Otimização do solvente de dessorção

As análises anteriores nos permitiram verificar a relevância de parâmetros como tempo de extração e dessorção, volume de amostra e volume de solvente de dessorção e qual solvente de dessorção deveria ser utilizado, porém, não foi promovida a otimização do tipo e proporção do solvente de dessorção. Portanto, análises seguindo o modelo *simplex centroid* foram efetuadas a fim de verificar o melhor solvente de dessorção possível para a obtenção da maior quantidade e variedade de metabólitos. As análises seguiram o modelo exibido na **Figura 22**. Foram feitos testes com e sem adição de 0,1% de ácido fórmico previamente à análise, para melhorar a ionização nas medidas de DIMS. Os resultados da função desejabilidade para as análises contendo ou não ácido fórmico são mostrados na **Tabela 11**, **Tabela 12** e **Tabela 13**.

Os resultados apresentados na **Tabela 11** e **Tabela 12** mostram que a utilização de ácido fórmico não gera, necessariamente, os melhores resultados, sendo que as condições com a maior desejabilidade global foram utilizando apenas metanol, acetonitrila ou uma mistura de metanol e acetonitrila 1:1, sem a adição de ácido fórmico. A **Tabela 13** apresenta os dados do modo positivo e negativos em combinação, sem adição de ácido fórmico, os dados de desejabilidade global neste sistema mostra que o melhor solvente de dessorção a ser utilizado é metanol 100%.

A **Figura 31** apresenta as superfícies de resposta geradas a partir dos dados de desejabilidade global do sistema, levando em consideração o modo positivo e negativo de análise. Podemos observar que a resposta tende a ser maior conforme aumenta-se a proporção de solvente orgânico, e os melhores resultados são obtidos a partir de maior concentração de metanol. Desta forma, para as amostras obtidas de pacientes portadores de síndrome de *cri-du-chat*, foi utilizado 100% metanol como solvente de dessorção, sem adição de ácido fórmico.

Tabela 11. Resultados da otimização para diferentes respostas e desejabilidade global, no modo positivo de análise. As colunas incluem valores codificados para as variáveis e os resultados relativos a cada uma das respostas empregadas. As respostas de desejabilidade são comparativas entre todos os valores da coluna, sendo desejabilidade igual a 1 para o maior valor, e 0 para o menor valor desta resposta. A desejabilidade global é gerado a partir de todas as respostas de desejabilidade. As barras coloridas indicam visualmente os valores das células, quanto maior a barra, maior o valor em relação aos demais valores desta coluna. Barras vermelhas foram utilizadas nos dados brutos e barras verdes foram utilizadas para os cálculos de desejabilidade.

Experimentos	Variáveis				Respostas						
	H2O	MeOH	ACN	Ácido fórmico	Número de sinais com Intensidade maior que a média do branco	Desejabilidade número total de sinais	Soma das Intensidades	Desejabilidade soma das intensidades	Soma das intensidades normalizadas pelo padrão (cafeína)	Desejabilidade Soma das intensidades normalizadas	Desejabilidade Global
1	100%	0%	0%	0	181	0.189	10,441,536.00	0.049	346.95	0.012	0.027
2	0%	100%	0%	0	808	0.849	201,561,498.00	1.000	19,314.06	0.774	0.824
3	0%	0%	100%	0	784	0.824	71,638,360.00	0.353	24,935.04	1.000	0.621
4	66.67%	16.67%	16.67%	0	885	0.931	33,990,035.00	0.166	1,032.07	0.039	0.178
5	16.67%	66.67%	16.67%	0	865	0.909	84,045,089.00	0.415	3,850.16	0.153	0.374
6	16.67%	16.67%	66.67%	0	822	0.864	80,412,648.00	0.397	8,880.47	0.355	0.472
7	50.00%	50.00%	0%	0	880	0.925	36,576,095.00	0.179	919.41	0.035	0.175
8	0%	50.00%	50.00%	0	857	0.901	151,533,300.00	0.751	7,366.00	0.294	0.564
9	50.00%	0%	50.00%	0	845	0.888	49,518,980.00	0.243	3,693.24	0.146	0.304
10-I	33.33%	33.33%	33.33%	0	833	0.876	66,456,959.00	0.327	4,464.99	0.177	0.354
10-II	33.33%	33.33%	33.33%	0	847	0.891	67,329,798.00	0.332	3,114.09	0.123	0.319
10-III	33.33%	33.33%	33.33%	0	830	0.873	48,828,743.00	0.240	3,283.93	0.130	0.287
10-IV	33.33%	33.33%	33.33%	0	876	0.921	77,752,075.00	0.384	3,212.23	0.127	0.346
1 (0,1% A.F.)	100%	0%	0%	1	1	0.000	685,731.00	0.000	53.36	0.000	0.000
2 (0,1% A.F.)	0%	100%	0%	1	871	0.916	178,026,099.00	0.883	4,350.48	0.173	0.504
3 (0,1% A.F.)	0%	0%	100%	1	809	0.851	76,137,962.00	0.376	3,003.47	0.119	0.318
4 (0,1% A.F.)	66.67%	16.67%	16.67%	1	850	0.894	25,978,575.00	0.126	706.34	0.026	0.138
5 (0,1% A.F.)	16.67%	66.67%	16.67%	1	856	0.900	78,400,781.00	0.387	2,634.79	0.104	0.319
6 (0,1% A.F.)	16.67%	16.67%	66.67%	1	863	0.907	90,731,358.00	0.448	2,632.87	0.104	0.337
7 (0,1% A.F.)	50.00%	50.00%	0%	1	718	0.755	27,672,373.00	0.134	701.65	0.026	0.126
8 (0,1% A.F.)	0%	50.00%	50.00%	1	892	0.938	142,441,758.00	0.706	3,285.70	0.130	0.432
9 (0,1% A.F.)	50.00%	0%	50.00%	1	763	0.802	45,635,233.00	0.224	1,602.59	0.062	0.208
10-I (0,1% A.F.)	33.33%	33.33%	33.33%	1	852	0.896	58,248,606.00	0.287	1,284.68	0.049	0.225
10-II (0,1% A.F.)	33.33%	33.33%	33.33%	1	874	0.919	61,387,132.00	0.302	1,473.24	0.057	0.244
10-III (0,1% A.F.)	33.33%	33.33%	33.33%	1	951	1.000	46,915,662.00	0.230	771.85	0.029	0.188

Fonte: Autoria própria.

Tabela 12. Resultados da otimização para diferentes respostas e desejabilidade global, no modo negativo de análise. As colunas incluem valores codificados para as variáveis e os resultados relativos a cada uma das respostas empregadas. As respostas de desejabilidade são comparativas entre todos os valores da coluna, sendo desejabilidade igual a 1 para o maior valor, e 0 para o menor valor desta resposta. A desejabilidade global é gerado a partir de todas as respostas de desejabilidade. As barras coloridas indicam visualmente os valores das células, quanto maior a barra, maior o valor em relação aos demais valores desta coluna. Barras vermelhas foram utilizadas nos dados brutos e barras verdes foram utilizadas para os cálculos de desejabilidade.

Experimentos	Variáveis				Respostas						
	H2O	MeOH	ACN	Ácido fórmico	Número de sinais com Intensidade maior que a média do branco	Desejabilidade número total de sinais	Soma das Intensidades	Desejabilidade soma das intensidades	Soma das intensidades normalizadas pelo padrão (cafeína)	Desejabilidade Soma das intensidades normalizadas	Desejabilidade Global
1	100%	0%	0%	0	234	0.116	319,154.00	0.007	409.17	0.060	0.018
2	0%	100%	0%	0	913	0.999	19,165,435.00	0.971	1,614.88	0.576	0.823
3	0%	0%	100%	0	912	0.997	14,926,816.00	0.755	487.85	0.094	0.413
4	66.67%	16.67%	16.67%	0	241	0.125	1,818,199.00	0.084	313.02	0.019	0.029
5	16.67%	66.67%	16.67%	0	914	1.000	4,249,915.00	0.209	946.03	0.290	0.392
6	16.67%	16.67%	66.67%	0	914	1.000	4,475,024.00	0.220	416.79	0.063	0.241
7	50.00%	50.00%	0%	0	219	0.096	248,664.00	0.004	389.15	0.052	0.012
8	0%	50.00%	50.00%	0	913	0.999	19,724,432.00	1.000	2,607.67	1.000	0.999
9	50.00%	0%	50.00%	0	295	0.195	3,223,293.00	0.156	285.63	0.007	0.035
10-I	33.33%	33.33%	33.33%	0	299	0.200	2,062,875.00	0.097	313.65	0.019	0.042
10-II	33.33%	33.33%	33.33%	0	321	0.229	2,090,517.00	0.098	307.52	0.017	0.044
10-III	33.33%	33.33%	33.33%	0	302	0.204	1,994,179.00	0.093	311.10	0.018	0.041
10-IV	33.33%	33.33%	33.33%	0	304	0.207	1,982,278.00	0.093	311.73	0.019	0.042
1 (0,1% A.F.)	100%	0%	0%	1	145	0.000	172,651.00	0.000	380.29	0.048	0.000
2 (0,1% A.F.)	0%	100%	0%	1	907	0.991	17,502,490.00	0.886	1,055.96	0.337	0.664
3 (0,1% A.F.)	0%	0%	100%	1	912	0.997	8,847,102.00	0.444	435.09	0.071	0.316
4 (0,1% A.F.)	66.67%	16.67%	16.67%	1	235	0.117	1,513,161.00	0.069	293.53	0.011	0.022
5 (0,1% A.F.)	16.67%	66.67%	16.67%	1	913	0.999	1,492,618.00	0.068	671.44	0.172	0.226
6 (0,1% A.F.)	16.67%	16.67%	66.67%	1	912	0.997	3,437,003.00	0.167	408.58	0.060	0.215
7 (0,1% A.F.)	50.00%	50.00%	0%	1	177	0.042	211,027.00	0.002	389.35	0.052	0.006
8 (0,1% A.F.)	0%	50.00%	50.00%	1	911	0.996	15,287,047.00	0.773	1,916.63	0.705	0.815
9 (0,1% A.F.)	50.00%	0%	50.00%	1	367	0.289	4,879,759.00	0.241	268.33	0.000	0.000
10-I (0,1% A.F.)	33.33%	33.33%	33.33%	1	779	0.824	1,883,281.00	0.087	328.04	0.026	0.115
10-II (0,1% A.F.)	33.33%	33.33%	33.33%	1	599	0.590	1,967,688.00	0.092	327.95	0.025	0.093
10-III (0,1% A.F.)	33.33%	33.33%	33.33%	1	913	0.999	1,597,160.00	0.073	365.82	0.042	0.145

Fonte: Autoria própria.

Tabela 13. Desejabilidade global considerando modo positivo e negativo juntos. As colunas incluem valores utilizados para as variáveis e os resultados relativos a cada uma das respostas empregadas. As respostas de desejabilidade são distribuídas entre 0 e 1, quanto mais próximo de 1, melhor a condição para a determinada resposta. A desejabilidade global é gerado a partir de todas as respostas de desejabilidade. As barras coloridas indicam visualmente os valores das células, quanto maior a barra, maior o valor em relação aos demais valores desta coluna.

Experimentos	Variáveis			Respostas						
	H2O	MeOH	ACN	Desejabilidade número de sinais maior que o branco - Modo positivo	Desejabilidade número de sinais maior que o branco - Modo negativo	Desejabilidade soma das intensidades - Modo positivo	Desejabilidade soma das intensidades - Modo negativo	Desejabilidade Soma das intensidades normalizadas modo positivo	Desejabilidade Soma das intensidades normalizadas - Modo negativo	Desejabilidade Global
1	100%	0%	0%	0.189	0.116	0.049	0.007	0.012	0.060	0.029
2	0%	100%	0%	0.849	0.999	1.000	0.971	0.774	0.576	0.846
3	0%	0%	100%	0.824	0.997	0.353	0.755	1.000	0.094	0.523
4	66.67%	16.67%	16.67%	0.931	0.125	0.166	0.084	0.039	0.019	0.073
5	16.67%	66.67%	16.67%	0.909	1.000	0.415	0.209	0.153	0.290	0.389
6	16.67%	16.67%	66.67%	0.864	1.000	0.397	0.220	0.355	0.063	0.345
7	50.00%	50.00%	0%	0.925	0.096	0.179	0.004	0.035	0.052	0.047
8	0%	50.00%	50.00%	0.901	0.999	0.751	1.000	0.294	1.000	0.764
9	50.00%	0%	50.00%	0.888	0.195	0.243	0.156	0.146	0.007	0.106
10-I	33.33%	33.33%	33.33%	0.876	0.200	0.327	0.097	0.177	0.019	0.125
10-II	33.33%	33.33%	33.33%	0.891	0.229	0.332	0.098	0.123	0.017	0.121
10-III	33.33%	33.33%	33.33%	0.873	0.204	0.240	0.093	0.130	0.018	0.112
10-IV	33.33%	33.33%	33.33%	0.921	0.207	0.384	0.093	0.127	0.019	0.122
1 (0.1% A.F.)	100%	0%	0%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.048	0.000
2 (0.1% A.F.)	0%	100%	0%	0.916	0.991	0.883	0.886	0.173	0.337	0.587
3 (0.1% A.F.)	0%	0%	100%	0.851	0.997	0.376	0.444	0.119	0.071	0.326
4 (0.1% A.F.)	66.67%	16.67%	16.67%	0.894	0.117	0.126	0.069	0.026	0.011	0.056
5 (0.1% A.F.)	16.67%	66.67%	16.67%	0.900	0.999	0.387	0.068	0.104	0.172	0.274
6 (0.1% A.F.)	16.67%	16.67%	66.67%	0.907	0.997	0.448	0.167	0.104	0.060	0.274
7 (0.1% A.F.)	50.00%	50.00%	0%	0.755	0.042	0.134	0.002	0.026	0.052	0.028
8 (0.1% A.F.)	0%	50.00%	50.00%	0.938	0.996	0.706	0.773	0.130	0.705	0.600
9 (0.1% A.F.)	50.00%	0%	50.00%	0.802	0.289	0.224	0.241	0.062	0.000	0.000
10-I (0.1% A.F.)	33.33%	33.33%	33.33%	0.896	0.824	0.287	0.087	0.049	0.026	0.164
10-II (0.1% A.F.)	33.33%	33.33%	33.33%	0.919	0.590	0.302	0.092	0.057	0.025	0.153
10-III	33.33%	33.33%	33.33%	1.000	0.999	0.230	0.073	0.029	0.042	0.165

Fonte: Autoria própria.

Figura 31. Superfície de resposta para a desejabilidade global no modo positivo e negativo de análise em (a) 2D e (b) 3D.

(b) Superfície de resposta; Variável: Desejabilidade Global (pos e neg)
R-sqr=.9582; Adj:.9283
Modelo: Quadratico

Fonte: autoria própria.

4.2 Análise metabolômica do plasma de portadores de SCDC

Os metabólitos do plasma de portadores de SCDC foram extraídos por Bio-SPME utilizando os parâmetros otimizados anteriormente. Espectros de massas representativos de portadores e não portadores de SCDC são apresentados na **Figura 32**.

Ao extrair os dados em alta resolução do software Xcalibur, observamos que os dados de m/z não eram idênticos entre as amostras, o que inviabilizava a análise estatística dos dados, uma vez que é necessário que a variável independente seja constante entre as amostras para que seja feita a comparação das variáveis dependentes.

Os softwares convencionais para alinhamento de dados não são capazes de promover o alinhamento de amostras de inserção direta, uma vez que utilizam os tempos de retenção (obtidos em análises de LC, CE e/ou GC) e os íons referentes a cada pico para o alinhamento dos dados. Como nas análises de inserção direta não existe separação, não é possível abrir mão da mesma metodologia para o alinhamento dos dados, e duas amostras geralmente não possuem a composição 100% idêntica, ou seja, a coluna de m/z exportada nunca será idêntica entre diversas amostras. Assim, o único eixo que poderia ser fixo, o eixo de m/z , não é igual entre as amostras, o que impossibilita a obtenção de análises como PCA e PLS-DA.

Foi então necessário desenvolver um novo software, de forma simplificada, para o alinhamento específico de dados de inserção direta. A ideia do software é criar uma lista única de entidades moleculares (m/z) presente em todas as amostras e, posteriormente, comparar os valores de m/z presentes em cada amostra com esta lista geral. Nos casos em que a massa está presente na lista geral, mas não na amostra, o software adiciona este m/z na amostra e insere intensidade igual a 0. Desta forma, após o processamento dos dados, todas as amostras terão os mesmos valores de m/z presentes, em outras palavras, as mesmas variáveis.

Figura 32. Espectros de massas representativos da análise de pacientes (a) portadores e (b) não portadores da síndrome de *cri-du-chat*, análises no modo positivo são apresentadas ao lado esquerdo, e análises no modo negativo ao lado direito.

Fonte: autoria própria.

4.2.1 Desenvolvimento do software para pareamento dos dados - MSdataAlign

As linhas de programação do software na versão atual estão disponíveis no Anexo I deste relatório. O software é 100% funcional, apesar de ainda apresentar possibilidades de ajustes para melhoria na velocidade do tratamento dos dados e para maior simplicidade na interface com o usuário.

Na versão atual do software, o principal gargalo em sua utilização é a capacidade de memória RAM do computador do usuário. Quanto maior o número de amostras, linhas e casas decimais a serem utilizadas no pareamento das amostras, maior o uso de memória RAM pelo software. Existem, porém, algumas estratégias para estes casos, enquanto o software não é atualizado para minimizar o uso de memória.

Uma possível estratégia consiste na utilização dos valores de m/z com menor número de casas decimais, por exemplo duas, assim será possível o pareamento simultâneo de um grande número de amostras. Por exemplo, um cenário com 50 amostras, com espectros de massas variando de 50 a 200 m/z e dados com precisão até na quarta casa decimal. Neste caso, o número máximo de m/z 's em cada amostra será a sequência entre 50 e 200 variando na quarta casa decimal, que é igual a 1.5 milhões de m/z 's. Neste cenário, é impossível fazer o pareamento das amostras simultaneamente, a menos que seja utilizado um supercomputador. É possível diminuir o número de m/z 's em cada amostra simplesmente exportando os dados não com quatro casas decimais, mas com duas casas decimais, de modo que todas as intensidades entre, por exemplo, 50,0055 e 50,0154, são somados e na planilha teremos apenas o m/z 50,01. Assim, o número máximo de m/z 's será a sequência entre 50,00 e 200,00, variando a cada 0,01, resultando em 15 mil m/z 's, 100 vezes menos que utilizando quatro casas decimais. Neste cenário, um computador de 16 Gb de memória RAM deverá ser capaz de promover o pareamento de todas as amostras simultaneamente. Caso não seja possível exportar os dados do software do MS com um número específico de casas decimais, podemos simplesmente utilizar a função “arred” (função para arredondar) do Excel e em seguida gerar uma tabela dinâmica para somar todas as intensidades dos m/z 's iguais, como exemplificado na **Figura 33**.

Outra estratégia possível é gerar uma “planilha referência”, contendo uma sequência completa de m/z 's na faixa das amostras, com o número de casas decimais desejada. Um exemplo prático seria o pareamento de 50 amostras com espectros de massas variando de 50

a 200 m/z , com precisão na terceira casa decimal. Neste exemplo, a “planilha referência” consiste em inserir na coluna A, a sequência de 50,000 até 200,000 variando a cada 0,001 unidades, gerando uma sequência de 150 mil m/z 's, e na coluna B, a intensidade zero para todos os m/z 's. Desta forma, podemos fazer o pareamento de cada amostra, separadamente, com a “planilha referência”, e todas as amostras possuirão todos os 150 mil m/z 's. As amostras que não possuem os m/z 's presentes na planilha referência, terão estes valores adicionados e com intensidade 0.

A interface atual do software desenvolvido é apresentada na **Figura 34**. Ajustes futuros incluirão uma modificação na interface, com a inserção de explicação de cada uma das caixas, bem como a mudança dos escritos para inglês.

Figura 33. Exemplo de arredondamento de m/z 's para menor número de casas decimais. Inicialmente os dados inseridos nas colunas A e B são os dados brutos extraídos diretamente do software do equipamento, em seguida utiliza-se a função “arred” do excel, na coluna D, para arredondar os números presentes na coluna “Mass” para o número de casas decimais desejado. Em seguida copia-se e cola-se a coluna B (valores de intensidade), na coluna E, de modo que os valores de intensidade permaneçam constantes para cada massa (coluna E igual a coluna B). Por fim, insere-se uma tabela dinâmica referente à coluna D e E. Desta forma, é feito o agrupamento de todos os m/z 's iguais e suas respectivas intensidades.

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	Dado bruto			Dado arredondado			Tabela dinâmica	
2	Mass	Intensity		Mass	Intensity		Mass	Intensity
3	50.1076	1818		50.11	1818		50.11	3738
4	50.1106	1920		50.11	1920		50.37	9076
5	50.3679	9076		50.37	9076		50.67	4765
6	50.6663	4765		50.67	4765		51.53	10990
7	51.5304	306		51.53	306		51.63	2674
8	51.5317	4407		51.53	4407		53.04	10247
9	51.5340	6277		51.53	6277		53.76	7070
10	51.6333	2674		51.63	2674		53.9	8073
11	53.0447	4747		53.04	4747		55.16	19589
12	53.0449	5500		53.04	5500			
13	53.7614	7070		53.76	7070			
14	53.8954	8073		53.90	8073			
15	55.1593	1359		55.16	1359			
16	55.1604	8896		55.16	8896			
17	55.1609	9334		55.16	9334			

Fonte: Autoria própria.

Figura 34. Interface do software para pareamento das amostras.

Link para upload dos arquivos

Cada amostra deve estar em uma aba diferente no arquivo do excel, contendo apenas colunas A e B preenchidas, com os m/z na coluna A e as intensidades na coluna B. Nesta caixa inserimos o número de abas (que é igual ao número de amostras presentes no arquivo do excel)

Nesta caixa o usuário deve inserir o número de casas decimais as quais ele deseja utilizar para parear as amostras

Após o preenchimento das caixas, este botão dá início ao pareamento dos dados

Fonte: Autoria própria.

Para um melhor fluxo de análise dos dados, é sugerido prosseguir com o passo a passo a seguir:

1. Inicialmente é necessário selecionar um valor mínimo de intensidade que será considerado um sinal, e não um ruído;
2. Extrair os dados do software do equipamento já com o valor mínimo de intensidade aplicado;
3. Normalizar os dados de intensidade, preferencialmente em função de um padrão interno, a fim de minimizar o efeito de possíveis variações analíticas. Na ausência de padrão interno, pode-se fazer a normalização pela soma das intensidades, por exemplo;
4. Promover o pareamento dos dados de todas as amostras;
5. Subtrair o branco das amostras (subtrair as intensidades);
6. Ordenar os m/z 's de todas as amostras, de modo que a coluna de m/z 's seja idêntica entre todas as amostras (com a mesma sequência de m/z 's);
7. Prosseguir para o tratamento estatístico dos dados nos softwares desejados (Statistica, Minitab, MetaboAnalyst, XLstat e etc).

Para o tratamento estatístico dos dados, é importante ressaltar que nos softwares que fazem uso de planilhas do Excel para analisar os dados (caso do MetaboAnalyst e XLstat, por exemplo), é impossível promover análises multivariadas de um número de m/z 's superior a 16 mil, uma vez que os softwares farão a transposição dos dados, fazendo com que os m/z 's passem a ser colunas ao invés de linhas, e o número máximo de colunas permitidas no Excel é em torno de 16 mil.

Caso as amostras possuam um número superior a 16 mil m/z 's, é aconselhável o uso de menor número de casas decimais, como exemplificado anteriormente, a fim de diminuir o número de m/z 's. Uma vez feita a análise multivariada com o número menor de casas decimais, o usuário poderá verificar os m/z 's com maior impacto na separação dos grupos, voltar à tabela original dos dados, e promover uma análise estatística focada nos m/z 's de interesse, mas desta vez com maior número de casas decimais.

4.2.2 Tratamento estatístico das análises por DIMS

Após o alinhamento dos dados utilizando o software desenvolvido, os dados foram tratados estatisticamente usando a plataforma MetaboAnalyst. Foram gerados os gráficos de PCA e PLS-DA diferenciando os grupos entre pacientes e controle (**Figura 35**), Fonte: autoria

própria. e também diferenciando por faixa etária (**Figura 36**). Para tal, foram considerados crianças os indivíduos entre 0 e 12 anos, adolescentes entre 13 e 17 anos e adultos acima de 18 anos.

Figura 35. Análises multivariadas de (a) PCA e (b) PLS-DA de todas as amostras, sem separação por sexo ou idade.

Fonte: autoria própria.

Sem a separação por faixa etária (Figura 33) não foi possível a diferenciação do paciente com SCDC (região verde) e do controle (região vermelha), nem por PCA e nem PLS-DA. Após a separação de acordo com a idade dos indivíduos, a análise de PCA ainda não foi capaz de diferenciar os grupos, no entanto, a análise de PLS-DA separou satisfatoriamente os indivíduos portadores e não portadores de SCDC (**Figura 36**).

A partir dos dados de PLS-DA foram obtidos os gráficos de importância das variáveis (*variable importance in projection*, VIP scores), apresentados na **Figura 37**. Observamos que os principais metabólitos responsáveis pela separação entre os grupos são diferentes de acordo com a idade dos pacientes, o que pode ser um indício de que o impacto da síndrome de *cri-du-chat* é diferente no metabolismo dos pacientes, de acordo com a faixa etária do indivíduo. Os íons mais importantes apresentam m/z igual a 109,97, 304,28 e 347,14, para crianças, adolescentes e adultos, respectivamente.

Figura 36. Gráficos de (a) PCA e (b) PLS-DA para os dados obtidos de amostras de crianças, adolescentes e adultos.

Fonte: autoria própria.

Figura 37. Importância das variáveis para a separação (VIP scores) para crianças, adolescentes e adultos.

Fonte: autoria própria.

5 CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho mostraram que o preparo de amostras por Bio-SPME, nas condições otimizadas, foi eficiente na discriminação de marcadores entre pacientes e não pacientes da síndrome de cri-du-chat. Os resultados sugerem ainda que o uso de Bio-SPME viabiliza o preparo de amostras de forma rápida e eficiente (30 min para o preparo de 24 amostras) e realizada com baixo volume de amostra (150 µl), o que permite o processamento de muitas amostras em um único dia.

Para o tratamento de dados de DIMS em alta resolução foi desenvolvido um software que realiza o alinhamento dos dados, após o qual é possível promover a análise estatística dos espectros dos grupos controle e paciente. Os resultados de PLS-DA foram capazes de separar os indivíduos com e sem SCDC em três grupos, crianças, adolescentes e adultos, com principais valores de m/z iguais a 109,97, 304,28 e 347,14, respectivamente.

REFERÊNCIAS

- 1 WHO. **Cancer**. Genebra, 2016. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en>. Acesso em: 5 maio 2016.
- 2 ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K. **Biologia molecular da célula**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- 3 WHO. **Breast cancer**. Genebra, 2019. Disponível em: <https://www.who.int/cancer/prevention/diagnosis-screening/breast-cancer/en/>. Acesso em: 11 nov. 2019.
- 4 PEROU, C. M.; SØRLIE, T.; EISEN, M. B.; VAN DE RIJN, M.; JEFFREY, S. S.; REES, C. A.; POLLACK, J. R.; ROSS, D. T.; JOHNSON, H.; AKSLEN, L. A.; FLUGE, Ø.; PERGAMENSCHIKOV, A.; WILLIAMS, C.; ZHU, S. X.; LØNNING, P. E.; BØRRESEN-DALE, A.-L.; BROWN, P. O.; BOTSTEIN, D. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, London, v. 406, n. 6797, p. 747–752, 2000.
- 5 NEVE, R. M.; CHIN, K.; FRIDLYAND, J.; YEH, J.; BAEHNER, F. L.; FEVR, T.; CLARK, L.; BAYANI, N.; COPPE, J. P.; TONG, F.; SPEED, T.; SPELLMAN, P. T.; DEVRIES, S.; LAPUK, A.; WANG, N. J.; KUO, W. L.; STILWELL, J. L.; PINKEL, D.; ALBERTSON, D. G.; WALDMAN, F. M.; MCCORMICK, F.; DICKSON, R. B.; JOHNSON, M. D.; LIPPMAN, M.; ETHIER, S.; GAZDAR, A.; GRAY, J. W. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. **Cancer Cell**, Cambridge, v. 10, n. 6, p. 515–527, 2006.
- 6 KENNECKE, H.; YERUSHALMI, R.; WOODS, R.; CHEANG, M. C.; VODUC, D.; SPEERS, C. H.; NIELSEN, T. O.; GELMON, K. Metastatic behavior of breast cancer subtypes. **Journal of Clinical Oncology**, Alexandria, v. 28, n. 20, p. 3271–3277, 2010.

- 7 DAI, X.; LI, T.; BAI, Z.; YANG, Y.; LIU, X.; ZHAN, J.; SHI, B. Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. **American Journal of Cancer Research**, New York, v. 5, n. 10, p. 2929–2943, 2015.
- 8 PARKER, J. S.; MULLINS, M.; CHEANG, M. C.; LEUNG, S.; VODUC, D.; VICKERY, T.; DAVIES, S.; FAURON, C.; HE, X.; HU, Z.; QUACKENBUSH, J. F.; STIJLEMAN, I. J.; PALAZZO, J.; MARRON, J. S.; NOBEL, A. B.; MARDIS, E.; NIELSEN, T. O.; ELLIS, M. J.; PEROU, C. M.; BERNARD, P. S. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. **Journal of Clinical Oncology**, Alexandria, v. 27, n. 8, p. 1160–1167, 10, 2009.
- 9 SCHOLZEN, T.; GERDES, J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. **Journal of Cellular Physiology**, Hoboken, v. 182, n. 3, p. 311–322, 2000.
- 10 ANDERSON, K. N.; SCHWAB, R. B.; MARTINEZ, M. E. Reproductive risk factors and breast cancer subtypes: a review of the literature. **Breast Cancer Research and Treatment**, New York, v. 144, n. 1, p. 1-10, 2014.
- 11 DAWOOD, S. Triple-negative breast cancer. **Drugs**, Auckland, v. 70, n. 17, p. 2247–2258, 2010.
- 12 LEHMANN, B. D.; BAUER, J. A.; CHEN, X.; SANDERS, M. E.; CHAKRAVARTHY, A. B.; SHYR, Y.; PIETENPOL, J. A. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. **The Journal of Clinical Investigation**, Ann Arbor, v. 121, n. 7, p. 2750–67, 2011.
- 13 BASKAR, R.; LEE, K. A.; YEO, R.; YEOH, K.-W. Cancer and radiation therapy: current advances and future directions. **International Journal of Medical Sciences**, Muzaffarnagar, v. 9, p. 193–199, 2012.
- 14 JOHNSTONE, R. W.; RUEFLI, A. A.; LOWE, S. W. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. **Cell**, Cambridge, v. 108, p. 153–164, 2002.
- 15 ASHKENAZI, A.; FAIRBROTHER, W. J.; LEVERSON, J. D.; SOUERS, A. J. From basic apoptosis discoveries to advanced selective BCL-2 family inhibitors. **Nature Reviews Drug Discovery**, London, v. 16, p. 273–284, 2017.
- 16 CHIPUK, J. E.; BOUCHIER-HAYES, L.; GREEN, D. R. Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario. **Cell Death & Differentiation**, London, v. 13, p. 1396–1402, 2006.
- 17 RYAN, J.; LETAI, A. BH3 profiling in whole cells by fluorimeter or FACS. **Methods**, Maryland Heights, v. 61, p. 156–164, 2013.
- 18 VO, T. T.; RYAN, J.; CARRASCO, R.; NEUBERG, D.; ROSSI, D. J.; STONE, R. M.; DEANGELO, D. J.; FRATTINI, M. G.; LETAI, A. Relative mitochondrial priming of myeloblasts and normal hscs determines chemotherapeutic success in AML. **Cell**, Cambridge, v. 151, p. 344–355, 2012.
- 19 CHONGHAILE, T. N.; SAROSIEK, K. A. Pretreatment mitochondrial priming correlates

with clinical response to cytotoxic chemotherapy. **Science**, Washington, v. 1129, p. 1129–1133, 2011.

20 SHAMAS-DIN, A.; KALE, J.; LEBER, B.; ANDREWS, D. W. Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, Woodbury, v. 5, a008714, 2013.

21 POTTER, D. S.; LETAI, A. To prime, or not to prime: that is the question. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, Woodbury, v. 81, p. 131–140, 2016.

22 RYAN, J.; MONTERO, J.; ROCCO, J.; LETAI, A. iBH3: simple, fixable BH3 profiling to determine apoptotic priming in primary tissue by flow cytometry. **Biological Chemistry**, Berlin, v. 397, p. 671–678, 2016.

23 BHOLA, P. D.; MAR, B. G.; LINDSLEY, R. C.; RYAN, J. A.; HOGDAL, L. J.; VO, T. T.; DEANGELO, D. J.; GALINSKY, I.; EBERT, B. L.; LETAI, A. Functionally identifiable apoptosis-insensitive subpopulations determine chemoresistance in acute myeloid leukemia. **Journal of Clinical Investigation**, Ann Arbor, v. 126, p. 3827–3836, 2016.

24 COLAK, S.; ZIMBERLIN, C. D.; FESSLER, E.; HOGDAL, L.; PRASETYANTI, P. R.; GRANDELA, C. M.; LETAI, A.; MEDEMA, J. P. Decreased mitochondrial priming determines chemoresistance of colon cancer stem cells. **Cell Death & Differentiation**, London, v. 21, p. 1170–1177, 2014.

25 MONTERO, J.; SAROSIEK, K. A.; DEANGELO, J. D.; MAERTENS, O.; RYAN, J.; ERCAN, D.; PIAO, H.; HOROWITZ, N. S.; BERKOWITZ, R. S.; MATULONIS, U.; JÄNNE, P. A.; AMREIN, P. C.; CICHOWSKI, K.; DRAPKIN, R.; LETAI, A. Drug-induced death signaling strategy rapidly predicts cancer response to chemotherapy. **Cell**, Cambridge, v. 160, p. 977–989, 2015.

26 THORN, C. F.; OSHIRO, C.; MARSH, S.; HERNANDEZ-BOUSSARD, T.; MCLEOD, H.; KLEIN, T. E.; ALTMAN, R. B. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenet.* **Genomics**, Waltham, v. 21, p. 440–446, 2011.

27 WEAVER, B. A. How Taxol/Paclitaxel kills cancer cells. **Molecular Biology of the Cell**, Bethesda, v. 25, p. 2677–2681, 2014.

28 TSE, C.; SHOEMAKER, A. R.; ADICKES, J.; ANDERSON, M. G.; CHEN, J.; JIN, S.; JOHNSON, E. F.; MARSH, K. C.; MITTEN, M. J.; NIMMER, P.; ROBERTS, L.; TAHIR, S. K.; XIAO, Y.; YANG, X.; ZHANG, H.; FESIK, S.; ROSENBERG, S. H.; ELMORE, S. W. ABT-263: a potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor. **Cancer Research**, Philadelphia, v. 68, p. 3421–3428, 2008.

29 SOUERS, A. J.; LEVERSON, J. D.; BOGHAERT, E. R.; ACKLER, S. L.; CATRON, N. D.; CHEN, J.; DAYTON, B. D.; DING, H.; ENSCHEDE, S. H.; FAIRBROTHER, W. J.; HUANG, D. C.; HYMOWITZ, S. G.; JIN, S.; KHAW, S. L.; KOVAR, P. J.; LAM, L. T.; LEE, J.; MAECKER, H. L.; MARSH, K. C.; MASON, K. D.; MITTEN, M. J.; NIMMER, P. M.; OLEKSIJEV, A.; PARK, C. H.; PARK, C. M.; PHILLIPS, D. C.; ROBERTS, A. W.; SAMPATH, D.; SEYMOUR, J. F.; SMITH, M. L.; SULLIVAN, G. M.; TAHIR, S. K.; TSE, C.; WENDT, M. D.; XIAO, Y.; XUE, J. C.; ZHANG, H.; HUMERICKHOUSE, R. A.;

ROSENBERG, S. H.; ELMORE, S. W. ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. **Nature Medicine**, New York, v. 19, p. 202–208, 2013.

30 KOTSCHY, A.; SZLAVIK, Z.; MURRAY, J.; DAVIDSON, J.; MARAGNO, A. L.; LE TOUMELIN-BRAIZAT, G.; CHANRION, M.; KELLY, G. L.; GONG, J. N.; MOUJALLED, D. M.; BRUNO, A.; CSEKEI, M.; PACZAL, A.; SZABO, Z. B.; SIPOS, S.; RADICS, G.; PROSZENYAK, A.; BALINT, B.; ONDI, L.; BLASKO, G.; ROBERTSON, A.; SURGENOR, A.; DOKURNO, P.; CHEN, I.; MATASSOVA, N.; SMITH, J.; PEDDER, C.; GRAHAM, C.; STUDENY, A.; LYSIAK-AUVITY, G.; GIRARD, A. M.; GRAVÉ, F.; SEGAL, D.; RIFFKIN, C. D.; POMILIO, G.; GALBRAITH, L. C.; AUBREY, B. J.; BRENNAN, M. S.; HEROLD, M. J.; CHANG, C.; GUASCONI, G.; CAUQUIL, N.; MELCHIORE, F.; GUIGAL-STEPHAN, N.; LOCKHART, B.; COLLAND, F.; HICKMAN, J. A.; ROBERTS, A. W.; HUANG, D. C.; WEI, A. H.; STRASSER, A.; LESSENE, G.; GENESTE, O. The MCL1 inhibitor S63845 is tolerable and effective in diverse cancer models. **Nature**, London, v. 538, p. 477–482, 2016.

31 LETAI, A.; BHOLA, P. D.; RYAN, J. A. **High throughput BH3 profiling: a rapid and scalable technology to BH3 profile on low numbers of cells**. Depositante: Dana Farber Cancer Institute. US20180120297A1. Depósito: 27 abr. 2015. Concessão: 12 jul. 2018.

32 HAFNER, M.; NIEPEL, M.; CHUNG, M.; SORGER, P. K. Growth rate inhibition metrics correct for confounders in measuring sensitivity to cancer drugs. **Nature Methods**, London, v. 13, p. 521–527, 2016.

33 HAFNER, M.; NIEPEL, M.; SORGER, P. K. Alternative drug sensitivity metrics improve preclinical cancer pharmacogenomics. **Nature Biotechnology**, New York, v. 35, p. 500–502, 2017.

34 NIEPEL, M.; HAFNER, M.; CHUNG, M.; SORGER, P. K. Measuring cancer drug sensitivity and resistance in cultured cells. **Current Protocols in Chemical Biology**, Hoboken, v. 9, p. 55–74, 2017.

35 WANG, C.; HU, Q.; SHEN, H.-M. Pharmacological inhibitors of autophagy as novel cancer therapeutic agents. **Pharmacological Research**, London, v. 105, p. 164–175, 2016.

36 KIRSHNER, J. R.; HE, S.; BALASUBRAMANYAM, V.; KEPROS, J.; YANG, C. Y.; ZHANG, M.; DU, Z.; BARSOUM, J.; BERTIN, J. Elesclomol induces cancer cell apoptosis through oxidative stress. **Molecular Cancer Therapeutics**, Philadelphia, v. 7, n. 8, p. 2319–27, 2008.

37 O'NEILL, P. M.; BARTON, V. E.; WARD, S. A. The molecular mechanism of action of artemisinin—the debate continues. **Molecules**, Basel, v. 15, p. 1705–1721, 2010.

38 KRIGE, D.; NEEDHAM, L. A.; BAWDEN, L. J.; FLORES, N.; FARMER, H.; MILES, L. E.; STONE, E.; CALLAGHAN, J.; CHANDLER, S.; CLARK, V. L.; KIRWIN-JONES, P.; LEGRIS, V.; OWEN, J.; PATEL, T.; WOOD, S.; BOX, G.; LABER, D.; ODEDRA, R.; WRIGHT, A.; WOOD, L. M.; ECCLES, S. A.; BONE, E. A.; AYSCOUGH, A.; DRUMMOND, A. H. CHR-2797: An antiproliferative aminopeptidase inhibitor that leads to

amino acid deprivation in human leukemic cells. **Cancer Research**, Philadelphia, v. 68, p. 6669–6679, 2008.

39 CLARK, N. A.; HAFNER, M.; KOURIL, M.; WILLIAMS, E. H.; MUHLICH, J. L.; PILARCZYK, M.; NIEPEL, M.; SORGER, P. K.; MEDVEDOVIC, M. GRcalculator: an online tool for calculating and mining dose–response data. **BMC Cancer**, London, v. 17, p. 698, 2017.

40 VILLAS-BÔAS, S. G.; RASMUSSEN, S.; LANE, G. A. Metabolomics or metabolite profiles? **Trends in Biotechnology**, Oxford, v. 23, p. 385–386, 2005.

41 VILLAS-BÔAS, S. G.; GOMBERT, A. K. Análise do metaboloma. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Uberlândia, v. 36, p. 59–69, 2006.

42 FIEHN, O. Metabolomics—the link between genotypes and phenotypes. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 48, p. 155–71, 2002.

43 NORDSTRÖM, A.; O'MAILLE, G.; QIN, C.; SIUZDA, G. Nonlinear data alignment for UPLC–MS and HPLC–MS based metabolomics: quantitative analysis of endogenous and exogenous metabolites in human serum. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 78, p. 3289–3295, 2006.

44 WISHART, D. S. Current progress in computational metabolomics. **Briefings in Bioinformatics**, Oxford, v. 8, p. 279–293, 2007.

45 KIM, H. K.; VERPOORTE, R. Sample preparation for plant metabolomics. **Phytochemical Analysis**, Oxford, v. 21, p. 4–13, 2010.

46 DUPORTET, X.; AGGIO, R. B. M.; CARNEIRO, S.; VILLAS-BÔAS, S. G. The biological interpretation of metabolomic data can be misled by the extraction method used. **Metabolomics**, New York, v. 8, p. 410–421, 2012.

47 DUNN, W. B.; ELLIS, D. I. Metabolomics: current analytical platforms and methodologies. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 24, p. 285–294, 2005.

48 VUCKOVIC, D.; RISTICEVIC, S. In vivo solid phase microextraction in metabolomics: opportunities for the direct investigation of biological systems. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 50, n.25, p. 5618–5628, 2011.

49 PROSEN, H.; ZUPANČIČ-KRALJ, L. Solid-phase microextraction. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 18, p. 272–282, 1999.

50 PAWLISZYN J. Solid phase microextraction. *In*: ROUSEFF, R. L.; CADWALLADER, K. R. (ed.). **Headspace analysis of foods and flavors**. Boston: Springer, 2001. p. 73–87.

51 BOJKO, B.; GORYNSKI, K.; GOMEZ-RIOS, G.; KNAAK, J. Solid phase microextraction fills the gap in tissue sampling protocols. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 803, p. 75–81, 2013.

- 52 RISTICEVIC, S.; SOUZA-SILVA, E.; DEELL, J. Capturing plant metabolome with direct-immersion in vivo solid phase microextraction of plant tissues. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 88, p. 1266–1274, 2016.
- 53 VUCKOVIC, D.; PAWLISZYN, J. Systematic evaluation of solid- phase microextraction coatings for untargeted metabolomic profiling of biological fluids by liquid chromatography-mass. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 83, p. 1944–1954, 2011.
- 54 SIGMA-ALDRICH. **Bioanalysis with SPME**. Darmstadt, 2019. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/reporter-us/bioanalysis-with-spme.html>. Acesso em: 5 mar. 2019.
- 55 OUYANG, G.; VUCKOVIC, D.; PAWLISZYN, J. Nondestructive sampling of living systems using in vivo solid-phase microextraction. **Chemical Reviews**, Washington, v. 111, p. 2784–2814, 2011.
- 56 BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Porto Alegre: Bookman Editora, 2010.
- 57 BRERETON, R. G. **Chemometrics: data analysis for the laboratory and chemical plant**. Hoboken: John Wiley & Sons, 2003.
- 58 WILKINSON, L. Revising the Pareto Chart. **The American Statistician**, Alexandria, v. 60, n. 4, p. 332-334, 2006.
- 59 MINITAB Inc. **O que é um valor p?** State College, 2018. Disponível em: <https://support.minitab.com/pt-br/minitab/18/help-and-how-to/statistics/basic-statistics/supporting-topics/basics/example-of-getting-and-interpreting-a-p-value/>. Acesso em: 23 fev. 2018.
- 60 TEÓFILO, R.; FERREIRA, M. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 338-350, 2006.
- 61 FURTADO, D. Z. S.; LEITE, F. B. V. M.; BARRETO, C. N.; FARIA, B.; LIMA, L. D.; SILVA, E. J.; SILVA, H. D. T.; BECHARA, E. J. H.; ASSUNÇÃO, N. A. Profiles of amino acids and biogenic amines in the plasma of Cri-du-Chat patients. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 140, p. 137-145, 2017.
- 62 KIM, M. K.; KIM, D. J. Effects of oral stimulation intervention in newborn babies with Cri du Chat Syndrome: single-subject research design. **Occupational Therapy International**, Oxford, v. 2018, 2018.
- 63 BECHARA, E.; FURTADO, D.; LEITE, F.; BARRETO, C.; SILVA, E.; SILVA, H.; ASSUNÇÃO, N. Metabolomic-based amino acid and biogenic amine plasmatic profile of Brazilian Cri-du-Chat patients. **Free Radical Biology and Medicine**, Philadelphia, v. 100, p. S181, 2016.
- 64 BOJKO, B.; GORYNSKI, K.; GOMEZ-RIOS, G. A.; KNAAK, J. M.; MACHUCA, T.; CUDJOE, E.; SPETZLER, V.N.; HSIN, M.; CYPEL, M.; SELZNER, M.; LIU, M.;

KESHJAVEE, S.; PAWLISZYN, J. Low invasive in vivo tissue sampling for monitoring biomarkers and drugs during surgery. **Laboratory Investigation**, London, v. 94, n. 5, p. 586-594, 2014.

ANEXOS

ANEXO I – script do software para alinhamento dos dados

Z:\Projetos\SampleDataCleaning\SampleDataCleaning\frmInicio.cs

1

```
1 using System;
2 using System.Collections.Generic;
3 using System.ComponentModel;
4 using System.Data;
5 using System.Drawing;
6 using System.IO;
7 using System.Linq;
8 using System.Text;
9 using System.Threading.Tasks;
10 using System.Windows.Forms;
11 using ClosedXML.Excel;
12
13 namespace SampleDataCleaning
14 {
15     public partial class frmInicio : Form
16     {
17         public frmInicio()
18         {
19             InitializeComponent();
20         }
21
22         //Evento de disparo da seleção do arquivo de excel
23         private void button1_Click(object sender, EventArgs e)
24         {
25             OpenFileDialog openFileDialog = new OpenFileDialog();
26
27             if (openFileDialog.ShowDialog() == DialogResult.OK)
28             {
29                 textBox1.Text = openFileDialog.FileName;
30             }
31         }
32
33         //Evento de disparo do processamento
34         private void button2_Click(object sender, EventArgs e)
35         {
36
37             //Declaração de variáveis
38             float fltMass;
39             string mass, intensity;
40
41             var wb = new XLWorkbook(textBox1.Text.Trim());
42             int casasDecimais = int.Parse(textBox2.Text.Trim());
43             int nroPastas = int.Parse(textBox3.Text.Trim());
44             List<Experimento> experimentos = new List<Experimento>();
45             List<Experimento> auxiliar = new List<Experimento>();
46
47             //Laço para leitura da planilha selecionada. Este lado repetirá de
48             //acordo com o número de pastas informado no início do programa
49             //informação -
50             //temporariamente necessária)
51
52             //Cada pasta da planilha representa um experimento, e cada
53             //experimento possui um número específico de registros.
54
55             //As classes do sistema são baseadas nessa lógica. Logo, a classe
56             //experimento possui uma lista de registros, e os registros
57             //possuem
```

```

52      //um atributo de massa e outro atributo de intensidade
53      for (int i = 1; i <= nroPastas; i++)
54      {
55
56          var planilha = wb.Worksheet(i);
57
58          int linha = 2;
59          List<Registro> registros = new List<Registro>();
60
61          while (true)
62          {
63              mass = planilha.Cell("A" + linha.ToString
64              ()).Value.ToString();
65              intensity = planilha.Cell("B" + linha.ToString
66              ()).Value.ToString();
67
68              if (String.IsNullOrEmpty(mass.ToString()))
69              {
70                  break;
71              }
72
73              fltMass = (float)Math.Round(Decimal.Parse(mass),
74              casasDecimais, MidpointRounding.AwayFromZero);
75
76              Registro registro = new Registro();
77              registro.Mass = fltMass;
78              registro.Intensity = float.Parse(intensity);
79              registros.Add(registro);
80
81              linha++;
82          }
83
84          Experimento experimento = new Experimento();
85          experimento.Dados = registros;
86          experimentos.Add(experimento);
87          auxiliar.Add(experimento);
88      }
89
90      //Após realizar-se a leitura, inicia-se o processamento dos dados
91
92      //Serão processados todos os registros de todos os experimentos
93      int atual = 0;
94      foreach (var experimento in experimentos)
95      {
96          //Variável auxiliar para contar em qual experimento o laço se
97          //encontra atualmente (não sendo necessário verificá-lo quando
98          //estiver percorrendo o mesmo)
99          atual++;
100          //Laço para percorrer todos os registros dos experimentos
101          foreach (var registros in experimento.Dados)
102          {
103              float massAtu = registros.Mass;
104              //Chamada da rotina que fará a verificação do registro
105              atual
106              checaValores(massAtu, null, auxiliar, atual);
107          }
108      }

```



```
102     }
103
104     //debug(auxiliar);
105
106     //Gravação dos dados em uma nova planilha
107     var wb2 = new XLWorkbook();
108     foreach (var experimento in experimentos)
109     {
110         writeExcel(wb2, experimento.Dados, "Resultado");
111     }
112
113 }
114
115 //Método para verificação dos registros
116 //Este método percorre todos os outros experimentos, que não a atual, ➤
117 //atraves de uma lista auxiliar armazenada para este fim.
118 //Será buscado o registro específico no experimento em questão. Caso ➤
119 //não seja encontrado, o mesmo será adicionado com o valor
120 //de intensidade zerado.
121 public void checaValores(float mass, List<float> aux, ➤
122     List<Experimento> experimentos, int nroExp)
123 {
124     int expAtu = 0;
125     foreach (var experimento in experimentos)
126     {
127         expAtu++;
128         bool achou = false;
129
130         if (nroExp != expAtu)
131         {
132             foreach (var dado in experimento.Dados)
133             {
134                 if (mass == dado.Mass)
135                 {
136                     achou = true;
137                     break;
138                 }
139             }
140
141             if (!achou)
142             {
143                 Registro novo = new Registro();
144                 novo.Mass = mass;
145                 novo.Intensity = 0;
146                 experimento.Dados.Add(novo);
147             }
148         }
149     }
150 }
151
152 public void debug(List<Experimento> experimentos)
153 {
154     foreach (var experimento in experimentos)
155     {
156         Console.WriteLine("\n");
157         foreach (var dado in experimento.Dados)
```

```
155         {
156             Console.WriteLine(dado.Mass.ToString() + ' ' +
                               dado.Intensity.ToString());
157         }
158     }
159     Console.WriteLine("\n");
160 }
161
162 //Método de gravação dos dados em uma planilha nova. Esta planilha
    será salva numa pasta denominada "resultado", criada no local de
    execução da aplicação.
163 public void writeExcel(XLWorkbook wb, List<Registro> dados, string
    sheetName)
164 {
165     Random rnd = new Random();
166     var teste = sheetName + rnd.Next(100).ToString();
167     var ws = wb.Worksheets.Add(teste);
168
169     ws.Cell(1, 1).Value = sheetName;
170
171     if (dados != null && dados.Any())
172     {
173         ws.Cell(2, 1).InsertData(dados);
174     }
175     else
176     {
177         ws.Cell(2, 1).Value = "Não há dados";
178     }
179
180     ws.Columns().AdjustToContents();
181     var filePath = Path.GetDirectoryName(Application.ExecutablePath) +
        "/resultado/" + string.Format("{0}.xlsx", "resultado");
182     wb.SaveAs(filePath);
183
184 }
185 }
186 }
187
```

ANEXO II

Protocolo de BH3 *profiling*

METHOD 2: iBH3 PROFILING

Unlike JC-1 plate based BH3 profiles, the iBH3, or intracellular BH3, method relies on the measurement of retained cytochrome c rather than potential. Because it is a flow cytometry assay, cell surface marking as well as some intracellular stains are compatible with this method making it suitable for co-cultures and mixtures of cells found in primary tissues samples. Because it terminates in fixation, it can be used with infectious samples including those bearing pathogens such as HIV.

iBH3 Common Materials

MEB Buffer

4% Formaldehyde in PBS

Treatment Stocks peptide or compounds at 100X final concentration (typically in DMSO)

5% Digitonin 50 mg/mL digitonin in DMSO

'N2' Buffer [1.7M Tris, 1.25M Glycine pH 9.1]

10X CytoC Stain Buffer (10% BSA, 2% Tween20, PBS, filtered)

Anti-Cytochrome C antibody Clone 6H2.B4 labeled with a fluorescent tag

Cell Surface Staining Materials (optional)

2% FBS in HBSS (Or your preferred cell surface staining buffer)

Live/Dead stains

Cell surface markers (i.e. CD3, EpCAM, etc...)

Order of Events

1. Cell surface staining / Viability marking
2. Peptide Exposure
3. Fixation
4. Fixative Neutralization
5. Intracellular staining
6. FACS analysis

Notes regarding scale and concentration limits

The procedures listed here have been tested in tube, 96 well, and 384 well formats. With overnight staining for cytochrome c and a dilution of 1:400, the assay can tolerate cell densities from 0.5-4 million cells per mL. Exceeding the upper limit will cause a reduction in the dynamic range as measured by the median fluorescence intensity of the cytochrome c staining of positive and negative controls.

Controls

A matched isotype control for the cytochrome c antibody can be used as a negative control in an iBH3 profile. The MOPC clone has been tested by the Letai lab but does occasionally stain brighter than some treatments resulting in cytochrome c release values greater than 100%. This can be remedied by using a fluorescence minus one (FMO) control in which the cytochrome c antibody is omitted without the addition of an isotype.

Alternatively, 15-25 μ M Alamethicin can serve as a positive control for cytochrome C release. Alamethicin can be handled in the same manner as the peptides. Alamethicin will produce a staining pattern more similar to full release due to peptides like BIM, and it is highly recommended as the only means to discriminate failure to release cytochrome c and operator error in situations where BAX and BAK are absent or non-functional.

1% DMSO or the inert PUMA2A peptide at the highest used peptide concentration are typically used as controls for complete cytochrome c retention. MEB alone can also be used.

Fixation

Typically completed by adding formaldehyde to a final concentration of 1-2% for 10 minutes. Formaldehyde is typically added as a 4% or 8% solution in PBS. Fixation as long as 30 minutes before N2 addition has not had significant negative impacts on performance.

Viability and Cell Surface Staining

1. **Viability stains** (ZombieAqua (BioLegend), Live/Dead (Life Technologies), ect.. are reactive dyes that are retained after fixation. These should be used before antibody staining to avoid chemically altering the antibodies. Follow manufacturer instructions, but in general this is completed by:
 - a. Suspending the cells in an amine-free buffer (PBS or HBSS) without serum or BSA.
 - b. Reactive dye is added on ice or at room temperature for 15-30 minutes
 - c. The cells are spun down and can be washed or suspended in buffer with BSA or FBS which will quench the reaction
2. **Antibody staining** is typically done on ice in 1%BSA or 2% FBS in HBSS with or without 1 mM EDTA for 30 minutes protected from light. Antibody titer should be determined before profiling. Standard compensation controls are those typically used as in standard FACS experiments
 - a. Suspends cells in 1%BSA or 2%FBS in HBSS with additional blocking agents if needed (i.e. FcR Block)
 - b. Add antibodies and stain for 30 min on ice
 - i. This step is antibody specific. Antibodies must be titrated for optimal performance.
 - c. Spin down cells and wash once with HBSS
3. Proceed to the iBH3 variant that suits the sample size and desired throughput

Tube-Based procedure

1. Add 100 μ L of 0.002% (w/v) digitonin in MEB with treatments diluted to 2X their final concentration in each FACS tube
2. Suspend cells in MEB buffer (with or without prior staining), 100 μ L for each tube. Making an extra sample worth of cell suspension will reduce the chance of running out of cells while dispensing them due to pipette error or dead volumes. Suspend cells at 2X final desired density.
3. Add 100 μ L of cells in MEB to each tube and flick or gently vortex to mix

4. Wait 30-90 minutes at 25°C +/- 3 °C
 - a. Increased temperature will accelerate cytochrome c release. Near 30°C or above, spontaneous release may occur.
 - b. 30 minutes works well for highly sensitive or fragile cells.
 - c. 90 minutes is best for studying slow responding or highly unprimed cells
 - d. Most samples will fall into the 45-60 minute window.
5. Add 67 uL of **4% Formaldehyde** in PBS to each tube to fix the cells and terminate the peptide exposure
6. Wait 10 minutes at room temperature
7. Add 67 uL of **N2 buffer** to each tube to neutralize the formaldehyde and terminate fixation
8. Wait at least 5 minutes
9. Prepare 40 uL per tube of **10X CytoC Stain Buffer** with a 1:40 dilution (BD Biosciences antibody) or 1:400 (Biolegend antibody) of the anti-Cytochrome c antibody
10. Add either 40 uL of a 1:40 dilution of an isotype control in 10X CytoC Stain Buffer to the negative control tube to make an isotype control OR add 40 uL of the stain buffer with no antibodies added to serve as an FMO control
11. Add 40 uL of the diluted anti-cytochrome c antibody to the remaining tubes
12. Mix gently and let stain at least 1-2 hours at room temp. Overnight staining at 4°C is highly recommended.
13. Proceed to FACS Analysis

Multiwell / High-Throughput Procedures

96 Well Procedure

1. Add 50 uL of 2X treatment in 0.002% digitonin in MEB to each well
2. Add 50 uL of cells (stained or not) at 2X final concentration in MEB to each well
3. Wait 30-90 minutes at 25°C +/- 3 °C
 - a. Increased temperature will accelerate cytochrome c release. Near 30°C or above, spontaneous release may occur.
 - b. 30 minutes works well for highly sensitive or fragile cells.
 - c. 90 minutes is best for studying slow responding or highly unprimed cells
 - d. Most samples will fall into the 45-60 minute window.
4. Add 33 uL of **4% Formaldehyde** in PBS to each tube to fix the cells and terminate the peptide exposure

5. Wait 10 min at room temperature
6. Add 33 μ L of **N2 buffer** to each tube to neutralize the formaldehyde and terminate fixation
7. Wait at least 5 minutes
8. Prepare 20 μ L per tube of **10X CytoC Stain Buffer** with a 1:40 dilution (BD Biosciences antibody) or 1:400 (Biolegend antibody) of the anti-Cytochrome c antibody
9. Add either 20 μ L of a 1:40 dilution of an isotype control in 10X CytoC Stain Buffer to the negative control wells to make an isotype control OR add 40 μ L of the stain buffer with no antibodies added to serve as an FMO control
10. Add 20 μ L of the diluted anti-cytochrome c antibody to the remaining wells.
11. Cover and let stain at least 1-2 hours at room temp. Overnight staining at 4°C is highly recommended.
 - a. The use of an adhesive sealing film is recommended to prevent evaporation or spills / contamination during cytochrome c antibody incubation but is not necessary to the procedure
12. Proceed to FACS Analysis

384 Well Procedure

Special Note: Because the wells of a 384 plate are tall and narrow, density gradients can form particularly when N2 or intracellular stain buffer is applied. After the plate is sealed, it must be mixed to ensure even mixing of all components.

1. Add 15 μ L of 2X treatment in 0.002% digitonin in MEB to each well
2. Add 15 μ L of cells (stained or not) at 2X final concentration in MEB to each well
3. Wait 30-90 minutes at 25°C +/- 3 °C
 - a. Increased temperature will accelerate cytochrome c release. Near 30°C or above, spontaneous release may occur.
 - b. 30 minutes works well for highly sensitive or fragile cells.
 - c. 90 minutes is best for studying slow responding or highly unprimed cells
 - d. Most samples will fall into the 45-60 minute window.
4. Add 10 μ L of **4% Formaldehyde** in PBS to each tube to fix the cells and terminate the peptide exposure
5. Wait 10 min at room temperature
6. Add 10 μ L of **N2 buffer** to each tube to neutralize the formaldehyde and terminate fixation
7. Wait at least 5 minutes

8. Prepare 10 uL per tube of **10X CytoC Stain Buffer** with a 1:40 dilution (BD Biosciences antibody) or 1:400 (Biolegend antibody) of the anti-Cytochrome c antibody
9. Add either 10 uL of a 1:40 dilution of an isotype control in 10X CytoC Stain Buffer to the negative control wells to make an isotype control OR add 40 uL of the stain buffer with no antibodies added to serve as an FMO control
10. Add 10 uL of the diluted anti-cytochrome c antibody to the remaining wells.
11. Cover and let stain at least 1-2 hours at room temp. Overnight staining at 4°C is highly recommended.
 - a. The use of an adhesive sealing film is recommended to prevent evaporation or spills / contamination during cytochrome c antibody incubation but is not necessary to the procedure
 - b. Mixing in small wells can be incomplete. After the sealing film is firmly in place, shake the plate vigorously for 5-10 seconds to ensure complete mixing in the wells.
12. Proceed to FACS Analysis

FACS Analysis for iBH3

There are two main ways to quantify cytochrome c release in the iBH3 assay: normalized median fluorescence intensity (MFI) or by setting gates. Normalization of the MFI values has the same requirements as the calculations used in normalizing plate-based data in that a positive and negative control value are required. DMSO or PUMA2A controls can serve as a maximum MFI control while a fluorescence minus one (FMO) in which the cytochrome c antibody is omitted can be used as the lower bound. Nothing will ever reach the FMO MFI and so no value higher than 100% can occur. However, alamethicin at 25 µM can also be used, and it will look more like a high-dose BIM treatment.

Pos Ctrl = Positive release controls. FMO or alamethicin

Neg Ctrl = Negative release controls. DMSO or PUMA2A

$$\% \text{ Cytochrome c loss} = 1 - \frac{MFI_{\text{Sample}} - MFI_{\text{Pos Ctrl}}}{MFI_{\text{Neg Ctrl}} - MFI_{\text{Pos Ctrl}}}$$

It is important to note that slight changes in curve shape can shift the MFI. For instance, it has been observed that PUMA2A controls generally have a narrower curve than DMSO. While the reason for this is not currently understood, the effect is that a PUMA2A control will often have a slightly higher MFI value in the cytochrome c channel and thus serves as a better control for zero release.

An alternative to using the MFI is to draw a gate in the cytochrome c channel. While it is possible to do this in one dimension using a simple histogram, histograms can sometimes be deceptive because they cannot account for the size of the cell and the resulting change in background staining and mitochondrial content that a two dimensional gate can provide. Staining with control antibodies such as isotypes or MnSOD revealed a strong correlation with side scatter (SSC) and staining. This is a common occurrence in many staining situations, and thus SSC can serve as a suitable second dimension for cytochrome c release.

Two gates can be made that generally complement each other. These are cytochrome c positive or cytochrome c negative gates, and these gates can be defined from the PUMA2A or alamethicin controls respectively. In either case, a gate is created from a SSC vs Cytochrome c plot. This can be done from a dot plot, but a density plot is often helpful in isolating the real shape of the populations. Cells will generally show a strong positive correlation between SSC and cytochrome c staining, and this a diagonal gate will be made along the boundary of the control population. In each case, cell health and gating leading into this plot may result in some outliers. In general, if 95% of the control population fits in the respective gate, the gate can be considered suitable.

In the event that many cells in the PUMA2A control are falling into the region of alamethicin, it may be necessary to use a viability marker to remove dead or dying cells from the gating. As a general rule, however, cells should be as healthy as possible to ensure an accurate measure of priming. This is not always possible with primary samples, and so viability staining with agents like DAPI or fixable dyes like Biogend's Zombie series can help remove most of these cells. If the input may have more than 30-40% dead cells, a dead cell removal column system such as the one offered by Miltenyi is a good option. This make a highly necrotic sample that would ruin surface staining become a much more manageable sample. I have used this kit to clean up samples from xenografts in the past, and this negative selection kit made it possible to accurately stain surface markers as well as get a clean BH3 profile from an otherwise unusable sample.

Figure 5: Using gates to quantify cytochrome c release. From upper left moving right across the rows are plots of SSC on the Y-axis vs cytochrome c on the X-axis. The PUMA2A control on the upper left shows how to cut the diagonal gate to select cytochrome c positive cells. Note that increasing BIM concentration causes more cytochrome c release with each dose escalation. Finally, note how far to the left FMO appears relative to BIM 100. This is normal. If alamethicin is used as a control, it will appear more like BIM 100.

It is very important to remember that an IBH3 profile measures the amount cytochrome c retained in the mitochondria. The pores made by digitonin in the plasma membrane are so large that any cytochrome c released from the mitochondria into the cytoplasmic space will immediately leave the cell completely.

Materials utilizados e preparo das soluções para BH3 profiling

Multi-well plates for plate readers and HTS loaders

The following plates have been tested as suitable in iBH3 and JC-1 assays

Plate	Catalog Number		Application
Corning Flat bottom 96 clear NBS	3641	Corning	iBH3
Corning Black 384 NBS	3575	Corning	iBH3
Corning Black Low Vol 384 NBS	4514	Corning	iBH3*
Greiner 384 well Black (Fluotrac 200)	781076	Greiner	JC-1
Corning 384 well Black	3573	Corning	JC-1
Nunc 384 well Black	12-568-54	Fisher	JC-1
Eppendorf V bottom 384 well	951040481	Eppendorf	JC-1

*Low volume U-bottom plates can only be used on cytometers with a plate loader calibrated to use them. Do not use on a standard BD HTS unit. This plate has been tested to work with the Intellicyt iQue Screener Plus to provide excellent yield with that system

NOTE REGARDING PLATE SURFACES AND COMPOSITION

The NBS coatings are used for iBH3 because they yield 2-3 times as many cells during FACS over standard polystyrene or polypropylene. Polystyrene and polypropylene generally lead to cell loss to the plate walls due to hydrophobic interaction. Non-binding surfaces (NBS) are recommended for iBH3 unless the samples are not limiting. Uncoated plates are then suitable.

NBS plates should not be used in JC-1 assays. Interference with the fluorescence has been noted, but the exact cause is not yet known. Standard polystyrene plates are recommended for JC-1 plate reader applications.

Mitochondrial Buffers

Below are the current BH3 profiling buffers. MEB is relatively gentle and works best for JC-1 assays which use long exposure times and kinetic measurements. MEB2 is best for iBH3 as it provides better cell recovery, less clumping, and a faster response to peptides for the shearer 45-60 minute incubations used in typical iBH3 assays.

MEB2-P25 includes the addition of polaxamer 188 (Also known as Pluronic F68) which can help reduce doublets and increase the yield of cells from multiwall plates, particularly for suspension lines.

MEB For JC-1 Assays	MW	[Stock] M	Final Conc	Final Vol (L)	Mass (g)
150 mM Mannitol	182		0.15	0.5	13.65
10 mM HEPES-KOH pH 7.5	238.3		0.01	0.5	1.19
50 mM KCl	74.55		0.05	0.5	1.86
0.02 mM EGTA	380.35	0.5	2×10^{-5}	0.5	20.0 μ L
0.02 mM EDTA	292.24	0.5	2×10^{-5}	0.5	20.0 μ L
0.1 % BSA	66463	100%	0.1	0.5	0.500
5 mM Succinate	118.09		0.005	0.5	0.295
MEB2 for iBH3	MW	[Stock] M	Final Conc	Final Vol (L)	Mass (g)
150 mM Mannitol	182		0.15	0.5	13.65
10 mM HEPES-KOH pH 7.5	238.3		0.01	0.5	1.19
150 mM KCl	74.55		0.15	0.5	5.59
1 mM EGTA	380.35	0.5	1×10^{-3}	0.5	1 mL
1 mM EDTA	292.24	0.5	1×10^{-3}	0.5	1 mL
0.1 % BSA	66463	100%	0.1	0.5	0.500
5 mM Succinate	118.09		0.005	0.5	0.295
MEB2-P25 for iBH3	MW	[Stock] M	Final Conc	Final Vol (L)	Mass (g)
150 mM Mannitol	182		0.15	0.5	13.65
10 mM HEPES-KOH pH 7.5	238.3		0.01	0.5	1.19
150 mM KCl	74.55		0.15	0.5	5.59
1 mM EGTA	380.35	0.5	1×10^{-3}	0.5	1 mL
1 mM EDTA	292.24	0.5	1×10^{-3}	0.5	1 mL
0.1 % BSA	66463	100%	0.1	0.5	0.500
5 mM Succinate	118.09		0.005	0.5	0.295
Polaxamer 188	Avg 8400		2.5 g/L	0.5	1.25

MEB Assembly:

Add solids to beaker: Mannitol, HEPES, Succinic acid, BSA, KCl and allow to dissolve

Add EDTA and EGTA to solution

Adjust pH to 7.5 +/- 0.1 with KOH

Add water to final volume

Filter through 0.22 micron filter and store at 4°C. MEB and DTEB are stable for 6 months if kept clean and stored at 4°C.

O tampão empregado nesta tese foi o tampão “MEB2 for iBH3”.

Neutralizing Buffer 'N2'

1.7 M Tris base, 1.25 M Glycine, pH 9.1

Per 100 mL:

20.59 g TRIS base (M.W. 121.11)

9.38 g Glycine (M.W. 75.07)

Add water to 90 mL, dissolve and adjust pH to 9.1

Dilute to 100 mL and sterile filter to remove trace particulates. Store at RT

NOTE ON POSITIVE CONTROLS

Alamethicin is a peptide antibiotic that can permeabilize mitochondria independent of BAX and BAK. This serves as a positive control for cytochrome C release in iBH3 and can provide a better baseline depolarization in JC-1 applications because it is irreversible unlike CCCP depolarization. 15-25 micro molar concentrations have been sufficient to induce full Cytochrome C / potential loss in all applications to date.

Intracellular Staining Buffers

10X staining buffers are described below. Tween20 can be used without washing out the detergent while Triton-X100 will require a wash. The Tween20 based buffer is the current preferred non-commercial buffer for reasons of its ease to use and ease of preparation.

A saponin based commercial concentrate, BD Perm/Wash, can be used interchangeably with the tween20 buffer.

10X Tween20 Intracellular Staining Buffer (For Cytochrome C antibody staining) CURRENT METHOD

This buffer is easy to make and filters well. It produces a staining pattern similar to saponin based buffers, and it does not need to be washed out prior to FACS analysis.

Per 50 mL combine:

1 mL Tween20

5 g BSA

Add PBS to 50 mL and dissolve completely.

Sterile filter. Store at 4°C.

Peptide Stocks

Peptide Name	Sequence	Extinction Coeff. 280 nm
	N-Term	C-Term
hBIM	Acetyl-MRPEIWIAQELRRIGDEFNA-Amide	5500 cm ⁻¹ M ⁻¹
hBID-Y	Acetyl -EDIIRNIARHLAQVGDSMDRY- Amide	1490 cm ⁻¹ M ⁻¹
mBAD	Acetyl -LWAAQRYGRELRRMSDEFEGSFKGL- Amide	6990 cm ⁻¹ M ⁻¹
mNoxaA	Acetyl -AELPPEFAAQLRKIGDKVYC- Amide	1490 cm ⁻¹ M ⁻¹
Puma	Acetyl -EQWAREIGAQLRRMADDLNA- Amide	5500 cm ⁻¹ M ⁻¹
Bmf-Y	Acetyl -HQAQVQIARKLQLIADQFHRY- Amide	1490 cm ⁻¹ M ⁻¹
Hrk-y	Acetyl -SSAAQLTAARLKALGDELHQY- Amide	1490 cm ⁻¹ M ⁻¹
Puma2A	Acetyl -EQWAREIGAQAARRMAADLNA- Amide	5500 cm ⁻¹ M ⁻¹
MS1	Acetyl-RPEIWMQTQGLRRLGDEINAYYAR-Amide	8480 cm ⁻¹ M ⁻¹
FS1	Acetyl-QWVREIAAGLRRLAADNVNAQLER-Amide	5500 cm ⁻¹ M ⁻¹

-Y and W- designate added residues for UV absorbance measurements at C or N term respectively.

MS1 is a non-natural MCL1-specific peptide: [ACS Chem Biol.](#) 2014 Sep 19;9(9):1962-8. doi: [10.1021/cb500340w](#).

FS1 is a non-natural BFL1 / BCL2A1-specific peptide: [Elife.](#) 2017 Jun 8;6. pii: e25541. doi: [10.7554/eLife.25541](#).

Sequence change: wHRK has been replaced by HRKy to reduce off target effects

Suggested doses for profiling

Peptide	Range (μM)	Binding partners	Class
BIM	0.001-100	All	Activator
BID	0.01-100	All	Activator
PUMA	0.1-100	All	Sensitizer
BAD	0.1-100	BCL2/W/XL	Sensitizer
NOTE: BCLXL dependent cells can respond in low nM range			
NOXA	1-100 uM	MCL1, BFL1	Sensitizer
HRKy	1-100 uM	BCLXL	Sensitizer
MS1	0.1-10 uM	MCL1	Sensitizer
FS1	0.1-10 uM	BFL1/BCL2A1	Sensitizer
ABT199 (venetoclax)	0.1-1	BCL2	Small molecule sensitizer
WEHI-539	0.1-1	BCLXL	Small molecule sensitizer
A-1331852	0.1-1	BCLXL	Small molecule sensitizer
A-1155463	0.1-1	BCLXL	Small molecule sensitizer
S63845	1-10	MCL1	Small molecule sensitizer

- A-133 and A-115 are more potent than WEHI-539. In our hands, A-133 is more potent at killing than A-115 or WEHI-539
- Do not use MS1 at concentrations greater than 10 μM or you may lose specificity. Doses higher than suggested begin to behave like PUMA
- Most peptides can handle freeze/thaw 5 times, but many of the small molecules including ABT263 have lost potency after multiple freeze thaws. Try to aliquot working stocks into single use volumes when possible.

Peptides Source and Purity

- Peptides should be 95% pure or greater. It is not generally worth the cost to get 99% pure or greater while at low purities (50-70%) you cannot be sure what the impurities are or what they may interact with
- We typically purchase our peptides from **New England Peptide**, but other vendors are just as suitable. Make sure you get an HPLC trace and mass spec for proof of purity. These documents are usually standard with peptide synthesis orders.

Peptide Stock Preparation

- Peptides should be made as TFA salts. Counter-ion exchange for sodium will result in peptides of lower solubility.
- Dissolve in DMSO. Peptides are about 20-30% salt by mass, so calculate volume accordingly.
 - o Dissolving lyophilized peptide powder at 50 mg/mL will generally produce peptide stocks of 10-15 mM.
- Always verify peptide concentration by UV absorbance at 280 nm.
- Master stocks: Store at -80°C.
- Working stocks: Aliquot from master, about 1-2 weeks worth (100 uL or so) Store at -20. Avoid frequent freeze-thaws.

Small Molecule Inhibitors

A number of validated small molecule inhibitors are now available from several companies. We have bought compounds from the following:

- MedChem Express
- ApexBio
- Selleckchem

The publicly available compounds we often use include: (* currently favored for use in iBH3)

ABT-737	*ABT-263	*ABT-199	
WEHI-553	A-1155463	*A-1331852	*S63845

ANEXO III –

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Estudos Bioanalíticos Aplicados ao Estudo Metabolômico de Pacientes com a Síndrome de Cri-Du-Chat

O presente projeto pretende avaliar o metabolismo de substâncias que podem estar relacionados com sintomas característicos da doença de seu filho (a). O conhecimento destes mecanismos permitirá entender melhor sobre esta doença e conseqüentemente, poderá oferecer um tratamento mais adequado e uma melhoria da qualidade de vida.

O objetivo desse estudo é a identificação de alterações de metabólitos e de vias bioquímicas referentes a deleção parcial do cromossomo 5. A aplicação direta dos métodos permitira a implantação de uma nova rotina diagnostica em hospitais públicos.

O estudo será feito com as amostras de urina do (a) paciente portador da SCDC e o grupo controle que serão voluntários sadios.

Será considerado leve o desconforto para a coleta de amostra de urina, devido ser um método não invasivo, sendo colhidas as amostras pelo o método tradicional, como o uso de sacos coletores quando for o caso, e pelo o uso de frascos coletores de urina.

Os pacientes estudados serão os pacientes recrutados pelo Núcleo de Aconselhamento e Pesquisa em Cri-du-chat e acompanhados na Unidade de Genética do Instituto da Criança do Hospital das Clinicas da FM USP.

Termos:

É garantida a liberdade do Sr. (a) de retirar o seu consentimento e deixar de participar do estudo a qualquer momento sem penalização alguma.

Todas as informações obtidas a seu respeito neste estudo, serão analisadas em conjunto com as de outros voluntários, não sendo divulgado a sua identificação ou de outros pacientes em nenhum momento. Além disto, o Sr. (a) tem a garantia de que todos os dados obtidos a seu respeito, assim como qualquer material coletado só serão utilizados neste estudo.

“O Sr. (a) não receberá nenhuma compensação financeira relacionada à sua participação neste estudo. Da mesma forma, o Sr. não terá nenhuma despesa pessoal em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa. Os dados e o material coletado serão usados somente para esta pesquisa.

A qualquer momento, se for de seu interesse, o Sr (a). poderá ter acesso a todas as informações obtidas a seu respeito neste estudo, ou a respeito dos resultados gerais do estudo. Quando o estudo for finalizado, o Sr.(a) será informado sobre os principais resultados e conclusões obtidas no estudo, caso seja o seu interesse.

Em qualquer etapa do estudo, o Sr. terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. Os principais investigadores são Prof Dr. Nilson Antonio de Assunção, que pode ser encontrado no endereço Rua Prof. Artur Riedel, 275 - Jardim Eldora do CEP 09972-270 - Diadema - SP. Telefone(s) (11) 8783-6503 (11) 7204-1890 e a Profa Dra Chong Ae Kim responsável pelo Ambulatório de Genética Clínica do Instituto da Criança do HCFMUSP.

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) - Rua Botucatu, 572 - 1º andar - cj 14. 5571-1062- FAX: 5539-7162 - E-mail: cepunifesp@unifesp.br.

*Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “**Estudos Bioanalíticos Aplicados ao Estudo Metabolômico de pacientes com a Síndrome de Cri Du Chat**”. Eu discuti com o **Dr. Nilson Antonio de Assunção** e a **Dra Chong Ae Kim**, sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou*

durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Data: ____/____/____

Nome do participante da pesquisa

Assinatura do paciente ou responsável legal.

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária, o Consentimentos Livre e Esclarecido deste paciente (ou representante legal) para a participação neste estudo. Declaro ainda que me comprometo a cumprir todos os termos aqui descritos.

Data: ____/____/____

Nome do pesquisador principal

Assinatura do pesquisador principal

Res. 196/96 – item IV.3:

Casos especiais de consentimento:

1. Pacientes menores de 16 anos – deverá ser dado por um dos pais ou, na inexistência destes, pelo parente mais próximo ou responsável legal;
2. Paciente maior de 16 e menor de 18 anos – com a assistência de um dos pais ou responsável;

3. Paciente e/ou responsável analfabeto – o presente documento deverá ser lido em voz alta para o paciente e seu responsável na presença de duas testemunhas, que firmarão também o documento;
4. Paciente deficiente mental incapaz de manifestação de vontade – suprimento necessário da manifestação de vontade por seu representante legal.

ANEXO IV –

Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SÃO PAULO - UNIFESP/
HOSPITAL SÃO PAULO

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudos Bioanalíticos Aplicados à Busca do Perfil Metabolômico e Proteômico de Anomalias Genéticas Raras: Síndromes de Cri-Du-Chat e de Williams-Beuren e Erros da Biossíntese do Colesterol

Pesquisador: Nilson Antonio de Assunção

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 12110913.9.0000.5505

Instituição Proponente: Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP/EPM

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 868.398

Data da Relatoria: 11/11/2014

Apresentação do Projeto:

emenda para inclusão de pesquisadores a saber:

DANIELLE ZILDEANA SOUSA FURTADO - MESTRADO

LUIS ANDRE ZANLUQUI - DOUTORADO

Objetivo da Pesquisa:

EMENDA PARA INCLUSÃO DE PESQUISADOR

Avaliação dos Riscos e Benefícios: