Universidade de São Paulo
Instituto de Química de São Carlos
Grupo de Bioanalítica, Microfabricação e Separações

Fabiana Aparecida Marques

Abordagem bioanalítica para busca de biomarcadores tumorais em modelo animal

São Carlos

2018

Fabiana Aparecida Marques

Abordagem bioanalítica para busca de biomarcadores tumorais em modelo animal

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

Área de concentração: Química Analítica e Inorgânica

Orientador: Prof. Dr. Emanuel Carrilho

Exemplar revisado

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

São Carlos

2018

Dedicatória

À minha mãe Maria de Fátima, pela confiança depositada em mim.

Aos meus irmãos e minha tia Sueli pelo apoio irrestrito.

AGRADECIMENTOS

À Deus em primeiro lugar, minha fonte de fé e energia, por ter me dado forças e permitido chegar até este momento da minha vida, além de colocar tantas pessoas boas no meu caminho, que com toda certeza contribuíram para minha evolução.

À toda minha família, em especial minha mãe, Maria de Fátima, meus irmãos, minha tia Sueli (segunda mãe) e sobrinhos que me motivaram a seguir em frente, e mesmo distante sempre me deram suporte; com amor eu agradeço.

Agradeço ao meu noivo Jozemir, pela paciência, compreensão e amor, e por ter acreditado em mim, dando forças para eu chegar até aqui, alimentando sonhos que aos poucos vamos concretizando, obrigada!

Agradeço fortemente ao Prof. Dr. Emanuel Carrilho, por ter aberto as portas do seu grupo de pesquisa e ter me aceito como orientanda, pelas agradáveis conversas em grupo e incentivo em sempre buscar o melhor, obrigada por ser esse grande profissional e pessoa que é, exemplo de calma e simplicidade, grata pela amizade! Sinto-me orgulhosa de ter vivido essa fase da minha carreira no grupo BioMicS, muito obrigada!

Aos meus queridos colegas do grupo BioMicS, por fazerem do ambiente de trabalho um local mais dinâmico e alegre, em especial à alguns sempre mais presentes em minhas discussões, e literalmente por me “aguentarem”: Bruno (kiridinho), Ju A. (amigordinha), Lu (amigordinha) – por discutirem comigo, me dando suporte e auxílio para continuar, obrigada por me ajudarem tanto! Ju B., Amanda (Mandinha), Thiago Segato (amigordo), Beatriz (Bia), Cleyton (Piá) – foram muitos bons momentos; Ana Carolina Urbaczek (Carol) – por ter me apresentado o grupo de imunologia em Araraquara; Weliton, Letícia e Vinícius. Certamente tem mais pessoas, então sintam-se agradecidos, e obrigada pelos muitos momentos divertidos fora do laboratório também!

Agradeço ao Prof. Dr. Stanislaw Bogusz e Prof. Dr. Renato Lajarim, pelas contribuições durante da qualificação, e também outros momentos após, durante a execução do trabalho, muito obrigada pelas discussões.

Ao Prof. Dr. Álvaro José, pela participação na orientação durante o estágio PAE, um período que aprendi muito e me fez encantar mais pela carreira docente.

Agradeço ao técnico do laboratório de cromatografia do IQSC, Dr. Guilherme Miola, pela disponibilidade em me auxiliar nas análises realizadas no QToF, e ao Prof. Dr. Fernando Lanças por permitir a utilização do equipamento.

À colaboração com o grupo de imunologia da UNESP de Araraquara coordenado pela Profa. Dra. Iracilda Zeppone, pela concessão das amostras utilizadas nesse trabalho, agradeço em especial à Marisa, Juliana e Francine pela ajuda com os experimentos e manuseio dos animais, muito obrigada!

À Profa. Dra. Dajana Vuckovic, que através do programa *Emerging Leaders in the Americas Program (ELAP)*, me aceitou em seu laboratório durante o estágio de 5 meses na *Concordia University*, Montreal – Canadá, obrigada pela oportunidade de realizar o intercâmbio e pelo aprendizado que me possibilitou. Agradeço também ao técnico Dr. Heng Jiang, pela grande ajuda com as análises por LC-MS. *Thank you so much for this opportunity!*

Aos funcionários e professores do IQSC que de alguma forma contribuíram para a execução desse trabalho e dessa fase da minha carreira acadêmica.

Agradeço ao Prof. Dr. Anízio Faria, grande profissional, pela orientação durante a iniciação científica e contribuinte por hoje eu atuar na carreira acadêmica, obrigada por sempre acreditar em mim!

Agradeço à todos amigos que mesmo de longe sempre acreditaram e torceram por mim, impossível citar nomes, mas saibam que são sempre lembrados e guardados em meu coração. Em especial duas queridas amigas em São Carlos que sempre pude contar, Thiessa e Livia (desde a graduação juntas né amiga!) – muito obrigada!

Agradeço ao Instituto Federal Goiano, pela licença para que eu pudesse dar continuidade ao trabalho de doutorado.

Aos órgãos de fomento CNPq, FAPESP, INCTBio e em especial à CAPES pela bolsa concedida.

Enfim, agradeço a todos de alguma forma contribuíram com esse trabalho e para que eu chegasse até aqui, desde a minha infância, de coração eu AGRADEÇO!

RESUMO

MARQUES, F. A. **Abordagem bioanalítica para busca de biomarcadores tumorais em modelo animal.** Tese (Doutorado em Química Inorgânica e Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.

Atualmente, os estudos ômicos, principalmente no campo da metabolômica, têm tido grandes avanços contribuindo para a descoberta de biomarcadores e consequentemente aumentando a eficiência do tratamento do câncer. A lipidômica é um novo ramo da metabolômica que visa o estudo abrangente dos lipídeos presentes em um determinado organismo dando ênfase ao metabolismo dos lipídeos e como estão relacionados à progressão da doença. A utilização da espectrometria de massas aliada a abordagens bioanalíticas tem progredido rapidamente nos últimos anos, possibilitando a análise e compreensão de pequenas moléculas no contexto biológico e de desenvolvimento do câncer. Dessa forma, para a obtenção de uma boa cobertura lipídica, o preparo de amostra, os parâmetros cromatográficos e o processamento de dados são de suma importância. Nesse trabalho foi avaliado o perfil lipídico de amostras de plasma advindas do modelo tumoral de Ehrlich, um adenocarcinoma mamário em camundongos fêmeas. Na primeira parte do estudo foi utilizado o método de extração de lipídeos por Bligh-Dyer e realizadas comparações entre plasma de camundongo com tumor de Ehrlich induzido e plasma de camundongo controle, além da comparação entre plasma de camundongo com tumor de Ehrlich e fluido tumoral ascítico de Ehrlich. Através dos modelos estatísticos obtidos foi observado que no modo negativo de ionização foram obtidos ácidos graxos significativamente diferentes entre os grupos, através do modelo de PLS-DA, dando ênfase ao perfil de ácidos graxos saturados, que mostraram-se em maior quantidade no plasma de Ehrlich. No modo positivo, alterações nos níveis de fosfatidilcolinas (PCs) foram obtidos, indicando a fosfocolina como potencial biomarcador para o câncer de mama, destacando-se as vias metabólicas mais afetadas: metabolismo do ácido linoléico e dos glicerofosfolipídeos. Já a comparação entre fluido tumoral e plasma de Ehrlich foi obtido, através dos dados no modo negativo de ionização e pelo modelo de PLS-DA, que informações lipídicas do tumor podem ser refletidas no plasma, em especial para o conteúdo de ácidos graxos, fosfatidilcolinas e fosfatidiletanolaminas (PEs). Uma segunda abordagem utilizada nessa tese foi a utilização da amostragem *in vivo* por microextração em fase sólida (SPME) para avaliação metabólica. Os principais parâmetros de SPME que podem afetar a eficiência da extração foram avaliados: tempo de extração e tempo de desorção. Por meio de um planejamento experimental foram obtidos 10 min e 20 min, respectivamente, para cada variável. Após processamento dos dados foram obtidos 142 e 78 *molecular features* no modo positivo e negativo, respectivamente. Através dos dados obtidos no modo negativo, e do modelo de PLS-DA construído foi possível avaliar possíveis biomarcadores responsáveis pela diferenciação do fluido tumoral e do fluido presente no camundongo controle, destacando ácidos graxos saturados, o ácido lisofosfatídico (LPA 18:0), fosfatidilinositol (PI 36:0) e derivados de colesterol. O presente estudo apresentou resultados que devem ser melhor explorados e correlacionados com dados a partir de amostras de humanos, podendo ser um indicador para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos para câncer de mama.

Palavras-chave: Lipidômica, tumor de Ehrlich, câncer de mama, SPME, espectrometria de massas

ABSTRACT

MARQUES, F. A. **Abordagem bioanalítica para busca de biomarcadores tumorais em modelo animal.** Tese (Doutorado em Química Inorgânica e Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.

Currently, the “omics” studies mainly in the field of metabolomics, have increasingly contributed to the discovery of new biomarkers and consequently increasing the efficiency of cancer therapy. Lipidomics is a new approach of the metabolomics that aims the comprehensive study of the lipids present in a given organism, emphasizing the metabolism of lipids and how they are associated to the progression of the disease. Mass spectrometry coupled to bionalytical tools has progressed rapidly in recent years, making it possible to analyze and to understand small molecules in the biological context in the development of cancer. Thus, to obtain a good lipid coverage, sample preparation, chromatographic parameters, and the data processing are important. In this work, the lipid profile of plasma samples from the Ehrlich animal model, a mammary adenocarcinoma in female mice, was evaluated. In the first part of the study the method of lipid extraction by Bligh-Dyer was used and comparisons were performed between mouse plasma with induced Ehrlich tumor and control mouse plasma. In addition, comparison between mouse plasma with Ehrlich tumor and Ehrlich ascitic tumor fluid was performed. Through multivariate models PLS-DA was observed that in the negative ionization mode fatty acids were significantly different between the groups, emphasizing the profile of saturated fatty acids in higher levels in the plasma of Ehrlich. In the positive mode of ionization changes in phosphatidylcholine (PCs) levels were obtained, indicating the phosphocholine group as potential biomarker for breast cancer, with metabolic pathways of the linoleic acid and glycerophospholipids metabolism the most affected. The comparison between tumor fluid and Ehrlich plasma was obtained through the negative mode dataset using the PLS-DA model, showing that the lipid information of tumor can be reflected in the plasma, especially for the fatty acid, phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine (PE). A second approach used in this thesis was the using of the in vivo sampling by solid phase microextraction (SPME). Times of extraction and desorption were the main parameters of SPME assessed using experimental design since they can affect the efficiency of extraction, where 10 and 20 min were the better times of extraction and desorption obtained, respectively. After processing the dataset, 142 and 78 features were obtained in the positive and negative modes of ionization, respectively. Through the data obtained in the negative mode, PLS-DA model was able to evaluate possible biomarkers responsible for the differentiation between tumor fluid and that fluid present in the control mice, highlighting saturated fatty acids, lysophosphatidic acid (LPA 18:0), phosphatidylinositol (PI 36:0) and cholesterol derivatives. The present study showed results that should be better explored and correlated with data from human samples, and may be an indicator for the development of new therapeutic agents for breast cancer.

Key words: Lipidomic, Ehrlich's tumor, breast cancer, SPME, mass spectrometry

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Análise Lipidômica de Fluido Peritoneal e Plasma do Modelo Tumoral de Ehrlich

- FIGURA 1.1. Contextualização da ciência lipidômica dentro do dogma central da biologia. a) os lipídios são normalmente extraídos com solventes orgânicos do material biológico em estudo (por exemplo: tecido, biofluidos, células, etc); b) analisados por ferramentas analíticas de *high-throughput* como Cromatografia líquida hifenizada com espectrometria de massas, obtendo um perfil lipídico; c) Análise das diferenças permitem a geração de hipóteses que correlaciona vias metabólicas que podem ou não serem afetadas, d) e e) estudos a cerca da genômica e proteômica, que complementam as informações lipidômicas.....21
- FIGURA 1.2. Principais classes lipídicas que podem constituir um lipidoma.....22
- FIGURA 1.3. Representação de um triglicerídeo simples, o triacilglicerol, formado a partir do ácido esteárico e glicerol.24
- FIGURA 1.4. Estrutura química do colesterol, exemplificando a classe dos esteróides.26
- FIGURA 1.5. Estrutura química de um ácido graxo, nesse exemplo o ácido linoléico26
- FIGURA 1.6. Esquema geral dos componentes de um espectrômetro de massas.31
- FIGURA 1.7. Esquema geral do espectrômetro de massas do tipo QToF.33
- FIGURA 1.8. Sobreposição de cromatogramas de íons totais (TIC) das amostras de plasma referentes ao camundongos com Ehrlich induzido e controle, antes das etapas de processamento (modo negativo).....42
- FIGURA 1.9. Cromatogramas de amostras de plasmas extraídas pelo método de Bligh-Dyer analisadas por LC-MS na polaridade negativa. Exemplo de desconvolução utilizando diferentes parâmetros no MZmine, em A) utilizando 0,1 – 2,5 min para *peak duration range* e e em B) utilizando 0,1 – 3,0 como *peak duration range*, em ambos os casos foi utilizado o algoritmo *noise amplitude* para processamento.43
- FIGURA 1.10. *Scores plot* do modelo PCA para amostras de plasma de camundongos com tumor de Ehrlich induzido (verde), plasma de camundongos controle (azul) e *Quality Control* (amostras de controle de qualidade – vermelho) $R^2 = 0,415$ $Q^2 = 0,307$ – análises no modo negativo.44
- FIGURA 1.11. *Scores plot* do modelo PLS-DA para amostras de plasma de camundongos com tumor de Ehrlich induzido (verde), plasma de camundongos controle (azul) $R^2X = 0,470$, $R^2Y = 1,00$ e $Q^2 = 0,828$ - análises no modo negativo.45
- FIGURA 1.12. Testes de 100 permutações do modelo PLS-DA das amostras de plasma de camundongos com tumor de Ehrlich induzido e plasma de camundongos controle - análises no modo negativo.46

FIGURA 1.13. <i>Scores plot</i> do modelo OPLS-DA para amostras de plasma de camundongos com tumor de Ehrlich induzido (verde), plasma de camundongos controle (azul) $R^2=1,00$, $Q^2 = -0,111$ - análises no modo negativo.....	47
FIGURA 1.14. Cromatograma de íons extraídos referentes ao mix GLC 566 utilizado na identificação dos ácidos graxos relevantes na discriminação entre os grupos avaliados (Ehrlich e controle) – modo negativo.	48
FIGURA 1.15. Esquema da biossíntese de ácidos graxos insaturados.	52
FIGURA 1.16. Sobreposição de cromatogramas de íons totais (TIC) das amostras de plasma referentes aos camundongos com Ehrlich induzido e controle, antes das etapas de processamento (modo positivo).....	53
FIGURA 1.17. <i>Scores plot</i> do modelo PCA para amostras de plasma de camundongos com tumor de Ehrlich induzido (verde), plasma de camundongos controle (azul) e <i>Quality Control</i> (amostras de controle de qualidade – vermelho) $R^2 = 0,638$ $Q^2 = 0,027$ – análises no modo positivo.	54
FIGURA 1.18. <i>Scores plot</i> do modelo PLS-DA para amostras de plasma de camundongos com tumor de Ehrlich induzido (verde), plasma de camundongos controle (azul) $R^2X = 0,632$, $R^2Y = 0,999$ e $Q^2 = 0,487$ - análises no modo positivo.....	55
FIGURA 1.19. Testes de 100 permutações do modelo PLS-DA das amostras de plasma de camundongos com tumor de Ehrlich induzido e plasma de camundongos controle (análises no modo positivo).....	55
FIGURA 1.20. <i>Scores plot</i> do modelo OPLS-DA para amostras de plasma de camundongos com tumor de Ehrlich induzido (verde), plasma de camundongos controle (azul) $R^2 = 0,659$, $Q^2 = -0,024$ (análises no modo positivo).	56
FIGURA 1.21. Impacto das vias metabólicas identificadas para alguns lipídeos significativamente diferentes entre os grupos de camundongos com tumor de Ehrlich induzido e controle, possíveis biomarcadores. O eixo X representa o impacto da via metabólica em relação à via correspondente no metabolismo do animal. E o eixo Y refere-se ao <i>p – valor</i> . Onde, A: Biossíntese de ácidos graxos insaturados; B: biossíntese de ácidos graxos; C: Biossíntese de esteróides; D: Metabolismo do ácido araquidônico e E: metabolismo do ácido linoléico (Modo negativo).	61
FIGURA 1.22. Impacto das vias metabólicas identificadas para alguns lipídeos significativamente diferentes entre os grupos de camundongos com tumor de Ehrlich induzido e controle, possíveis biomarcadores. O eixo X representa o impacto da via metabólica em relação à via correspondente no metabolismo do animal. Onde: A: Metabolismo do ácido araquidônico; B: Biossíntese do inibidor de glicosilfosfatidilinositol (GPI); C: metabolismo do ácido alfa-linolênico; D: metabolismo dos glicoderofosfolípidos e E: metabolismo do ácido linoléico (modo positivo).....	62

FIGURA 1.23. Cromatogramas de íon extraído (XIC) referentes ao lipídeos considerados significativamente relevantes em relação à discriminação entre as amostras de plasma de Ehrlich e controle analisadas no modo positivo.	64
FIGURA 1.24. Cromatograma de íon extraído (XIC) referente ao metabólito de m/z 808,58 (A); espectro de MS1 do pico referente ao metabólito extraído (B) e espectro e MS2 referente à fragmentação do íon extraído (m/z 808,58), mostrando o padrão de fragmentação do mesmo e c confirmando as principais que são confirmatórias para a classe de lipídeo estabelecida para tal.	65
FIGURA 1.25. Espectro de MS2 para o lipídeo referente à m/z 780,55; demonstrando as fragmentações que confirmam a classe estabelecida para tal metabólito.	65
FIGURA 1.26. Espectro de MS2 para o lipídeo referente à m/z 568,34; demonstrando as fragmentações que confirmam a classe estabelecida para tal metabólito.	66
FIGURA 1.27. <i>Score plot</i> PCA entre os grupos de plasma de Ehrlich (Vermelho) e fluido tumoral (Verde) para análises por LC-MS no modo negativo (A) e modo positivo (B).	67
FIGURA 1.28. <i>Score plot</i> PLS-DA entre os grupos de plasma de Ehrlich (Vermelho) e fluido tumoral (Verde) para análises por LC-MS no modo negativo (A) e modo positivo (B).	68
FIGURA 1.29. <i>VIP plot</i> dos 12 variáveis com maior influência no modelo de PLS-DA em A) modo negativo e B) modo positivo. Do lado direito de cada figura os boxplots para os features representando as variações em cada grupo de amostra.	70
FIGURA 1.30. Impacto das vias metabólicas identificadas para alguns lipídeos significativamente diferentes entre os grupos de Plasma de Ehrlich e Fluido tumoral, analisados no modo positivo. O eixo X representa o impacto da via metabólica em relação à via correspondente no metabolismo do animal. E o eixo Y refere-se ao p – valor. Onde - A: Metabolismo do ácido araquidônico; B: Metabolismo do ácido alfa-linoléico; C: Metabolismo do ácido linoléico; D: Biossíntese do inibidor de glicosilfosfatidilinositol (GPI) e E: Metabolismo de glicerofosfolipídeos.	75

CAPÍTULO 2

Utilização de Amostragem in vivo para Avaliação Metabólica em Modelo Tumoral de Ehrlich

FIGURA 2. 1. Fluxograma simplificado, de um estudo de metabolômico.	82
FIGURA 2.2. Esquema geral de tipos de preparo de amostra biológicas para análise por LC-MS. Diluição, precipitação de proteínas (PPT), extração líquido-líquido (LLE), extração em fase sólida (SPE) e microextração em fase sólida (SPME).	84
FIGURA 2.3. Esquema do procedimento de SPME utilizando o modo de extração direta (A), <i>headspace</i> (B) e dessorção por solvente orgânico (C).	85

FIGURA 2.4. Esquema de um fluxo de trabalho utilizando SPME <i>in vivo</i> como método direto de extração e análise por LC-MS/MS.....	87
FIGURA 2.5. Dispositivos de SPME biocompatíveis para bioanálises e amostragem <i>in vivo</i> (45 µm de espessura, 15 mm de comprimento do revestimento).	91
FIGURA 2.6. Espectro de massas obtidos através de inserção direta no MS para cada experimento realizado para otimizar os tempos de extração e dessorção por SPME. A) Modo positivo, B) modo negativo e C) branco da extração.	96
FIGURA 2.7. Respostas obtidas para cada experimento do planejamento realizado para verificar o melhor tempo de extração e dessorção utilizando SPME em amostra de fluido tumoral. Algarismos na parte superior das barras indicam a quantidade de sinais obtidos.	97
FIGURA 2.8. Mapa de íons (m/z versus tempo de retenção) referentes à extração por SPME <i>in vivo</i> em peritônio de tumor de Ehrlich e animal sadio analisados por LC-MS no modo positivo (A – dados brutos extraídos do MZmine e B – dados após confirmação de picos pelo <i>DataAnalysis</i>) e modo negativo (C - dados brutos extraídos do MZmine e D – dados após confirmação de picos pelo <i>DataAnalysis</i>).	99
FIGURA 2.9. <i>Score plot</i> PCA entre os grupos: 1 – Controle (N), 2 – Tumor de Ehrlich (D) e	101
FIGURA 2.10. <i>Score plot</i> PLS-DA entre os grupos: 1 – Controle (N) e 2 – Tumor de Ehrlich (D) extraídos por SPME <i>in vivo</i> e analisados por LC-MS no modo positivo (A) e modo negativo (B).	101
FIGURA 2.11. <i>VIP plot</i> das 9 variáveis com maior influência no modelo de PLS-DA referente às análises das amostras obtidas pela extração por SPME <i>in vivo</i> . Do lado direito os <i>boxplots</i> para os <i>features</i> representando as variações em cada grupo de amostra. Onde 1: grupo de camundongos com tumor de Ehrlich induzido e 2: grupo de camundongos controle.	106
FIGURA 2.12. Impacto das vias metabólicas identificadas para alguns metabólitos significativamente diferentes entre os grupos de amostras extraídas por SPME <i>in vivo</i> em camundongos com tumor de Ehrlich induzido e camundongos controle. O eixo X representa o impacto da via metabólica em relação à via correspondente no metabolismo do animal. E o eixo Y refere-se ao <i>p – valor</i> . Onde: A) Metabolismo da alanina, aspartato e glutamato; B) Metabolismo do butanoato; C) Metabolismo do propanoato; D) Biosíntese de ácido graxo; E) Biosíntese de ácidos graxos insaturados; F) Metabolismo de glicerolipídeos; G) Ciclo do citrato (TCA); H) Metabolismo de glicerofosfolipídeos; I) Metabolismo do ácido araquidônico.	107
FIGURA 2.13. Cromatogramas de íons extraídos (XIC) referentes ao metabólitos considerados significativamente relevantes em relação à discriminação entre as amostras extraídas por SPME <i>in vivo</i> analisadas no modo negativo.	108

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Análise Lipidômica de Fluido Peritoneal e Plasma do Modelo Tumoral de Ehrlich

TABELA 1.1. Classes, abreviatura internacional e esqueleto químico de alguns fosfolipídeos representativos.	23
TABELA 1.2. Classes, abreviatura internacional e esqueleto químico de alguns esfingolipídeos representativos.	25
TABELA 1.3. Lista de alguns lipídeos envolvidos em câncer de mama, onde “X” significa que podem estar superexpressa (<i>up</i>) ou subexpressa (<i>down</i>) com relação às amostras controle. GPL (glicerofosfolipídeo); FA (ácido graxo) e SL (esfingolipídeo).	29
TABELA 1.4. Principais íons (<i>m/z</i>) observados para diferentes subclasses de glicerofosfolipídeos.	32
TABELA 1.5. Ácidos graxos estatisticamente diferentes entre as amostras de plasma Ehrlich e plasma controle analisadas por LC-MS e extraídos do modelo PLS-DA – modo negativo..	49
TABELA 1.6. Tentativa de identificação dos lipídeos significativos entre as amostras de plasma de Ehrlich e controle analisadas no modo positivo.	58
TABELA 1.7. Resultados das vias metabólicas em relação ao impacto causado por cada uma (modo negativo).....	61
TABELA 1.8. Resultados das vias metabólicas em relação ao impacto causado por cada uma.	62
TABELA 1.9. Parâmetros estatísticos obtidos na validação dos modelos de PLS-DA para o conjunto de amostras de fluido tumoral e plasma de Ehrlich, A) análises no modo negativo e B) análises no modo positivo.	68
TABELA 1.10. Tentativa de identificação dos lipídeos significativos entre as amostras de plasma de Ehrlich e Fluido tumoral no modo negativo.....	71
TABELA 1.11. Tentativa de identificação dos lipídeos significativos entre as amostras de plasma de Ehrlich e Fluido tumoral no modo positivo.....	72
TABELA 1.12 Resultados das vias metabólicas em relação ao impacto causado por cada uma para o modo positivo do comparativo de plasma e fluido tumoral de Ehrlich.	75

CAPÍTULO 2

Utilização de Amostragem in vivo para Avaliação Metabólica em Modelo Tumoral de Ehrlich

TABELA 2.1. Níveis avaliados no planejamento experimental realizado para obtenção da melhor condição de SPME para extração *untarget* de líquido tumoral de Ehrlich, onde: V1-variável 1 (tempo de extração) e V2 – variável 2 (tempo de dessorção)..... 90

TABELA 2.2. Parâmetros ajustados no espectrômetro de massas (LTQ XL Thermo Fisher).92

TABELA 2.3. Número de *molecular features* detectados utilizando SPME *in vivo* em fluido tumoral de Ehrlich em cada etapa do tratamento de dados. 98

TABELA 2.4. Parâmetros estatísticos obtidos na validação dos modelos de PLS-DA para o conjunto de amostras: 1 – Controle (N) e 2 – Tumor de Ehrlich extraídos utilizando SPME *in vivo*. Onde: A) análises no modo positivo e B) análises no modo negativo..... 102

TABELA 2.5. Tentativa de identificação dos metabólitos significativos entre as amostras provenientes da extração por SPME *in vivo* (modo negativo). 104

TABELA 2.6. Resultados das vias metabólicas em relação aos respectivos impactos causados. 106

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ACN – acetonitrila
- C_0 – concentração inicial do analito
- C18 – octadecilsilano
- C_f^∞ – concentração de analito sobre a fibra
- C_{fmax} - concentração máxima de sítios ativos na fase extratora
- CID – dissociação induzida por colisão (do inglês - *Collision Induced Dissociation*)
- CV – coeficiente de variação
- EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês - *Ethylenediamine tetraacetic acid*)
- ESI – ionização por eletronebulização (do inglês - *electrospray ionization*)
- FA – ácido graxo (do inglês – *fatty acid*)
- FWHM - *Full Width at Half Maximum*
- GC – cromatografia gasosa (do inglês – gas chromatography)
- GP – glicerofosfolípideo (do inglês – *glycerophospholipid*)
- HMDB – *Human Metabolome Database*
- HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês - *high performance liquid chromatography*)
- INCA – Instituto Nacional do Câncer
- K_{Afs} – constante de distribuição do analito entre o revestimento extrator e a matriz da amostra
- KEGG – *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*
- LC – cromatografia líquida (do inglês - *liquid chromatography*)
- LC-MS – cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (do inglês - *liquid chromatography - mass spectrometry*)
- LLE – extração líquido líquido (do inglês – *liquid- liquid extration*)
- LPC – lisofosfatidilcolina (do inglês – *lysophosphatidylcholine*)
- LTQ XL – espectrômetro de massas do tipo *ion trap linear*
- m/z – relação massa carga
- MeOH – metanol
- METLIN – *Metabolomics Database*
- MFA – ácido graxos monoinsaturados (do inglês - *monounsaturated fatty acids*)
- MS – espectrometria de massas (do inglês – *mass spectrometry*)

- MS/MS – espectrometria de massas em *tandem*/ sequencial
- n – número de mols de analito extraído
- OPLS-DA – projeções ortogonais para estruturas latentes - análise discriminante (do inglês - *orthogonal projections to latent structures discriminant analysis*)
- PA – poliacrilato
- PBS – tampão fosfato salino (do inglês - *phosphate-buffered saline*)
- PC – fosfatidilcolina (do inglês – *phosphatidylcholine*)
- PCA – análise de componentes principais (do inglês - *principal component analysis*)
- PCs – componentes principais (do inglês – *principal components*)
- PD – plasma de camundongo com tumor de Ehrlich
- PDMS – polidimetilsiloxano
- PE – fosfatidiletanolamina (do inglês – *phosphatidylethanolamine*)
- PG – fosfatidilglicerol (do inglês – *phosphatidylglycerol*)
- PI – fosfatidilinositol (do inglês – *phosphatidylinositol*)
- PLA2 – fosfolipase A2
- PLS-DA – projeção de mínimos quadrados parciais - análise discriminante (do inglês - *partial least squares projection - discriminant analysis*)
- PN – plasma de camundongo controle
- PPT – precipitação de proteínas (do inglês – *protein precipitation*)
- PS – fosfatidilserina (do inglês – *phosphatidylserine*)
- Q – quadrupolo
- Q^2 – parâmetro de previsibilidade do modelo
- QCs – controles de qualidade (do inglês – *quality controls*)
- QToF – quadrupolo tempo de voo (do inglês - *quadrupole time-of-flight*)
- R^2 – parâmetro de ajuste do modelo
- RF – rádio frequência
- RPMI 1640 – meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute*
- SCD – esteroil-CoA desaturase
- SL – esfingolípido (do inglês – *sphingolipid*)
- SPE – extração em fase sólida (do inglês – *solid phase extraction*)
- SPME – microextração em fase sólida (do inglês – *solid phase microextraction*)
- TG – triacilgliceróis (do inglês – *triacylglycerols*)

- TIC – cromatograma de íons totais (do inglês – *total ion chromatogram*)
- V – volume da amostra
- V_f – volume de revestimento de fibra
- VIP – importância da variável na projeção (do inglês - *Variable Importance in Projection*)
- XIC – cromatograma de íon extraído (do inglês - *extracted-ion chromatogram*)

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1

Análise Lipidômica de Fluido Peritoneal e Plasma do Modelo Tumoral de Ehrlich

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 Lipidômica.....	20
1.2 Importância da lipidômica e sua relação com o câncer	27
1.3 Câncer de mama	28
1.4 Modelo animal de tumor de Ehrlich	29
1.5 Análise lipidômica no modo <i>shotgun</i>	30
1.6 Ferramentas estatísticas aplicadas em estudos Ômicos	33
2 OBJETIVOS	35
2.1 Objetivos gerais	35
2.2 Objetivos específicos	35
3 MATERIAIS E MÉTODOS	36
3.1 Animais utilizados nos experimentos	36
3.2 Inoculação e manutenção da linhagem celular tumoral nos camundongos.....	36
3.3 Estudo lipidômico.....	36
3.4 Obtenção das amostras para análise lipidômica	37
3.4.1 Preparo das amostras de plasma e fluido peritoneal	37
3.4.2 Preparo dos extratos lipídicos	37
3.4.3 Preparo do mix de padrão de ácidos graxos não esterificados	37
3.5 Análises por cromatografia líquida – espectrometria de massas.....	38
3.5.1 Separação cromatográfica.....	38
3.5.2 Espectrometria de massas	38
3.6 Análise de dados e identificação de metabólitos	39
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1 Análise comparativa de lipídeos presentes em plasma de camundongos com tumor de Ehrlich induzido e controle.....	41
4.1.1 Análises realizadas por LC-MS em ionização negativa	41
4.1.2 Análises realizadas por LC-MS com ionização positiva	53
4.2 Análises das vias metabólicas para as análises no modo negativo e positivo utilizando a plataforma <i>MetaboAnalyst</i>	60
4.3 MS/MS de alguns lipídeos considerados potenciais biomarcadores identificados no modo positivo	63

4.4 Análise comparativo entre fluido tumoral ascítico e plasma de Ehrlich utilizando o software <i>Metaboanalyst</i>	66
--	----

5 CONCLUSÕES.....	77
--------------------------	-----------

CAPÍTULO 2

Utilização de Amostragem in vivo para Avaliação Metabólica em Modelo Tumoral de Ehrlich

1 INTRODUÇÃO	80
---------------------------	-----------

1.1 Metabolômica e busca de biomarcadores.....	80
--	----

1.2 Métodos de preparo de amostra para metabolômica utilizando LC-MS	83
--	----

1.2.1 Microextração em fase sólida (SPME).....	84
--	----

2 OBJETIVOS	89
--------------------------	-----------

2.1 OBJETIVO GERAL.....	89
-------------------------	----

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	89
---------------------------------	----

3 MATERIAIS E MÉTODOS	90
------------------------------------	-----------

3.1 Otimização dos parâmetros de microextração em fase sólida no modo direto – <i>in vitro</i> ..	90
---	----

3.2 Tratamento dos dados obtidos pelo planejamento experimental.....	92
--	----

3.3. Animais utilizados nos experimentos <i>in vivo</i>	92
---	----

3.3 Análises por das amostras obtidos pela extração por SPME <i>in vivo</i> utilizando LC-MS...	93
---	----

3.4.1 Separação cromatográfica	93
--------------------------------------	----

3.4.2 Espectrometria de massas.....	93
-------------------------------------	----

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	95
--	-----------

4.1 Otimização das condições de SPME	95
--	----

4.2 Análises metabólicos de tumor de Ehrlich utilizando SPME <i>in vivo</i>	98
---	----

4.2.1 Comparação das análises do modo negativo e modo positivo utilizando LC-MS	98
---	----

4.2.2 Análise comparativa entre camundongos com tumor de Ehrlich induzido e camundongos controle utilizando SPME <i>in vivo</i>	100
---	-----

5 CONCLUSÕES.....	109
--------------------------	------------

REFERÊNCIAS	110
--------------------------	------------

MERCURI, O., DE TOMAS, M. E., DE ANTUENO, R. J. In vitro conversion of saturated to monounsaturated fatty acid by Ehrlich ascites cells. Lipids, v. 16, n. 12, p. 893-896, 1981.....	114
---	------------

ANEXO I	119
----------------------	------------

ANEXO II.....	120
----------------------	------------

ANEXO III.....	121
-----------------------	------------

Capítulo 1

*Análise Lipídômica de Fluido
Peritoneal e Plasma do Modelo
Tumoral de Ehrlich*

1 INTRODUÇÃO

1.1 Lipidômica

Lipidômica é o estudo abrangente de todos lipídeos em dado sistema biológico, os quais podem estar relacionados à sinalização celular, composição da membrana, interações metabólitos-proteínas e respostas a alterações devido a alguma intervenção no metabolismo (WATSON, 2006).

O termo “lipidoma” pode ser definido de várias formas e pode estar relacionado à estrutura molecular ou propriedades físicas/biológicas. Em geral, constituem-se como um conjunto de biomoléculas que possuem uma cadeia carbônica de ácido graxo que pode variar de acordo com sua terminação “cabeça” gerando uma diversidade de estruturas e funcionalidades, bem como suas classes (WATSON, 2006).

O considerável avanço das ciências ômicas tem estimulado o interesse em estudos do perfil molecular de diversos sistemas biológicos. O crescente interesse pela análise de lipídeos tem acompanhado essa evolução, contribuindo para a consolidação de um novo campo denominado lipidômica (WENK, 2005).

Embora pesquisas envolvendo lipídeos sejam intensivas desde a década de 1960, recentemente têm se tornado proeminente devido o surgimento da lipidômica, uma subárea da metabolômica (Figura 1.1) (SEPPÄNEN-LAAKSO; OREŠIČ, 2009).

FIGURA 1.1. Contextualização da ciência lipidômica dentro do dogma central da biologia. a) os lipídios são normalmente extraídos com solventes orgânicos do material biológico em estudo (por exemplo: tecido, biofluidos, células, etc); b) analisados por ferramentas analíticas de *high-throughput* como Cromatografia líquida hifenizada com espectrometria de massas, obtendo um perfil lipídico; c) Análise das diferenças permitem a geração de hipóteses que correlaciona vias metabólicas que podem ou não serem afetadas, d) e e) estudos a cerca da genômica e proteômica, que complementam as informações lipidômicas.

FONTE: Adaptado de WENK, 2005.

Nos últimos anos o interesse por estudos do lipidoma tem aumentado substancialmente, sendo que um dos pontos que mais contribuem para isso é desenvolvimento de ferramentas analíticas cada vez mais modernas, permitindo a detecção e determinação de milhares de compostos lipídicos (QUEHENBERGER et al., 2010).

Aliada a essas abordagens, há o interesse por aspectos mecanísticos da biologia dos lipídeos, entendimento voltados para nível molecular, que permite a identificação de caminhos metabólicos que são ativados ou desativados durante o desenvolvimento de uma determinada alteração ou mudança biológica, seja ela causada por uma condição fisiológica ou patológica. Essa melhor compreensão é necessária para obter novas estratégias de intervenção, lipídeos de membrana e outros sinalizadores presentes em fluidos biológicos ou tecidos refletem diretamente estados fisiológicos num determinado momento, o que corrobora no melhor entendimento do significado biológico de alguns metabólitos, permitindo a descoberta refinada de biomarcadores e estratégias terapêuticas mais eficientes (GERMAN et al., 2007).

Classificação e funções dos lipídeos

Os estudos lipidômicos objetivam conhecer o máximo possível das espécies lipídicas que compõem um dado sistema biológico. A compreensão de um lipidoma necessita do conhecimento dos vários grupos de metabólitos que podem existir (Figura 1.2), e a diversidade química inerente a esses compostos fazem com que as amostras biológicas apresentem uma elevada complexidade.

FIGURA 1.2. Principais classes lipídicas que podem constituir um lipidoma.

FONTE: Autoria própria.

Os lipídeos são moléculas com múltiplas interações, desde as intermoleculares até ligações covalentes. Um esqueleto lipídico é tipicamente formado por glicerol combinado a várias cadeias alifáticas ou até mesmo em conjuntos à uma cabeça normalmente hidrofílica, os fosfolipídeos, por exemplo. A diversidade biológica desses compostos, permite as mais variadas funções, como: membrana, armazenamento, sinalização celular, mensageiros intracelulares, energético, entre outros (NELSON e COX, 2014).

Os glicerofosfolipídeos (GPs) constituem como um dos principais componentes das membranas biológicas (PAYRASTRE et al., 2001), responsável por funções de mensageiros ou precursores de outros mensageiros, envolvidos ainda em sinalização celular. São lipídeos caracterizados por serem formados por dois ácidos graxos unidos por uma ligação do tipo éster ao primeiro e segundo carbono do glicerol, e um grupo polar ou ionizado ligado ao terceiro carbono através de uma ligação fosfodiéster (NELSON e COX, 2014) que apresentam propriedades quirais e são divididos em subclasses de acordo com o tipo de terminação hidrofílica (Tabela 1.1).

TABELA 1.1. Classes, abreviatura internacional e esqueleto químico de alguns fosfolipídeos representativos.

Nome	Abreviatura em inglês	Esqueleto químico
Fosfatidilcolina	PC	
Fosfatidiletanolamina	PE	
Plasmalógenos baseados em PE	PE-pl	
Fosfatidilglicerol	PG	
Fosfatidilinositol	PI	
Fosfatidilserina	PS	
Lisofosfatidilcolina	LPC	

FONTE: Autoria própria.

Os triacilgliceróis (TGs), outra classe abundante em amostras biológicas, são formados basicamente por três ácidos graxos, cada um em ligação éster com um carbono da molécula de glicerol. São lipídeos envolvidos principalmente nos processos de estocagem energética, e os compostos que apresentam o mesmo tipo de ácido graxo em todas as três posições são chamados de triacilgliceróis simples (Figura 1.3).

FIGURA 1.3. Representação de um triglicerídeo simples, o triacilglicerol, formado a partir do ácido esteárico e glicerol.

FONTE: Autoria própria, utilizando o software ChemSketch (ACD Labs).

Os esfingolípídeos, por sua vez, constituem-se como um complexo conjunto de compostos que apresentam uma estrutura similar entre si (Tabela 1.2). Possuem uma base esfingóide no seu esqueleto, o qual é sintetizado a partir de uma serina e um ácido graxo de cadeia longa Acil-CoA e então convertidos em ceramidas, fosfoesfingolípídeos, glicosfingolípídeos e várias outras espécies, inclusive espécies protéicas (RAPAKA et al., 2005; ZEHETHOFER e PINTO, 2008). Quanto às suas funcionalidades, têm desempenhado papel estrutural em membranas celulares, e atuam também como moléculas sinalizadoras de crescimento, diferenciação e apoptose (BARTKE e HANNUN, 2009).

TABELA 1.2. Classes, abreviatura internacional e esqueleto químico de alguns esfingolipídeos representativos.

Nome	Abreviatura em inglês	Esqueleto químico
Ceramida	CER
Glicosilceramida	GlcCer
Lactosilceramida	LacCer
Esfingomielina	SM
Dihidroesfingomielina	DihSM
Esfinganina	SPA
Esfinganina – 1 - fosfato	SPA1P
Esfingosilfosforilcolina	SPC
Esfingosina	SPH
Esfingosina – 1 - fosfato	S1P

FONTE: Autoria própria.

A categoria dos esteróides é subdivida com base em funções biológicas. O colesterol e seus derivados, são amplamente estudados e constituem-se como importantes componentes da membrana, juntamente com os glicerofosfolipídeos e esfingomielinas (SCHILLER et al., 2004). Além disso, apresentam papéis biológicos hormonais e de sinalização (GERSZTEN e

WANG, 2008). Na Figura 1.4 é representada uma estrutura do colesterol como exemplo dessa classe.

FIGURA 1.4. Estrutura química do colesterol, exemplificando a classe dos esteróides.

FONTE: Autoria própria, utilizando o software ChemSketch (ACD Labs).

Os ácidos graxos compreendem a uma classe lipídica caracterizada por uma cadeia carbônica alifática contendo uma terminação com ácido carboxílico, variando o comprimento, ramificação e saturação da cadeia (Figura 1.5). São metabólitos formados através do prolongamento da cadeia de um acetil-CoA iniciada com grupos malonil-CoA, sendo os ácidos graxos livres produzidos geralmente a partir da hidrólise de outros compostos lipídicos, como os triglicerídeos e fosfolipídeos (NELSON e COX, 2014).

FIGURA 1.5. Estrutura química de um ácido graxo, nesse exemplo o ácido linoléico

FONTE: Autoria própria, utilizando o software ChemSketch (ACD Labs).

Essa classe de lipídeos além de serem derivados de biomoléculas maiores, também podem estar na sua forma livre desempenhando diversas funções. São componentes extremamente importantes em reações do sistema imunológico tanto em humanos quanto em animais, em condições saudáveis ou patológicas. Têm sido associados a múltiplas doenças humanas, inicialmente com desordens metabólicas como diabetes, obesidade ou resistência à insulina e até patologias carcinogênicas (HIRASAWA et al., 2005; BODEN 2008; KAHN et al., 2006).

1.2 Importância da lipidômica e sua relação com o câncer

Os lipídeos desempenham valiosas funções em processos biológicos e fisiopatológicos, como funções celulares, armazenamento de energia, transporte protéico e componente da membrana celular (DORIA et al, 2013).

A diversidade funcional é importante na manutenção adequada da homeostase celular nos organismos vivos, sendo que qualquer alteração na sua funcionalidade pode induzir a graves processos patológicos, como algumas doenças crônicas, por exemplo: diabetes, câncer, artrite, doenças neurodegenerativas e infecciosas (BROWN e MARNETT, 2011; WEIJERS, 2012).

Dessa forma, para a melhor compreensão da maneira como essa classe de biomoléculas se relaciona com determinadas disfunções, o papel biológico das espécies lipídicas e como se correlacionam necessita ser investigado. As origens das alterações metabólicas fornecem importantes “insights” para o desenvolvimento de diagnósticos e de tratamentos. A lipidômica pode abranger explicações bioquímicas da maneira como eles se correlacionam entre as classes, alterando ou não rotas biológicas relacionadas a determinadas disfunções.

Relacionando com o câncer por exemplo, esse é um conjunto de doenças que representa um dos problemas de saúde pública mais relevantes atualmente, sendo uma preocupação mundial. Embora a medicina tenha alcançado um avanço significativo nas últimas décadas no âmbito de diagnóstico e prognóstico dessas doenças, a busca por novos sinalizadores para diagnóstico são de extrema importância. A busca incessante por novos biomarcadores se destaca devido à grande heterogeneidade entre vários tipos de tumores relacionados a um determinado evento oncogênico. Essa natureza heterogênea é responsável por explicar a falta de biomarcadores específicos que possam diagnosticar determinado tipo de câncer com 100% de precisão.

Assim, diversas estratégias podem ser utilizadas para desenvolver estudos que visem encontrar biomarcadores para o diagnóstico preciso de doenças, e a interação entre as abordagens metabolômicas e proteômicas, e mais recentemente a lipidômica, uma subdivisão da metabolômica, vêm crescendo substancialmente e tem colaborado para o entendimento e melhores definições moleculares que compõem diversas patologias (FERLAY et al., 2015; BANDU et al., 2016; SZÁSZ et al., 2017).

1.3 Câncer de mama

Mundialmente, o câncer de mama é a mais frequente neoplasia e uma das principais causas de morte em mulheres. No Brasil, foi estimado para 2017 cerca de 57.960 novos casos de câncer de mama, representando 28% de todos os outros tipos possíveis de neoplasias acometidos em mulheres (INCA-2017). Dessa forma, a investigação em busca de novos biomarcadores para essa doença é de suma importância, favorecendo melhores diagnósticos, prognósticos e possibilidades terapêuticas.

Nagahashi e colaboradores investigaram a importância de esfingolípídeos na progressão do câncer de mama, tendo como objetivo determinar os níveis de esfingolípídeos, incluindo ceramidas e outras subclasses. Compararam tecido canceroso com tecido normal utilizando cromatografia líquida de alta eficiência hifenizada com espectrometria de massas sequencial (LC-ESI-MS/MS, sigla em inglês) onde conseguiram demonstrar que o nível de esfingolípídeos em tecido tumoral apresentou-se significativamente maior que no tecido normal. No entanto, os autores relataram que estudos mais aprofundados devem ser realizados para que as subclasses sejam melhores avaliadas, o estudo apresenta grande contribuição para a área (NAGAHASHI et al., 2016).

Em outro estudo, Matos do Canto et al. realizaram análises metabolômicas em fluido ductal de mama com tumor e sem tumor como controle. Utilizaram LC-MS com técnica de análise onde obtiveram 1560 íons no modo positivo e 538 no modo negativo, e após análises estatísticas identificaram 209 e 83 íons nos modos positivos e negativos, respectivamente. Os metabólitos identificados incluíram derivados de aminoácidos e produtos de metabolismo lipídico, como LPC, PG e PS. Este foi o primeiro estudo envolvendo fluido ductal mamário como amostra, indicando a grande variação lipídica que pode ocorrer em regiões próximas ao tumor (MATOS DO CANTO et al., 2016).

Neste presente estudo analisou-se o perfil lipídico de amostras de plasma e fluido peritoneal ascítico de tumor de Ehrlich para posteriores comparações. Uma visão geral de possíveis biomarcadores lipídicos para câncer de mama está listada na Tabela 1.3, bem como seu tipo de alteração.

TABELA 1.3. Lista de alguns lipídeos envolvidos em câncer de mama, onde “X” significa que podem estar superexpressa (*up*) ou subexpressa (*down*) com relação às amostras controle. GPL (glicerofosfolípideo); FA (ácido graxo) e SL (esfingolípideo).

Classe de lipídeo	Nome	Tipo de amostra	<i>Up</i>	<i>Down</i>	Referência
GPLs, SLs	PC PE PI	tecido	X	–	HILVO et al., 2011
GPLs	SMs PC (34:1)	tecido	X	–	KANG et al., 2011
Palmitoil carnitina, estearoil carnitina GPLs, SLs	PC(16:0/16:0) PC(16:0/18:1) PC(18:1/18:1) PC(18:0/18:1) PC(16:0/22:1) SMd(18:1/16:0)	tecido	X	–	CHUGHTAI et al., 2013
GPLs	PI(18:0/20:4)	urina	–	X	MIN et al., 2010
GPLs	PS (18:1/18:1 18:2/18:0)	urina	X	–	MIN et al., 2010
GPLs	PI (18:0/18:1) PI (18:0/20:3)	tecido	X	–	KAWASHIMA et al., 2013
GPLs	PCs PI (22:5/18:0) PI (18:0/18:1)	linhagem celular	X	X	DÓRIA et al., 2013
GPLs	PS (18:0/20:4) PI (18:0/20:4) PC (18:0/20:4)	linhagem celular	X	–	KIM et al., 2016
GPLs	PIs PEs PCs LPCs	tecido	X	–	CÍFKOVÁ et al., 2015
GLs	TGs contendo C18:1	soro	–	X	HILVO et al., 2014
FAs	Ácido linoléico	soro	–	X	WEI et al., 2013

FONTE: Autoria própria.

1.4 Modelo animal de tumor de Ehrlich

Para a realização deste estudo foram utilizados camundongos com tumor de Ehrlich induzido, descrito em 1905 (EHRlich e APOLANT, 1905). Este tumor trata-se de uma neoplasia originária de carcinoma mamário de camundongos fêmeas. O tumor de Ehrlich geralmente é transplantado para a região peritoneal de camundongos, sendo mantido em

função de sucessivas repicagens. Esses repiques são realizados através de células tumorais de Ehrlich, que apresentam características primárias de células tumorais mamárias, o qual se desenvolve em um curto prazo em camundongos. O tumor pode ser sólido ou ascítico dependendo do modo de inoculação, no modo subcutâneo e intraperitoneal, respectivamente. O crescimento tumoral pode ser controlado através da dosagem de células implantadas, permitindo um controle preciso do experimento.

1.5 Análise lipidômica no modo *shotgun*

A abordagem lipidômica *shotgun* é similar a outros métodos de espectrometria de massas (MS) e compreende resumidamente nas seguintes etapas: *i*) geração de íons da amostra biológica, *ii*) sua separação em relação à massa/carga (m/z) e *iii*) a detecção da forma desejada.

A principal característica nesse modo de análise é que as amostras enriquecidas com lipídeos são diretamente ionizadas por técnicas brandas de ionização, normalmente por *electrospray*, que em alguns casos pode estar no seu formato nano ou convencional (nESI ou ESI, respectivamente), e a discriminação dos íons é obtida através da espectrometria de massas após uma pré-separação comumente realizada por cromatografia líquida (LC) (HAN et al., 2012). Essa abordagem para obtenção do lipidoma permite uma comparação, com elevada sensibilidade, robustez da instrumentação e facilidade de manuseio (BRÜGGER et al., 1997).

Detecção lipídica por espectrometria de massas (MS)

A espectrometria de massas é uma técnica analítica em que moléculas de uma determinada amostra são transformadas em íons no estado gasoso, os quais são separados de acordo com sua razão massa (m) e carga (z), normalmente representado por m/z .

As principais etapas que ocorrem em um espectrômetro de massas são: *i*) formação de íons em fase gasosa; *ii*) aceleração dos íons através da formação de um campo elétrico; *iii*) separação dos íons de acordo com suas razões m/z e; *iv*) detecção desses íons (WILSON e WALKER, 2010). Um esquema geral dos componentes de um espectrômetro de massas está representado na Figura 1.6.

FIGURA 1.6. Esquema geral dos componentes de um espectrômetro de massas.

FONTE: Autoria própria

A resolução de massa em um equipamento de MS é uma das características mais importantes, em especial no caso de análise de lipídeos que pode ter uma elevada quantidade de isômeros. O poder de resolução de um espectrômetro de massas pode ser dado pela fórmula a seguir:

$$R_s = \frac{m}{\Delta m_{FWHM}}$$

Onde m é a razão massa carga (m/z) e Δm_{FWHM} é a diferença de massa entre a largura total e a metade do pico. (MIKKELSEN e CORTON, 2016).

Através da alta resolução de massas e fragmentos de massas sequencial (MS/MS), a identificação de lipídeos pode ser tornar possível, porém não confirmatória na ausência de padrões autênticos ou softwares específicos para identificação dessa classe de biomoléculas. Sendo assim, softwares livres como LipidMaps, Metlin, HMDB e KEGG podem auxiliar na identificação putativa desses compostos.

Além da capacidade de resolução, a precisão da massa é outro fator de importância em espectrometria de massas. Corresponde ao desvio de massa detectada e a massa real de um determinado composto, e geralmente é expressa em partes por milhões, conforme a fórmula a seguir:

$$\text{Precisão de massa} = \frac{\Delta m}{m} \times 10^6$$

Onde m é a massa (m/z) teórica do composto e Δm é a diferença entre a massa observada e a massa teórica (MIKKELSEN e CORTON, 2016).

Os lipídeos apresentam perfis de fragmentação específicos que variam conforme as suas estruturas químicas e subclasses, e auxiliam na confirmação estrutural. Na Tabela 1.4 estão indicados alguns fragmentos para determinados subclasses de lipídeos para a classe de glicerofosfolipídeos (CAJKA e FIEHN, 2014; WICKRAMASEKARA et al., 2013).

TABELA 1.4. Principais íons (m/z) observados para diferentes subclasses de glicerofosfolipídeos.

Subclasse de lipídeo	Fragmento de massa (Da)	Fragmento
PA	153	Fosfato de glicerol $-H_2O$
PC	184	Fosfocolina
PE	196	Glicerol fosfoetanolamina $-H_2O$
PG	153	Fosfato de glicerol $-H_2O$
	227	Glicerol fosfoglicerol $-H_2O$
PI	153	Fosfato de glicerol $-H_2O$
	241	Fosfato de inositol cíclico
PS	153	Fosfato de glicerol $-H_2O$
	87 (perda neutra)	Serina

FONTE: Autoria própria.

Analizador de massas por tempo de voo (*Time-of-flight mass spectrometry – QToF*)

O espectrômetro de massas com analisador do tipo QToF é classificado como um equipamento híbrido que combina o compartimento de filtro quadripolar com o analisador de massas por tempo de voo. Na Figura 1.7 encontra-se o esquema do analisador em questão. Uma tensão alternada de radiofrequência (RF) e tensão constante são aplicadas formando um campo elétrico que seleciona certos íons m/z chegar ao compartimento quadripolar, os quais são selecionados e então fragmentados.

Os íons resultantes são então direcionados para entrarem no compartimento do analisador de massas do tipo ToF, os quais “viajam” através do tubo. Uma vez que nesse compartimento não há campo elétrico ou magnético, os íons utilizam-se de suas energias cinéticas anteriormente adquiridas e então são separados em relação à sua relação m/z , onde os íons mais leves terão uma velocidade maior em relação aos mais pesados.

O “tempo de voo” através do compartimento então é extraído pelo equipamento e, em contrapartida, seu valor de m/z é deduzido. Esse equipamento deve ser calibrado externamente para que a precisão de massas seja mantida constante e preserve sua alta resolução. No modo MS/MS, a faixa de m/z de interesse é selecionada em Q1 e somente esses íons passam pelo compartimento de colisão para então serem fragmentados e analisados pelo ToF. Na análise de lipídeos é necessário a realização de experimentos MS/MS devido a possibilidade de identificação em função de seu perfil de fragmentação (LACORTE e FERNANDEZ-ALBA, 2006).

No presente estudo foi utilizado o equipamento do modelo *micrOTOF-Q II*TM ESI-Qq-TOF (Bruker), que possui uma resolução de massa maior de 10.000 e uma precisão de massa menor que 2 ppm (LACORTE e FERNANDEZ-ALBA, 2006).

FIGURA 1.7. Esquema geral do espectrômetro de massas do tipo QToF.

FONTE: LACORTE e FERNANDEZ-ALBA, 2006.

1.6 Ferramentas estatísticas aplicadas em estudos Ômicos

Nos estudos “ômicos” utiliza-se técnicas sofisticadas de análise, denominadas de técnicas “*high throughput*” capazes de fornecer uma quantidade enorme de dados, em geral incluindo dados espectrais de “*full scan*” e MS/MS. Dessa forma, devido à complexidade dessas informações, ferramentas estatísticas têm sido utilizadas com o intuito do desenvolvimento de modelos multivariados que consigam decompor esses dados e fornecer

respostas comparativas entre eles, permitindo a obtenção de possíveis sinalizadores que são responsáveis pela diferença entre grupos em um determinado estudo em busca de biomarcadores.

Normalmente aliado a diferentes abordagens analíticas, as ferramentas estatísticas visam avaliar as diferenças entre grupos, tanto estatística univariada, podendo ser paramétrica ou não-paramétrica como teste t ou Mann Whitney, respectivamente, ou estatísticas multivariadas. Os métodos de análises multivariadas procuram maximizar as diferenças entre os diferentes grupos, e provavelmente as técnicas mais utilizadas na área de ômicas são: PCA (*principal component analysis* – análise de componentes principais), PLS-DA (*partial least squares projection - discriminant analysis* - projeção de mínimos quadrados parciais - análise discriminante) e OPLS-DA (*orthogonal projections to latent structures discriminant analysis* - projeções ortogonais para estruturas latentes - análise discriminante) (BARTEL et al., 2013).

A PCA representa um modelo não supervisionado de análise, que explica a variância e correlação dentro do conjunto de dados utilizando um número menor de componentes principais (PCs) simultaneamente correlacionadas. Considerando dados de metabolômica, essas PCs são vetores da contribuição dos metabólitos em gerar determinada correlação entre os grupos.

Por outro lado, os métodos de regressão, como o PLS-DA e o OPLS-DA são métodos supervisionados de análise, a qual decompõe o conjunto de dados de modo a realizar predições em relação à classificação das amostras, ou seja, são de certa forma associados à pertencerem à uma classe ou outra de acordo com sua classificação pré-definida, o que maximiza a discriminação entre os grupos fornecendo assim os principais responsáveis por tal, levando à possibilidade de descoberta de novos biomarcadores (WORLEY e POWERS, 2012).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Investigar o lipidoma utilizando LC-MS do modelo animal de Ehrlich, um adenocarcinoma de glândula mamária originário de camundongos fêmeas, visando a compreensão metabólica inédita desse modelo animal, sendo neste capítulo discutido sobre a abordagem lipidômica *shotgun* utilizada no trabalho, compreendido das seguintes etapas:

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Induzir o tumor de Ehrlich em camundongos *Swiss* e otimizar a coleta das amostras de interesse (plasma e fluido peritoneal ascítico/tumor);
- ✓ Obter um método para lipidômica *untarget* utilizando LC-QToF MS para análise de plasma e fluido peritoneal ascítico/tumoral advindos de camundongos fêmeas *Swiss*;
- ✓ Utilizar estratégias estatísticas univariadas e multivariadas para o tratamento de dados de forma a identificar possíveis biomarcadores responsáveis pela discriminação entre os grupos;
- ✓ Correlacionar os metabólitos significativos entre os grupos em estudo.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais utilizados nos experimentos

Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP – *Campus* de Araraquara, em parceria com o presente trabalho.

Os camundongos *Swiss* foram mantidos em gaiolas de polycarbonato, com água e ração (Purina) em local climatizado, (23 ± 2 °C, $56 \pm 2\%$ de umidade relativa do ar), com controle de fotoperíodo a cada 12 h. Todos os procedimentos com animais foram conduzidos conforme parecer do Comitê de Ética (CEUA/FCF/CAR: 09/2016- Anexo I). A limpeza das gaiolas foram realizadas a cada 2 dias.

3.2 Inoculação e manutenção da linhagem celular tumoral nos camundongos

A manutenção das células tumorais foi realizada através de repiques semanais em camundongos receptores. O tumor em estudo se deu na forma ascítica, onde 200µL de 1×10^7 células tumorais/mL em RPMI-1640 foram injetados intraperitonealmente, após a assepsia local com álcool iodado, em camundongos com 7 semanas de vida.

3.3 Estudo lipidômico

Anteriormente ao experimento com maior número de animais, testes pilotos contendo dois grupos (n=3) foram realizados para a otimização da coleta das amostras, tanto de sangue quanto de fluido peritoneal tumoral.

Após a realização desses testes o experimento contendo maior representatividade da comunidade de camundongos foi realizado. Para tal, foram selecionados 20 camundongos fêmeas da linhagem *Swiss* de seis semanas, pesando entre 23 e 29 g. Esses animais foram divididos em 2 grupos (n=10): o primeiro grupo (D) foi representado pelos animais que tiveram a indução do tumor de *Ehrlich* ascítico através da inoculação, conforme descrito no item 2.2; o segundo grupo (N) foi o grupo controle, em que o mesmo procedimento foi realizado, porém utilizando PBS (tampão fosfato salino) estéril como placebo, com intuito desses animais serem submetidos ao mesmo estresse experimental que o grupo anterior.

Assim, após 7 dias de desenvolvimento do tumor, os animais foram submetidos à coleta de sangue através de punção cardíaca e do fluido peritoneal. Foram padronizados os volumes para coleta, sendo 1 mL de sangue e 2 mL de fluido peritoneal tumoral. No caso do Grupo N, ao invés da coleta do fluido peritoneal, foi realizada a injeção de 3 mL de PBS

estéril na região intraperitoneal e posterior coleta de 2 mL desse tampão, sendo utilizado como controle.

3.4 Obtenção das amostras para análise lipidômica

3.4.1 Preparo das amostras de plasma e fluido peritoneal

A coleta de 1 mL de sangue foi realizada com um tubo de coleta de sangue de 2 mL contendo EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) como anticoagulante. O material após ser retirado por punção cardíaca foi então depositado no tubo contendo EDTA e agitado por 10 vezes de forma cautelosa. Em seguida, o sangue foi transferido para tubos do tipo Eppendorf® e centrifugados a uma rotação de 900 g por 10 min a 4 °C. Após esse procedimento, 400 µL de plasma foi então coletado para um novo tubo Eppendorf® e o restante devidamente descartado. As amostras de plasma foram preservadas em um freezer -80 °C até sua utilização.

Para o fluido peritoneal tumoral, foi realizada apenas a centrifugação para decantação do material suspenso, utilizando 900 g por 15 min a 4 °C e recolhido o sobrenadante desse material.

3.4.2 Preparo dos extratos lipídicos

Os lipídios foram extraídos de amostras de plasma e de fluido peritoneal através do protocolo adaptado de BLIGH e DYER, 1959. Foram utilizados 50 µL de amostra (plasma ou fluido peritoneal) acrescidos de 380 µL de uma solução de clorofórmio/metanol (1:2 v/v). Após isso, a mistura foi agitada em vórtex por 20 s e então adicionados 200 µL de uma solução de clorofórmio/água (1:1 v/v) e assim o conteúdo foi misturado novamente por 1 min. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 2000 g durante 5 min a 4 °C, e uma alíquota de 100 µL da porção lipofílica (porção inferior do tubo) foi removida, seca com gás inerte de N_{2(g)} e preservada em freezer -80 °C até sua utilização. Esse procedimento foi realizado para todas amostras, tanto plasma quanto fluido peritoneal tumoral.

Para as análises por LC-MS as amostras foram ressuspensas em isopropanol:acetonitrila (1:1 v/v). Foram preparados QCs (*Quality Control*) através da mistura de um mesmo volume de 15 µL de todas as amostras.

3.4.3 Preparo do mix de padrão de ácidos graxos não esterificados

Um mix de 38 ácidos graxos GLC-566 (Nu-Check-Prep Inc., Elysian, MN, USA) foi preparado da seguinte forma: um total de 183,7 mg de GLC-566 foi dissolvido em 10 mL de

metanol. Uma alíquota de 1 mL dessa solução foi diluída com 9 mL de metanol, obtendo assim uma concentração de 49 – 509 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de cada ácido graxo (Lista em ANEXO II).

3.5 Análises por cromatografia líquida – espectrometria de massas

3.5.1 Separação cromatográfica

As separações cromatográficas foram realizadas em uma coluna C18 (octadecilsilano) *Thermo Scientific Accucore* (150×21mm, 2,6 μm de tamanho de partícula) mantida à uma temperatura de 50°C e vazão da fase de móvel de 250 $\mu\text{L min}^{-1}$, sendo o equipamento utilizado um HPLC PROMINENCE (Série 20A; Shimadzu, Kyoto, Japão). As fases móveis consistiram de (A) água desionizada e (B) acetonitrila. Na polaridade negativa não houve nenhum acréscimo de aditivo e na polaridade positiva houve o acréscimo de 0,1% v/v de ácido fórmico. Um gradiente binário de 60 a 98% de B foi utilizado para o modo positivo totalizando 70 min de corrida e para o modo negativo um gradiente de 70 a 98% de B totalizando 28 min de corrida. O volume de injeção foi de 5 μL . Todos os solventes utilizados foram grau LC-MS, variando entre as marcas J.T Baker e Sigma Aldrich.

3.5.2 Espectrometria de massas

A análise foi realizada por espectrometria de massas utilizando equipamento da Bruker[®], modelo *micrOTOF-Q II*TM ESI-Qq-TOF (híbrido quadrupolo com tempo de voo – *time of flight*), o qual possibilitou a aquisição simultânea de dados operando no modo de varredura completa *full scan* (100 a 2000 m/z) tanto na polaridade negativa quanto positiva. Esse sistema apresenta dois analisadores de massas em sequência (*tandem*), o qual possibilitou a obtenção de dados no modo auto MS/MS. Os parâmetros utilizados no MS foram:

- Calibrantes para o sistema os íons de m/z 121,0508 e m/z 922,0097 para o modo positivo e os íons de m/z 112,9856 e de m/z 966,0007 para o modo negativo;
- Voltagem do capilar: 4,5 kV;
- Energia de colisão (Dissociação induzida por colisão (CID – *Collision Induced Dissociation* inglês)): 40 eV
- Pressão do gás nebulizador (N_2): 4 bar
- Vazão do gás secante (N_2): 8 L min^{-1}
- Temperatura da fonte de íons: 200 °C

3.6 Análise de dados e identificação de metabólitos

Os dados brutos por LC-MS/MS foram adquiridos utilizando o *software Compass DataAnalysis 4.0* (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). Os cromatogramas para cada amostra consistiram de muitas bandas cromatográficas, os quais foram devidamente reconhecidos em tempo de retenção e intensidade m/z . Os conjuntos de dados foram convertidos para o formato **.mzData* utilizando o mesmo *software* de aquisição e pré-processados utilizando o *software* livre MZmine 2.27 seguindo as seguintes etapas: detecção de massas, construção dos cromatogramas, desconvolução e alinhamento.

Após o alinhamento aplicou-se a ferramenta *gap filling*, um algoritmo que seleciona as regiões de m/z 's que não foram identificados nos grupos, o qual analisa novamente o dado e integra essas regiões, resultando na minimização dos *missing values*.

A planilha de dados foi obtida no formato .txt, onde os pontos foram substituídos por vírgula e os dados foram então pré-processados utilizando o Excel (Microsoft Office 2013), sendo calculados os coeficientes de variação (CV) em relação às amostra de QCs. Todos os *molecular features* com $CV > 30\%$ foram então eliminados, em seguida a matriz foi submetida ao escalamento de Pareto, importante em metabolômica uma vez que minimiza o mascaramento dos picos de menor intensidade pelos que possuem maior intensidade, os quais podem apresentar relevância biológica (VAN DEN BERG, 2006).

Após o pré-processamento, os dados foram então submetidos à análises multivariadas não-supervisionada (PCA) para predição dos QCs e também não-supervisionada (PLS-DA e OPLS-DA), utilizando o *software* SIMCA-P+ 13.0.3 (Umetrics). Além disso, uma parte dos modelos foram construídos utilizando o *software* online *MetaboAnalyst* (<http://www.metaboanalyst.ca/>). Os metabólitos discriminantes das classes foram selecionados nos modelos de PLS-DA através dos *Variable Importance in Projection* (VIP), onde foram considerados $VIP\ score > 1,0$.

A identificação dos lipídeos estatisticamente significativos foi realizada através de bancos de dados gratuitos, *Lipid Maps Search* (<http://www.lipidmaps.org/>) e confirmados pela base de dados *Human Metabolome Database – HMDB* (<http://www.hmdb.ca/>) e *Metlin – Scripps Center for Metabolomics* (<http://metlin.scripps.edu>).

A identificação foi realizada após a construção dos modelos multivariados e extração dos *molecular features* relevantes na separação entre os grupos, onde o erro (teórico e experimental) máximo permitido foi de 10 ppm.

Após a identificação putativa dos *features* relevantes, a importância biológica dos mesmos foi obtida utilizando o software *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* – KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>) e a ferramenta do software *online MetaboAnalyst 3.0 Pathway Analysis*, a qual possibilita explorar a correlação entre as rotas e seu impacto no organismo em estudo.

Um esquema detalhado do tratamento de dados pode ser melhor visualizado no Anexo III desta tese.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir serão apresentados os resultados das análises comparativas entre amostras de plasma referentes a animais com tumor de Ehrlich induzido e controle; bem como as análises comparativas entre plasma de camundongos com tumor de Ehrlich induzido e fluido peritoneal de Ehrlich.

Neste trabalho foram utilizadas amostras de plasma de camundongos com tumor de Ehrlich induzido com 7 dias após inoculação. O interesse foi utilizar amostras do líquido peritoneal com grande atividade proliferativa, uma vez que a obtenção de possíveis iniciadores da inflamação é maior, ou seja, a possibilidade de obter marcadores no início do desenvolvimento da doença é maximizado.

Estudos comprovaram esse argumento justificando que com 7 dias de inoculação do tumor o ambiente ainda apresenta boa capacidade nutricional, espaço e condições propícias para multiplicação celular. Silva e colaboradores realizaram um estudo comparativo e demonstraram que o tumor de Ehrlich com um período de 14 dias de desenvolvimento apresentou células neoplásicas com comportamento de “desestimulação”, possivelmente gerado pela diminuição nutricional e competição por espaço. Dessa forma com o intuito de utilizar um modelo que pudesse mimetizar as condições precoces da doença, optou-se em realizar os experimentos com 7 dias após inoculação das células tumorais (CALIXTO-CAMPOS et al., 2013 e SILVA et al., 2006).

4.1 Análise comparativa de lipídeos presentes em plasma de camundongos com tumor de Ehrlich induzido e controle

4.1.1 Análises realizadas por LC-MS em ionização negativa

Anterior ao uso do método cromatográfico estabelecido para este estudo, utilizando um gradiente de água e acetonitrila, foi testado um método utilizando isopropanol como componente B da fase móvel, uma vez que aditivos poderiam melhorar a ionização dos lipídeos. Porém, não foram obtidos bons cromatogramas e quantidades de bandas cromatográficas satisfatórias. Assim, optou-se por utilizar o método que apresentou maior número de informações cromatográficas, nesse caso o gradiente utilizando água e acetonitrila como componentes da fase móvel (conforme especificado no tópico 3.5.1 deste capítulo).

Os extratos enriquecidos em lipídeos foram preparados a partir da extração de amostras de plasma utilizando o método de BLIGH e DYER (1959), este método é bastante eficaz em isolamento da maioria das classes de fosfolipídeos, lipídeos neutros e esfingolipídeos, classes de lipídeos com relatos de serem potenciais biomarcadores para câncer, em especial para câncer de mama (PODO et al., 2007).

Na Figura 1.8 está representado o perfil de todas amostras de plasma analisadas na polaridade negativa. Nesse caso, os cromatogramas representam os dados brutos, anterior à etapas de pré-processamento, desconvolução e alinhamento.

FIGURA 1.8. Sobreposição de cromatogramas de íons totais (TIC) das amostras de plasma referentes ao camundongos com Ehrlich induzido e controle, antes das etapas de processamento (modo negativo).

FONTE: Autoria própria, utilizando o software MZmine.

A otimização dos parâmetros de processamento no MZmine é de extrema importância para a obtenção do máximo de informações relevantes referentes aos cromatogramas. A desconvolução é uma etapa que se destaca, uma vez que nesse processo são separadas e identificadas todas as massas que compõem uma determinada banda cromatográfica com diferentes tempos, assim parâmetros escolhidos erroneamente pode levar à exclusão de importantes informações presentes no cromatograma.

Dessa forma, o processamento dos dados utilizando o *software* livre MZmine foi realizado em função dos seguintes parâmetros otimizados: i) *filtering – Noise level (mass detection)* – 1500; ii) *Chromatogram builder – Min time span* (0,1) e *Min chromatogram height* (1000); iii) *Chromatogram deconvolution (Chromatogram threshold – 20%) – Min in RT range* (0,3) – *Min relative height* (1500) – *Peak duration* (0,1 – 0,7); iv) *Alignment – m/z*

tolerance (0,05Da) – Retention time tolerance (0,6) – weight for m/z (1) – weight for RT (1), v) gap filling – intensity tolerance (20%) – m/z tolerance (10 ppm).

Sabe-se que a ionização por ESI depende da natureza da molécula e nem sempre está correlacionada diretamente à concentração da mesma, isso significa que um sinal de baixa intensidade dado pelo MS nem sempre é sinônimo de baixa concentração e sim devido à capacidade de ionização desse composto. Dessa forma, o MZmine permite avaliar o quão efetivo foi a desconvolução realizada. Como pode-se observar na Figura 1.9, um exemplo de desconvolução de amostras de plasma no modo negativo.

FIGURA 1.9. Cromatogramas de amostras de plasmas extraídas pelo método de Bligh-Dyer analisadas por LC-MS na polaridade negativa. Exemplo de desconvolução utilizando diferentes parâmetros no MZmine, em A) utilizando 0,1 – 2,5 min para peak duration range e em B) utilizando 0,1 – 3,0 como *peak duration range*, em ambos os casos foi utilizado o algoritmo *noise amplitude* para processamento.

FONTE: Autoria própria, utilizando o software MZmine.

Na Figura 1.9 pode-se perceber como a escolha do *peak duration range* é um importante parâmetro na etapa de desconvolução. Nota-se que em A) a região de 18 a 23 min não foi desconvoluído totalmente, enquanto no cromatograma em B) nota-se a total extração das massas como desejado.

Após todas as etapas de processamento utilizando o MZmine, a matriz de dados foi devidamente exportada para o Excel 2013 (Microsoft Office). Inicialmente os lipídeos com $CV > 30\%$ em relação às amostras de QCs foram eliminados, permitido para bioanálises de amostras complexas em extrato orgânico (WANT et al., 2013). A matriz restante (*features* – m/z e suas áreas) foi então transformada em logaritmo na base 10 ($\log_{10}$), com o intuito de corrigir a heterocedasticidade dos dados.

Em seguida os dados foram pré-processados utilizando o método de escalamento de Pareto, em que esse procedimento reduz a importância de variáveis com intensidades discrepantes em relação aos demais, mantendo a estrutura parcialmente intacta do conjunto de dados (VAN DEN BERG et al., 2006).

Após a etapa de pré-processamento, os dados foram então submetidos à análises multivariadas utilizando o software SIMCA-P+ 13.0.3 (Umetrics). Inicialmente, os dados foram submetidos ao método não supervisionado (PCA – do inglês – *Principal Component Analysis*) incluindo amostras e QCs (Figura 1.10). Nessa fase do processamento puderam-se avaliar possíveis agrupamentos e o comportamento das amostras de QCs em relação aos parâmetros instrumentais e analíticos, como a reprodutibilidade analítica (WANT et al., 2013).

FIGURA 1.10. *Scores plot* do modelo PCA para amostras de plasma de camundongos com tumor de Ehrlich induzido (verde), plasma de camundongos controle (azul) e *Quality Control* (amostras de controle de qualidade – vermelho) $R^2 = 0,415$ $Q^2 = 0,307$ – análises no modo negativo.

FONTE: Autoria própria, utilizando o software SIMCA P.

Nota-se que as amostras de plasma não foram separadas utilizando esse tipo de modelo não supervisionado devido à elevada complexidade da matriz, necessitando de um método supervisionado para que possa maximizar as diferenças. No entanto, foi possível observar que os QCs encontram-se devidamente agrupados, indicando portanto, a reprodutibilidade e consequentemente o bom desempenho do sistema analítico, o que eleva a confiança nos dados obtidos.

Com o intuito de obter alguma separação entre os grupos avaliados, foi empregado então a análise discriminante por quadrados mínimos (PLS-DA – do inglês, *Partial Least Squares Discriminat Analysis*). Este é caracterizado por ser um método supervisionado o qual permite maximizar a separação entre os grupos avaliados e identificar através dos valores de VIPs quais metabólitos se encontram alterados e classificá-los como possíveis biomarcadores, dependendo dos demais parâmetros estatísticos.

Na Figura 1.11 encontra-se o modelo de PLS-DA construído com as amostras de plasma no modo negativo, trata-se de um modelo supervisionado que tenta encontrar a decomposição ideal da matriz do conjunto de dados. O PLS-DA relaciona a matriz de dados ao vetor de resposta utilizando um modelo de regressão linear, bastante utilizado para classificação, onde se concentra em maximizar a discriminação entre grupos/classes pré-definidos (FONVILLE et al., 2010). Para esse modelo foram realizados testes com 100 permutações, demonstrado na Figura 1.12.

FIGURA 1.11. Scores plot do modelo PLS-DA para amostras de plasma de camundongos com tumor de Ehrlich induzido (verde), plasma de camundongos controle (azul) $R^2X = 0,470$, $R^2Y = 1,00$ e $Q^2 = 0,828$ - análises no modo negativo.

FONTE: Autoria própria, utilizando o software SIMCA P.

FIGURA 1.12. Testes de 100 permutações do modelo PLS-DA das amostras de plasma de camundongos com tumor de Ehrlich induzido e plasma de camundongos controle - análises no modo negativo.

FONTE: Autoria própria, utilizando o software SIMCA P.

Em um teste de permutação os “rótulos” das classes são permutados e designados de forma aleatória para diferentes classes, como são erroneamente designados, a lógica do teste é que as classes não sejam previstas, levando então à não discriminação entre as amostras. Dessa forma, obtém-se coeficientes estatísticos ruins, uma vez que valores de R^2 e Q^2 devem ser idealmente menores que o modelo original (GOLLAND et al., 2005).

A vantagem do teste de permutação é que a hipótese alternativa baseia-se em modelos com o mesmo número de amostra, permanecendo as mesmas variações, *outliers* e dados faltantes, podendo ser diretamente comparado ao resultado do modelo original (WESTERHUIS et al., 2008).

Os dados foram ainda submetidos à análise multivariada utilizando Projeções Ortogonais para Estruturas Latentes com Análise Discriminante (OPLS-DA – do inglês *Orthogonal Projections to Latent Structures Discriminant Analysis*). Essa análise utiliza uma única componente para realizar a classificação, sendo as demais utilizadas para descreverem a variação ortogonal para a primeira componente. Dessa forma, a primeira componente indica diretamente a correlação entre os grupos, e em seguida todas as amostras são projetadas sobre essa componente para determinar os *scores*. Assim, é uma opção bastante valiosa para determinar as diferenças entre grupos e estimar possíveis biomarcadores. O modelo construído para as amostras de plasma no modo negativo está representado na Figura 1.13.

FIGURA 1.13. *Scores plot* do modelo OPLS-DA para amostras de plasma de camundongos com tumor de Ehrlich induzido (verde), plasma de camundongos controle (azul) $R^2=1,00$, $Q^2 = -0,111$ - análises no modo negativo.

FONTE: Autoria própria, utilizando o software SIMCA P.

Observou-se que o modelo de OPLS-DA não apresentou um bom parâmetro Q^2 , o qual indica o poder de predição do método. Entretanto, foi utilizado o modelo de PLS-DA para avaliação dos lipídeos discriminantes, sendo assim selecionados em relação ao valor de $VIP \text{ score}$ ($VIP > 1,5$), relacionado com a relevância de cada variável com o modelo projetado em questão.

Associado aos valores de VIP , a matriz de dados foi também analisada aplicando ferramentas univariadas. Para tal, a matriz foi submetida ao teste de normalidade utilizando o teste de Shapiro-Wilk, o qual revelou que os dados não seguiam uma distribuição normal. Dessa forma, foi utilizado o teste de Mann-Whitney U, teste estatístico não-paramétrico comumente aplicado a duas amostras independentes.

Sabe-se que lipídeos apresentam uma elevada hidrofobicidade, tendo portanto grande interação pela fase estacionária utilizada (C18). Após a construção dos modelos multivariados, e a etapa de identificação ficou evidente que a fase móvel utilizada não foi suficiente para separar e eluir todos compostos lipídicos presentes na amostra.

Diante disso, as análises no modo negativo foram acompanhadas pela presença de grande quantidade de ácidos graxos livres, os quais puderam serem identificados utilizando um mix de padrão de ácidos graxos não esterificados (GLC 566 – contendo C8:0-C24:1).

Na Figura 1.14 está representado o cromatograma de íons extraídos do mix GLC 566 composto por 38 ácidos graxos, sendo detectados 35 deles devido à co-eluição de alguns isômeros.

FIGURA 1.14. Cromatograma de íons extraídos referentes ao mix GLC 566 utilizado na identificação dos ácidos graxos relevantes na discriminação entre os grupos avaliados (Ehrlich e controle) – modo negativo.

FONTE: Autoria própria, utilizando o software *DataAnalysis* (Bruker).

Dessa forma, a identificação dos lipídeos estatisticamente significativos entre as amostras de plasma no modo negativo foi realizada utilizando o mix GLC 566 através da massa, similaridade espectral, tempo de retenção e LipidMaps para confirmação da massa. Nesse conjunto de amostras, através dos dados de VIP em relação ao PLS-DA foram indicados 154 *features* com $VIP > 1,5$, dentre os quais 16 ácidos graxos foram identificados, e com diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$) (Tabela 1.5).

TABELA 1.5. Ácidos graxos estatisticamente diferentes entre as amostras de plasma Ehrlich e plasma controle analisadas por LC-MS e extraídos do modelo PLS-DA – modo negativo.

Ácido graxo	Massa [M-H] ⁻ (Da)	Símbolo	p-valor	Amostras QC %CV	Identificação	Change (PD/PN)
Ácido decanóico	171,1360	C10:0	0,029	21,54	padrão	2,41
Ácido láurico	199,1691	C12:0	0,013	16,84	padrão	1,62
Ácido mirístico	227,2097	C14:0	0,0025	17,03	padrão	0,80
Ácido 14-pentadecenóico	239,0993	C15:1 ω-1	>0,05	17,41	padrão	1,24
Ácido palmitoléico	253,2236	C16:1 ω-7	>0,05	15,96	padrão	0,21
Ácido margárico	255,2385	C17:0	0,0391	17,28	padrão	1,15
Ácido 15-metil-hexadecanóico	269,2467	C17:0 iso	0,007	21,13	padrão	1,21
Ácido α- linoléico ou γ-linoléico	277,2162	C18:3 ω-3	0,0301	18,63	padrão	0,67
Ácido linoléico	279,2454	C18:2 ω-6	0,0025	16,59	padrão	0,89
Ácido vacínico ou Ácido oléico	281,2480	C18:1 ω-7	0,0180	16,03	padrão	1,16
Ácido esteárico	283,2694	C18:0	0,0072	17,88	padrão	1,46
Ácido nonadecanóico	297,2116	C19:0	>0,05	23,39	padrão	0,79
Ácido 5,8,11,14,17 - eicosapenteanóico	301,2162	C20:5 ω-3	0,0204	16,70	padrão	1,16
Ácido araquidônico	303,2416	C20:4 ω-6	0,0036	18,78	padrão	0,25
Ácido 11,14- eicosadienóico	307,261	C20:2 ω-6	>0,05	18,39	padrão	1,85
Ácido gondóico	309,2751	C20:1 ω-9	0,024	17,29	padrão	0,82
Ácido araquídico	311,1645	C20:0	>0,05	20,55	padrão	1,12
Ácido 4,7,10,13,16,19 - docosahexanóico	327,2357	C22:6 ω-3	0,056	19,04	padrão	0,38

TABELA 1.5 (continuação). Ácidos graxos estatisticamente diferentes entre as amostras de plasma Ehrlich e plasma controle analisadas por LC-MS e extraídos do modelo PLS-DA – modo negativo.

Ácido graxo	Massa [M-H]- (Da)	Símbolo	p-valor	Amostras QC %CV	Identificação	% Change
Ácido beénico	339,2041	C22:0	0,039	14,66	padrão	1,26
Ácido tricosanóico	353,1964	C23:0	0,059	19,99	padrão	1,24
Ácido lignocérico	367,2088	C24:0	0,024	14,78	padrão	1,14

FONTE: Autoria própria.

Já foi demonstrado que ácidos graxos são responsáveis por significativas alterações em membranas tumorais, bem como ácidos poli-insaturados substituídos em fosfolipídeos presentes em tecidos neoplásicos (WAITE et al., 1977). Assim, observa-se a concordância dos resultados aqui apresentados com os comumente encontrados na literatura.

Conforme observado na Tabela 1.5, a presença do tumor no organismo do camundongo gerou mudanças nos teores de ácidos graxos presentes no plasma desses animais quando comparado com camundongos controle. Observando-se os ácidos graxos (FA) que apresentaram diferenças estatísticas, foi observado que na maioria dos casos os FAs saturados apresentaram em maiores níveis quando comparados aos FAs insaturados.

Uma atenção especial pode ser dada ao ácido araquidônico, um importante FA envolvido em processos de inflamação e funcionamento de vários órgãos. É o substrato para a síntese de grande quantidade de compostos biologicamente ativos, incluindo prostaglandinas e leucotrienos. A fosfolipase A2 (PLA2) catalisa a hidrólise da posição *sn*-2 dos glicerofosfolipídeos de membrana, liberando o ácido araquidônico. Todavia, devido à grande diminuição dos níveis do ácido araquidônico no plasma de animais com tumor de Ehrlich, pode-se inferir significativa alteração metabólica resultante pela doença.

Além disso, o ácido araquidônico está envolvido em diversas vias metabólicas relevantes, como biossíntese de ácidos graxos insaturados (mapa 01040, KEGG) e regulação do mediador inflamatório dos canais TRP (mapa 04750). Em relação à via metabólica 01040, pode-se considerar que houve considerável alteração metabólica, podendo inferir na diminuição geral dos ácidos insaturados no sistema de camundongos com tumor de Ehrlich induzido, uma vez que a enzima Acyl-CoA envolve a formação da maioria desses ácidos graxos, conforme ilustrado pela Figura 1.15.

Outra importante enzima envolvida no metabolismo de FAs é a stearyl-CoA desaturase, uma enzima envolvida na síntese de ácidos graxos monoinsaturados (MFA) e que já foi reportada sua relação com alguns tumores induzidos geneticamente e quimicamente (FALVELLA et al., 2002). As células do carcinoma ascítico de Ehrlich possuem a enzima $\Delta 9$ desaturase localizada no retículo endoplasmático (MERCURI, 1981). Dessa forma, os resultados aqui apresentados demonstraram um aumento de MFA (ácidos graxos monoinsaturados) no plasma de camundongos com tumor de Ehrlich induzido, reforçando a importante ação das enzimas citadas.

De acordo com PATON e NTAMBI; o aumento do nível de MFA em condições tumorais é necessária para aumentar a fluidez da membrana e proporcionar a estimulação do metabolismo celular, além de favorecer o aumento da taxa de divisão celular, característica intrínseca de células tumorais (PATON e NTAMBI, 2009).

FIGURA 1.15. Esquema da biossíntese de ácidos graxos insaturados.

FONTE: Adaptado de KEGG, disponível em - http://www.genome.jp/keggbin/show_pathway?map01040+C00219, acesso em novembro de 2017.

4.1.2 Análises realizadas por LC-MS com ionização positiva

Na Figura 1.16, está representado o perfil de todas amostras de plasma analisadas na polaridade positiva, nesse caso os cromatogramas representam os dados brutos anteriores às etapas de pré-processamentos (desconvolução e alinhamento).

FIGURA 1.16. Sobreposição de cromatogramas de íons totais (TIC) das amostras de plasma referentes aos camundongos com Ehrlich induzido e controle, antes das etapas de processamento (modo positivo).

FONTE: Autoria própria, utilizando o software MZmine.

Observou-se na Figura 1.16 uma maior quantidade de lipídeos no modo positivo, o que necessitou de um maior tempo de análise para uma melhor separação. As identificações foram realizadas de modo putativo utilizando informações de MS/MS e massa exata através de softwares livres como o Metlin, HMDB, LipidMaps e KEGG.

Os dados foram devidamente processados utilizando o MZmine, conforme etapas já descritas na sessão 4.1.1, e em seguida a matriz de dados foi submetida à transformação com logaritmo na base 10 ($\log_{10}$) e escalada utilizando o método de Pareto para então serem submetidos a análises multivariadas e univariadas.

Inicialmente, foi aplicado um método não-supervisionado (PCA), a fim de explorar o comportamento geral dos dados e avaliação dos controles de qualidade (QCs), como representado no *score plot* na Figura 1.17.

FIGURA 1.17. *Scores plot* do modelo PCA para amostras de plasma de camundongos com tumor de Ehrlich induzido (verde), plasma de camundongos controle (azul) e *Quality Control* (amostras de controle de qualidade – vermelho) $R^2 = 0,638$ $Q^2 = 0,027$ – análises no modo positivo.

FONTE: Autoria própria, utilizando o software SIMCA P.

Analisando-se a PCA entre as amostras de plasma de camundongo com tumor de Ehrlich induzido e plasma de camundongo controle, observou-se um bom agrupamento das amostras de QCs, indicando reprodutibilidade e estabilidade analítica. Notou-se ainda um comportamento diferenciado da amostra PD1, possível *outlier*, referente à um animal com tumor de Ehrlich, que embora externo à elipse de Hotelling com 95% de confiança, foi mantido nas análises supervisionadas uma vez que pode ser indicador de algum lipídeo importante na discriminação entre os grupos.

Conforme esperado, a PCA não foi suficiente para uma discriminação entre os grupos. Dessa forma, os dados foram submetidos ao PLS-DA, um método supervisionado para análise discriminante entre grupos, conforme já discutido anteriormente. Na Figura 1.18 está representado o modelo obtido.

FIGURA 1.18. Scores plot do modelo PLS-DA para amostras de plasma de camundongos com tumor de Ehrlich induzido (verde), plasma de camundongos controle (azul) $R^2X = 0,632$, $R^2Y = 0,999$ e $Q^2 = 0,487$ - análises no modo positivo.

FONTE: Autoria própria, utilizando o software SIMCA P.

O modelo obtido pode ser avaliado como bom, devido aos parâmetros estatísticos obtidos ($R^2X = 0,632$; $R^2Y = 0,999$ e $Q^2 = 0,487$), além da boa separação obtidas entre os grupos. Notou-se que a amostra PD1 ainda se encontra externa à Elipse de Hotelling, porém agrupada pelo lado esquerdo da PLS-DA. Os lipídeos indicativos para separação dos grupos foram selecionados com base no valor de $VIP > 1,2$.

Na Figura 1.19 encontra-se o teste de permutação demonstrando a validade do modelo em relação ao original, uma vez que foi obtido coeficientes estatísticos menores que os originais ($R^2Y = 0,995$ e $Q^2 = 0,360$).

FIGURA 1.19. Testes de 100 permutações do modelo PLS-DA das amostras de plasma de camundongos com tumor de Ehrlich induzido e plasma de camundongos controle (análises no modo positivo).

FONTE: Autoria própria, utilizando o software SIMCA P.

Para esse conjunto de dados, foi utilizado também o OPLS-DA para avaliação discriminatória entre os grupos, a fim de avaliar a capacidade de predição desse modelo através do parâmetro estatístico Q^2 . Na Figura 1.20 encontra-se a representação do OPLS-DA.

FIGURA 1.20. *Scores plot* do modelo OPLS-DA para amostras de plasma de camundongos com tumor de Ehrlich induzido (verde), plasma de camundongos controle (azul) $R^2 = 0,659$, $Q^2 = -0,024$ (análises no modo positivo).

FONTE: Autoria própria, utilizando o software SIMCA P.

Observou-se que, embora a separação entre os grupos tenha sido obtida de forma satisfatória, o parâmetro de predição Q^2 , não apresentou valor considerado bom, que deveria ser $> 0,4$ (WESTERHUIS et al., 2008). Assim, os lipídeos discriminantes no modo positivo foram selecionados para identificação utilizando os dados de PLS-DA, com base nos valores de $VIP > 1,2$.

No total, foram obtidos 146 metabólitos com $VIP > 1,2$ pelo modelo de PLS-DA. No entanto optou-se por considerar possíveis biomarcadores entre os grupos apenas os lipídeos que apresentaram p -valor $< 0,05$. Na Tabela 1.6 estão representados todos os lipídeos considerados significativos na separação entre as amostras dos grupos.

A tentativa de identificação desses lipídeos considerados biomarcadores foi realizada utilizando o *software lipid maps* (<http://www.lipidmaps.org/>) onde a pesquisa foi realizada utilizando a massa exata (m/z) de cada metabólito, sendo a faixa de (1-5 mDa) considerada como diferença aceitável (HAOULA et al., 2015), além da confirmação ter sido obtida pelo *software HMDB* (<http://www.hmdb.ca/>). Na Tabela 6 encontram-se ainda os valores de $VIPs$, p -valor obtido pelo teste de Mann Withney, *fold change* (obtido pela correlação entre as

médias de doentes e controles), o aduto para cada identificação, a diferença de massa em Da na identificação pelo *lipid maps* e a rota biológica envolvida (quando possível).

TABELA 1.6. Tentativa de identificação dos lipídeos significativos entre as amostras de plasma de Ehrlich e controle analisadas no modo positivo.

<i>Features</i> (<i>m/z</i>)	VIP	<i>p</i> -valor	Diferença de massa (Da)	Nome	Fórmula	Aduto	Fold Change PD/PN	Pathways envolvido
808,5830	1,1	$5,39 \times 10^{-2}$	0,0003	PC(36:2)	C ₄₄ H ₈₄ NO ₈ P	[M+Na] ⁺	3,27	Metabolismo dos glicerofosfolípidos Metabolismo do ácido araquidônico Metabolismo do ácido linoléico Metabolismo do ácido alfa-linolênico Metabolismo da colina no câncer
762,5597	1,1	$2,54 \times 10^{-2}$	0,0026	LPC(34:4)	C ₄₂ H ₇₈ NO ₇ P	[M+Na] ⁺	1,15	-
738,5098	1,3	$1,10 \times 10^{-2}$	0,0028	PE(36:5)	C ₄₁ H ₇₃ NO ₈ P	[M+H] ⁺	3,98	Biossíntese de glicosilfosfatidilinositol Metabolismo dos glicerofosfolípidos Autofagia - animal Metabolismo dos glicerofosfolípidos Metabolismo do ácido araquidônico Metabolismo do ácido linoléico Metabolismo do ácido alfa-linolênico Metabolismo da colina no câncer
780,5497	1,3	$5,94 \times 10^{-2}$	0,0043	PC(36:5)	C ₄₄ H ₇₉ NO ₈ P	[M+H] ⁺	0,70	Metabolismo dos glicerofosfolípidos Metabolismo do ácido araquidônico Metabolismo do ácido linoléico Metabolismo do ácido alfa-linolênico Metabolismo da colina no câncer
778,5639	1,5	$2,54 \times 10^{-2}$	0,0081	PE(O-38:3)	C ₄₃ H ₈₂ NO ₇ P	[M+Na] ⁺	3,36	-
709,4938	1,2	$1,91 \times 10^{-2}$	0,0044	PS(O-30:0(OH))	C ₃₆ H ₇₂ NO ₁₀ P	[M+K] ⁺	2,66	-
568,3482	1,4	$4,63 \times 10^{-2}$	0,0084	LPC(22:6)	C ₃₀ H ₅₁ NO ₇ P	[M+H] ⁺	0,85	Metabolismo dos glicerofosfolípidos Metabolismo da colina no câncer
680,4791	1,6	$3,73 \times 10^{-2}$	0,0141	LPC(30:6)	C ₃₈ H ₆₇ NO ₇ P	[M+H] ⁺	2,23	-
739,5998	1,1	$4,76 \times 10^{-2}$	0,0360	DG(42:4)	C ₄₅ H ₈₀ O ₅	[M+K] ⁺	3,24	-
643,4505	1,0	$4,10 \times 10^{-2}$	0,0072	LPE(30:3)	C ₃₅ H ₆₆ NO ₇ P	[M+K] ⁺	1,49	-

TABELA 1.6 (continuação). Tentativa de identificação dos lipídeos significativos entre as amostras de plasma de Ehrlich e controle analisadas no modo positivo.

<i>Features</i> (<i>m/z</i>)	VIP	p-valor	Diferen ça de massa (Da)	Nome	Fórmula	Aduto	<i>Fold</i> <i>Change</i> (PD/PN)	<i>Pathways</i> envolvido
721,4235	1,3	$3,05 \times 10^{-2}$	0,0204	PG(34:6)	C ₄₀ H ₆₆ O ₉ P	[M+H-H ₂ O] ⁺	0,90	-
848,5896	1,6	$5,19 \times 10^{-2}$	0,0096	PS(42:5)	C ₄₈ H ₈₃ NO ₉ P	[M+H-H ₂ O] ⁺	3,55	-
699,4095	1,4	$2,49 \times 10^{-2}$	0,0016	PI(24:0)	C ₃₃ H ₆₄ O ₁₃ P	[M+H] ⁺	1,32	-
672,5309	1,0	$6,02 \times 10^{-2}$	0,0347	desconhecido	-	-	0,61	-
665,4644	1,7	$3,29 \times 10^{-2}$	0,0447	DG(36:2)	C ₃₉ H ₇₂ O ₅	[M+2Na-H] ⁺	0,69	Citotoxicidade mediada por <i>killer cells</i> naturais Metabolismo da colina no câncer
851,3904	1,5	$1,95 \times 10^{-2}$	-	desconhecido	-	-	3,60	-

FONTE: Autoria própria.

Pode-se observar na Tabela 1.6 que a maioria dos lipídeos que apresentaram diferença entre os grupos pertencem à classe dos glicerofosfolipídeos, exceto o DG (36:2) que é classificado como um diacilglicerol.

Estudos com plasma têm demonstrado que o metabolismo de PCs e seus produtos (colina e fosfocolina) possuem correlação direta com o câncer de mama, possibilitando a descoberta de novos biomarcadores para a doença (HAMMAD et al., 2009; GLUNDE et al., 2004; ELIYAHU et al., 2007; ABOAGYE e BHUJWALLA, 1999).

Segundo GLUNDE et al., 2004 os níveis de fosfocolina e colina, aumentam à medida que as células cancerosas tornam-se mais malignas, sugerindo portanto a fosfocolina como um biomarcador para câncer de mama, e o mesmo foi observado no presente estudo utilizando o modelo animal de Ehrlich, que mimetiza o câncer de mama.

Dessa forma estudos a acerca do metabolismo da colina e suas correspondentes enzimas (colina quinase, fosfolipase C) são cada vez mais necessários para responder a muitas perguntas e compreender melhor o desenvolvimento do câncer de mama.

4.2 Análises das vias metabólicas para as análises no modo negativo e positivo utilizando a plataforma *MetaboAnalyst*

Os 16 ácidos graxos identificados como significativamente diferentes entre os grupos no modo negativo foram então submetidos ao sistema de análise de vias metabólicas utilizando a plataforma *online MetaboAnalyst* (<http://www.metaboanalyst.ca>) para investigação da importância dos caminhos envolvidos (Figura 1.21) e Tabela 1.7.

O gráfico de impacto das vias metabólicas demonstra qual o efeito da alteração de respectiva via sobre o organismo em questão (*Mus musculus*) onde a cor (variando de amarelo à vermelho) e o tamanho de cada círculo estão relacionados com os valores de p e seu impacto na via, respectivamente.

FIGURA 1.21. Impacto das vias metabólicas identificadas para alguns lipídeos significativamente diferentes entre os grupos de camundongos com tumor de Ehrlich induzido e controle, possíveis biomarcadores. O eixo X representa o impacto da via metabólica em relação à via correspondente no metabolismo do animal. E o eixo Y refere-se ao p – valor. Onde, A: Biossíntese de ácidos graxos insaturados; B: biossíntese de ácidos graxos; C: Biossíntese de esteróides; D: Metabolismo do ácido araquidônico e E: metabolismo do ácido linoléico (Modo negativo).

FONTE: Autoria própria, utilizando a base de dados online MetaboAnalyst (<http://www.metaboanalyst.ca/>).

TABELA 1.7. Resultados das vias metabólicas em relação ao impacto causado por cada uma (modo negativo).

Nome do <i>Pathway</i>	p-valor	Impacto
Metabolismo do ácido araquidônico	0,17	0,40
Biossíntese de esteróides	0,16	0,03
Metabolismo do ácido linoléico	0,03	0,50

FONTE: Autoria própria.

Para os 16 lipídeos identificados e selecionados como potenciais biomarcadores no modo positivo também foi realizada a mesma análise de importância metabólica (Figura 1.22 e Tabela 1.18).

FIGURA 1.22. Impacto das vias metabólicas identificadas para alguns lipídeos significativamente diferentes entre os grupos de camundongos com tumor de Ehrlich induzido e controle, possíveis biomarcadores. O eixo X representa o impacto da via metabólica em relação à via correspondente no metabolismo do animal. Onde: A: Metabolismo do ácido araquidônico; B: Biossíntese do inibidor de glicosilfosfatidilinositol (GPI); C: metabolismo do ácido alfa-linolênico; D: metabolismo dos glicoderofosfolípidos e E: metabolismo do ácido linoléico (modo positivo).

FONTE: Autoria própria, utilizando a base de dados online *MetaboAnalyst* (<http://www.metaboanalyst.ca/>).

TABELA 1.8. Resultados das vias metabólicas em relação ao impacto causado por cada uma.

Nome do <i>Pathway</i>	p-valor	Impacto
Metabolismo do ácido linoléico	0,02	0,25
Biossíntese do inibidor de glicosilfosfatidilinositol (GPI)	0,04	0,13
Metabolismo dos glicocerofosfolípidos	0,34	0,24
Metabolismo do ácido alfa-linolênico	0,03	0,20

FONTE: Autoria própria.

Nas Tabelas 1.7 e 1.8 podem-se verificar as vias metabólicas e o grau de impacto para os grupos de metabólitos considerados possíveis biomarcadores entre as condições biológicas em estudo, sendo o metabolismo do ácido linoléico o mais pronunciado em ambos os modos de análise. O metabolismo do ácido linoléico é intensivamente investigado na literatura e estudos demonstram que esse ácido graxo é responsável pela produção do 9-

hidroxioctadecadienóico (9- HODE) que está diretamente relacionado ao metabolismo do câncer e com doenças envolvendo síndromes metabólicas (VANGAVETI et al., 2016).

O ácido linoléico (LA) é um constituinte importante de lipoproteínas, um ácido graxo poliinsaturado que é oxidado por enzimas endógenas e espécies reativas de oxigênio. Geralmente a elevação da quantidade de lipoproteínas associado ao estresse oxidativo e à falta de antioxidantes leva a processos oxidativos, resultando em uma gama de derivados oxidados e que desempenham importantes papéis na regulação de processos inflamatórios, em especial em síndromes metabólicas e câncer (VANGAVETI et al., 2016).

Nota-se que os lipídeos identificados em ambos os modos de ionização e que mais se destacaram como possíveis biomarcadores entre os grupos (animais portadores do tumor de Ehrlich e controle) foram responsáveis por impactar em maior grau a via do ácido linoléico, e os resultados aqui apresentados estão condizentes com estudos encontrados na literatura e que envolvem a busca de novos biomarcadores para o câncer de mama.

4.3 MS/MS de alguns lipídeos considerados potenciais biomarcadores identificados no modo positivo

Serão demonstrados neste tópico algumas tentativas de identificações dos lipídeos com potencial para serem considerados biomarcadores entre os grupos de camundongos com tumor de Ehrlich induzido e controle, sendo os resultados obtidos nas análises realizadas no modo positivo.

Após análise dos metabólitos que influenciaram na separação em relação ao modelo de PLS-DA, alguns lipídeos foram extraídos de acordo com seu valor de VIP e sua significância estatística pelo método univariado (não paramétrico – $p < 0,05$). Após a seleção, estes foram então extraídos de um dos cromatogramas referente a um dos animais do grupo com tumor de Ehrlich induzido. Todos os lipídeos relatados na Tabela 1.6 foram extraídos, conforme se pode observar na Figura 1.23.

FIGURA 1.23. Cromatogramas de íon extraído (XIC) referentes ao lipídeos considerados significativamente relevantes em relação à discriminação entre as amostras de plasma de Ehrlich e controle analisadas no modo positivo.

FONTE: Autoria própria, utilizando o software *DataAnalysis* (Bruker).

Assim, foram selecionados três lipídeos das classes de PC e LPC, demonstrando o espectro de MS/MS para seus íons, sendo a estrutura exata não determinada, apenas a confirmação da classe e tamanho genérico da cadeia.

Na Figura 1.24 encontra-se o primeiro exemplo para o lipídeo PC (36:2), sendo demonstradas as principais fragmentações que correspondem a essa classe de moléculas, bem como seu tempo de retenção em uma amostra de plasma de Ehrlich.

FIGURA 1.24. Cromatograma de íon extraído (XIC) referente ao metabólito de m/z 808,58 (A); espectro de MS1 do pico referente ao metabólito extraído (B) e espectro e MS2 referente à fragmentação do íon extraído (m/z 808,58), mostrando o padrão de fragmentação do mesmo e confirmando as principais que são confirmatórias para a classe de lipídeo estabelecida para tal.

FONTE: Autoria própria, utilizando o software *DataAnalysis* (Bruker).

Nas Figuras 1.25 e 1.26 também estão representados outros dois exemplos confirmando os principais fragmentos dessa classe de compostos.

FIGURA 1.25. Espectro de MS2 para o lipídeo referente à m/z 780,55; demonstrando as fragmentações que confirmam a classe estabelecida para tal metabólito.

FONTE: Autoria própria, utilizando o software *DataAnalysis* (Bruker).

Para o composto da Figura 1.25, através dos bancos de dados utilizados, foi considerada a fórmula molecular $C_{44}H_{84}NO_8P$ que pode ser referente tanto à fosfatidilcolina (PC's) devido ao íon m/z 184,07 correspondente à fosfocolina, e da mesma forma os outros

fragmentos destacados m/z 104,10 e m/z 86,09, que correspondem à colina e perda de água pela colina, respectivamente (DÓRIA et al., 2012).

FIGURA 1.26. Espectro de MS2 para o lipídeo referente à m/z 568,34; demonstrando as fragmentações que confirmam a classe estabelecida para tal metabólito.

FONTE: Autoria própria, utilizando o software *DataAnalysis* (Bruker).

4.4 Análise comparativo entre fluido tumoral ascítico e plasma de Ehrlich utilizando o software *Metaboanalyst*

Nesta etapa do trabalho foi realizada a avaliação de possíveis similaridades entre o fluido tumoral e o plasma de Ehrlich. O objetivo dessa avaliação foi verificar a similaridade quanto ao conteúdo lipídico presente no plasma e no fluido tumoral.

Considerando as atuais formas de diagnóstico de câncer de mama, é válido a comparação em relação ao entendimento da vantagem em utilizar um método menos invasivo, como por exemplo sangue, através do plasma. Dessa forma, foi realizada a correlação entre o grupo de amostras de plasma e fluido peritoneal utilizando ferramentas uni e multivariadas disponíveis na plataforma de tratamento de dados *MetaboAnalyst* (XIA e WISHART, 2016).

Na Figura 1.27 estão demonstrados os *scores plots* para o modelo de PCA construído para comparação entre as amostras de plasma de Ehrlich e fluido tumoral no modo negativo e positivo.

FIGURA 1.27. *Score plot* PCA entre os grupos de plasma de Ehrlich (Vermelho) e fluido tumoral (Verde) para análises por LC-MS no modo negativo (A) e modo positivo (B).

FONTE: Autoria própria, utilizando o software *MetaboAnalyst*.

No *score plot* representado da Figura 1.27 A), notou-se que a segunda componente principal (PC2) foi responsável pela discriminação entre os grupos de plasma e fluido tumoral, sendo as duas primeiras componentes explicando 25,6 % da variância dos dados. No modo positivo, representado pela Figura 1.27 B), a diferenciação entre os grupos se deu pela primeira componente principal (PC1), onde PC1 e PC2 conseguiram explicar 27,7% da variância dos dados. Como se pode notar, os grupos não tiveram uma adequada separação utilizando o método não supervisionado PCA, dessa forma o conjunto de dados foi submetido à análise supervisionada PLS-DA, objetivando extrair os lipídeos importantes pela diferenciação entre as amostras, conforme verifica-se na Figura 1.28.

FIGURA 1.28. Score plot PLS-DA entre os grupos de plasma de Ehrlich (Vermelho) e fluido tumoral (Verde) para análises por LC-MS no modo negativo (A) e modo positivo (B).

FONTE: Autoria própria, utilizando o software *MetaboAnalyst*.

O modelo de PLS-DA obtido para o conjunto de dados foi construído e avaliado através da validação cruzada, na qual consiste basicamente na utilização de um determinado número de amostras para a construção do modelo (conjunto de treinamento) e outro número de amostras para aplicação do modelo (conjunto de validação), os parâmetros estatísticos obtidos pode ser visualizado na Tabela 1.9.

TABELA 1.9. Parâmetros estatísticos obtidos na validação dos modelos de PLS-DA para o conjunto de amostras de fluido tumoral e plasma de Ehrlich, A) análises no modo negativo e B) análises no modo positivo.

A – modo negativo					
Medida	Componente 1	Componente 2	Componente 3	Componente 4	Componente 5
Precisão	0,8889	0,8889	0,8889	0,8889	0,8889
R^2	0,9167	0,9903	0,9981	0,9998	0,9999
Q^2	0,3859	0,4891	0,4629	0,4734	0,7454
B – modo positivo					
Medida	Componente 1	Componente 2	Componente 3	Componente 4	Componente 5
Precisão	0,8235	0,7647	0,6471	0,6471	0,6471
R^2	0,8492	0,9692	0,9937	0,9991	0,9999
Q^2	0,4513	0,3925	0,3654	0,3468	0,3427

FONTE: Autoria própria.

Avaliando o modelo para o conjunto do modo negativo, tem-se uma precisão de 88,89 % em relação ao modelo de classificação, com parâmetro de ajuste R^2 de 0,999 e o parâmetro de predição Q^2 de 0,745, utilizando as cinco componentes principais. Já para o modo positivo, observa-se uma precisão de 82,35 % onde os parâmetro de ajuste R^2 considerando apenas a primeira componente foi de 0,849 e de predição Q^2 foi de 0,451. Ambos os modelos apresentaram bons parâmetros estatísticos.

Dessa forma, após a obtenção dos modelos de predição, a seleção dos *features* responsáveis pela discriminação entre o grupo de amostras de fluido tumoral e plasma foram avaliados. Para tal, foi utilizado os resultados de VIP (do inglês – *Variable Influence on Projection*) que apresentaram valores maiores que 1,0, os quais influenciam de forma mais pronunciada na separação dos grupos. Na Figura 1.29 estão representados o gráfico de VIPs para o modo negativo (A) e positivo (B) para as 12 variáveis com maiores valores em cada situação. Pode-se observar também os *boxplot* para os *features* que apresentaram maiores valores de *fold change*, demonstrados na Tabela 1.10.

FIGURA 1.29. VIP *plot* dos 12 variáveis com maior influência no modelo de PLS-DA em A) modo negativo e B) modo positivo. Do lado direito de cada figura os boxplots para os features representando as variações em cada grupo de amostra.

FONTE: Autoria própria, utilizando o software *metaboAnalyst*.

Na Tabela 1.10 estão apresentados os *features* com maior relevância na separação entre os grupos estudados nesse tópico, incluindo seus parâmetros estatísticos, identificação e rota metabólica envolvida.

TABELA 1.10. Tentativa de identificação dos lipídeos significativos entre as amostras de plasma de Ehrlich e Fluido tumoral no modo negativo.

<i>Molecular Feature</i>	VIP	p-valor	Identificação	Diferença de massa (Da)	Fórmula	Aduto	Fold Change (Plasma/Fluido)	Principais Pathways
568,5288	2,06	$2,01 \times 10^{-2}$	DG(32:0)	0,022	C ₃₅ H ₆₈ O ₅	[M-CH ₃] ⁻	5,9843	mapa04750 Regulação do mediador inflamatório dos canais TRP mapa05200 Pathways em câncer mapa05231 Metabolismo da colina no câncer
305,2466	1,84	$2,57 \times 10^{-2}$	FA(20:3)	0,002	C ₂₀ H ₃₃ O ₂	[M-H] ⁻	0,4309	-
307,2657	2,20	$6,06 \times 10^{-2}$	FA(20:2)	0,002	C ₂₀ H ₃₅ O ₂	[M-H] ⁻	0,4974	-
311,1886	1,90	$2,34 \times 10^{-2}$	FA(18:4)	0,010	C ₁₈ H ₂₈ O ₂	[M+Cl] ⁻	0,4486	mapa00592 metabolismo do ácido alfa-linoléico
255,2512	1,86	$3,25 \times 10^{-2}$	FA(16:0)	0,018	C ₁₆ H ₃₁ O ₂	[M-H] ⁻	2,0904	mapa01212 metabolismo de ácido graxos mapa01040 biosíntese de ácidos graxos insaturados
417,3616	1,95	$2,16 \times 10^{-3}$	FA(28:3)	0,012	C ₂₈ H ₄₉ O ₂	[M-H] ⁻	0,4478	-
205,2043	1,95	$1,86 \times 10^{-2}$	NI*	-	-	-	2,1092	-

*NI: não identificado.

FONTE: Autoria própria.

TABELA 1.11. Tentativa de identificação dos lipídeos significativos entre as amostras de plasma de Ehrlich e Fluido tumoral no modo positivo.

<i>Feature</i>	VIP	p-valor	Identificação	Diferença de massa (Da)	Fórmula	Aduto	Fold Change (Plasma/Fluido)	<i>Pathway</i>
762,6012	2,18	$1,17 \times 10^{-3}$	PC(34:0)	0,0004	$C_{42}H_{85}NO_8P$	$[M+H]^+$	0,244	mapa00564 Metabolismo dos glicerofosfolípidos mapa00590 Metabolismo do ácido araquidônico mapa00591 Metabolismo do ácido linoléico mapa00592 Metabolismo do ácido alfa-linolênico mapa05231 Metabolismo da colina no câncer
762,5685	1,72	$8,10 \times 10^{-3}$	PE(37:0)	0,0323	$C_{42}H_{85}NO_8P$	$[M+H]^+$	0,394	mapa00563 Biossíntese de glicosilfosfatidilinositol (GPI)
786,6271	2,45	$1,72 \times 10^{-3}$	PC(P-37:1)	0,0100	$C_{45}H_{89}NO_7P$	$[M+H]^+$	0,315	mapa00564 Metabolismo dos glicerofosfolípidos mapa00590 Metabolismo do ácido araquidônico mapa00591 Metabolismo do ácido linoléico mapa00592 Metabolismo do ácido alfa-linolênico mapa05231 Metabolismo da colina no câncer

TABELA 1.11 (continuação). Tentativa de identificação dos lipídeos significativos entre as amostras de plasma de Ehrlich e Fluido tumoral no modo positivo.

<i>Feature</i>	VIP	p-valor	Identificação	Diferença de massa (Da)	Fórmula	Aduto	Fold Change (Plasma/Fluido)	<i>Pathway</i>
758,5902	0,61	$1,10 \times 10^{-2}$	PC(34:2)	0,0207	C ₄₂ H ₈₁ NO ₈ P	[M+H] ⁺	0,278	mapa00564 Metabolismo dos glicerofosfolípidos mapa00590 Metabolismo do ácido araquidônico mapa00591 Metabolismo do ácido linoléico mapa00592 Metabolismo do ácido alfa-linolênico mapa05231 Metabolismo da colina no câncer
638,3512	1,99	$2,94 \times 10^{-2}$	PS(24:1(OH))	0,0152	C ₃₀ H ₅₇ NO ₁₁ P	[M+H] ⁺	0,317	-

FONTE: Autoria própria.

No modo negativo, observou-se que a maioria dos lipídeos relevantes são pertencentes à classe dos ácidos graxos, que vem sendo alvo de vários estudos indiciando-os como potenciais biomarcadores para câncer de mama (WEI et al., 2013). Atenção especial pode ser dada ao ácido FA (16:0) já relatado como possível biomarcador para câncer de mama (LV e YANG, 2012). Nesse estudo os autores o detectaram em maior nível em soro de pacientes com câncer de mama quando comparado ao soro de pacientes saudáveis.

O presente trabalho reforça a utilização do plasma sanguíneo como potencial fluido biológico no diagnóstico menos invasivo, uma vez que potenciais biomarcadores foram encontrados em maiores níveis no plasma de Ehrlich. Consequentemente, as características do tumor podem ser refletidas no sangue. Já os ácidos graxos insaturados significativamente relevantes foram determinados em maiores níveis no fluido tumoral que os encontrados no plasma, o que sugere estarem intrinsecamente envolvidos no desenvolvimento tumoral.

Observando a Tabela 1.11, notaram-se que todos os lipídeos significativos pertenciam à classe de fosfolipídeos, também condizente com vários estudos apresentados na literatura para câncer de mama (CÍFKOVÁ et al., 2015). No entanto, todos apareceram em maior quantidade no fluido tumoral, conforme pode ser visualizado pelos valores de *fold change* e nos *boxplots*, o que também são indicativos do seu envolvimento intrínseco no processo tumoral e potenciais componentes de membranas. Assim, podem sugeri-los como alvos para estudos mais aprofundados na descobertas de novos biomarcadores para a doença em questão.

Na Figura 1.30 e Tabela 1.12 são demonstrados as análises dos *pathways* indicados pelo banco de dados do software *MetaboAnalyst* como os mais importantes no organismo em questão (camundongo) e seus respectivos pesos.

FIGURA 1.30. Impacto das vias metabólicas identificadas para alguns lipídeos significativamente diferentes entre os grupos de Plasma de Ehrlich e Fluido tumoral, analisados no modo positivo. O eixo X representa o impacto da via metabólica em relação à via correspondente no metabolismo do animal. E o eixo Y refere-se ao p – valor. Onde - A: Metabolismo do ácido araquidônico; B: Metabolismo do ácido alfa-linoléico; C: Metabolismo do ácido linoléico; D: Biossíntese do inibidor de glicosilfosfatidilinositol (GPI) e E: Metabolismo de glicerofosfolipídeos.

FONTE: Autoria própria, utilizando a base de dados online MetaboAnalyst (<http://www.metaboanalyst.ca/>).

TABELA 1.12 Resultados das vias metabólicas em relação ao impacto causado por cada uma para o modo positivo do comparativo de plasma e fluido tumoral de Ehrlich.

Nome do <i>Pathway</i>	p-valor	Impacto
Biossíntese do inibidor de glicosilfosfatidilinositol (GPI)	0,0197	0,04
Metabolismo de glicerofosfolipídeos	$4,34 \times 10^{-4}$	0,23

FONTE: Autoria própria.

Observou-se que a via metabólica envolvida, embora com baixo impacto, é o metabolismo do ácido linoléico, e que vem sendo discutida em vários estudos envolvendo câncer de mama. O ácido oléico é produzido pela Esteroil-CoA desaturase (SCD), uma enzima localizada no retículo endoplasmático, cuja função é converter os ácidos saturados em seu correspondente insaturado, como o ácido linoléico. Assim, estudos revelam que em casos de câncer existem duas formas que pode afetar o nível de ácido linoléico no sangue, seja a própria ação do tumor ou a do fígado. Em relação ao aspecto tumoral, a SCD pode ser considerada reguladora da lipogênese, produzindo ácidos graxos monoinsaturados para

fosfolípídeos de membrana e dessa forma envolvendo-se diretamente em vias de sinalização oncogênicas e de importantes para a absorção de C18:1 no processo tumoral (FRITZ et al., 2010; LUYIMBAZI et al., 2010; KAMPHORST et al., 2013).

5 CONCLUSÕES

A lipidômica é uma campo relativamente novo dentro da metabolômica e tem sido responsável pelo entendimento de vários processos patológicos. No presente trabalho o modelo utilizado é considerado um modelo de câncer de mama experimental em camundongos fêmeas, onde os resultados obtidos apontaram grande proximidade com estudos já relatados utilizando linhagens celulares ou até mesmo amostras de humano, indicando ser um modelo viável para melhor compreensão do metabolismo do câncer de mama, com foco na alteração do metabolismo do ácido linoléico e de glicerofosfolídeos.

Nesse primeiro capítulo da tese, foi possível obter resultados interessantes à cerca do metabolismo lipídico do modelo animal de Ehrlich, que embora pouco abordado na literatura, apresenta vários atrativos devido a facilidade do seu desenvolvimento *in vivo*.

Através dos modelos estatísticos foi possível avaliar a diferença entre os grupos em estudos, sendo o primeiro conjunto amostras de plasma de camundongos com tumor de Ehrlich e plasma de camundongos controles, e o segundo conjunto a comparação entre fluido peritoneal de Ehrlich e plasma de Ehrlich. No modo negativo, foi possível obter um perfil de ácidos graxos presentes nesses fluidos e com isso pôde-se observar que a maioria dos ácidos graxos saturados encontram-se em maior quantidade no plasma de Ehrlich, quando comparado com ácidos graxos insaturados.

Os resultados obtidos pela ionização no modo positivo mostraram que os níveis da maioria de fosfatidilcolinas (PCs) e fosfatidiletanolaminas (PE) considerados significativamente diferentes para o conjunto de plasma foram maiores para o grupo de plasma de Ehrlich, indicando que a fosfocolina pode ser considerada um potencial biomarcador para câncer de mama.

Analisando as vias metabólicas envolvidas, pôde-se observar que as principais vias metabólicas que impactam o organismo em estudo (*Mus musculus*) foram o metabolismo do ácido araquidônico e o metabolismo do ácido linoléico para os dados obtidos no modo negativo; e para os resultados no modo positivo pôde-se destacar o metabolismo dos glicerofosfolídeos e do ácido linoléico, sendo esse último responsável pela conexão entre os dois modos de análise.

Comparando o fluido peritoneal e plasma de Ehrlich, foram possíveis observar algumas características do fluido tumoral refletidas no plasma de Ehrlich. No modo negativo,

observou-se o lipídeo da classe dos diacilgliceróis (DG 32:0) e o ácido graxo (FA 16:0) em maiores níveis de quantidade no plasma.

No modo positivo, observou-se que os lipídeos significativamente diferentes pertencem à classe de PCs e PEs, nesse caso em menor quantidade no plasma em relação ao fluido peritoneal, confirmando estarem intrinsecamente relacionados ao processo tumoral e mostrando algumas mudanças lipídicas que podem ser refletidas no plasma de camundongos com tumor de Ehrlich induzido.

Dessa forma, pode-se considerar que o presente estudo foi capaz de obter um delineamento experimental que permitiu a discriminação do perfil lipídico de camundongos com tumor de Ehrlich induzido e camundongos controle, e consiste em uma grande contribuição para busca de novos biomarcadores para o câncer de mama, uma vez que os resultados foram representativos com outros tipos de amostras já descritas na literatura.

Capítulo 2

*Utilização de Amostragem in vivo
para Avaliação Metabólica em
Modelo Tumoral de Ehrlich*

1 INTRODUÇÃO

1.1 Metabolômica e busca de biomarcadores

Os metabólitos são pequenas moléculas que advém de modificações químicas que englobam um determinado metabolismo, fornecendo as principais informações funcionais a cerca de um sistema biologicamente ativo (SILVA et al., 2014).

Um metaboloma por sua vez, pode ser definido como uma coleção de pequenas moléculas presentes em um dado sistema biológico, seja ele um fluido, uma célula ou organismo, os quais dependem das condições fisiológicas em que se encontram (podendo ser variações genéticas, condições patológicas ou respostas à estímulos externos) (LORD, 2007).

Assim, correlacionado aos dois conceitos anteriores, o termo metabolômica então pode ser definido como uma ciência “ômica” que visa estudar todas as espécies de baixa massa molecular (normalmente < 1500 Da) presentes em um dado sistema biológico sob análise, dedicando o estudo qualitativo e/ou quantitativo das espécies que compõem o metaboloma. Os metabólitos compõem um conjunto de funções biológicas; sendo eles os produtos finais ou intermediários de uma cadeia de reações químicas, a qual se nomeia de uma via metabólica.

Do ponto de vista histórico, a metabolômica é explorada desde 1500 – 2000 a.C., quando médicos chineses usavam formigas para diagnósticos de doença com base nas propriedades da urina do paciente, sendo abordagens similares empregadas no Egito e na Grécia (VAN DER GREEF e SMILDE, 2005). Já o termo metabolômica só foi utilizado no final de 1998, por Fiehn, entretanto os primeiros estudos de perfil metabólico foram realizados um pouco antes (1960 – 1970s), utilizando a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) (VAN DER GREEF e SMILDE, 2005; RYAN e ROBARDS, 2006; NOVOTNY et al., 2008). Assim, conceitualmente, o campo da metabolômica teve origem antes do que de fato se teve o crédito, porém devido às limitações dos métodos analíticos da época, os conceitos não foram estabelecidos ainda em 1960 e 1970.

Normalmente, o conjunto de dados obtidos em uma análise metabolômica é complementar aos dados obtidos por outras abordagens “ômicas”, como a genômica, a proteômica e a transcriptômica. Devido aos avanços tecnológicos da instrumentação analítica, as pesquisas nessa área têm crescido substancialmente, já que o aperfeiçoamento de técnicas

analíticas permitem estudos de metabolômica global muito mais completos, possibilitando análises simultâneas de metabólitos utilizando uma determinada plataforma analítica.

Uma abordagem metabolômica tem grande relevância, pois representa um ponto final das vias moleculares envolvidas, e assim ocupa uma posição de destaque dentro das ciências ômicas, conseguindo gerar informações suficientes para definir o fenótipo de um indivíduo, diferente das demais ômicas (VAN DER GREEF e SMILDE, 2005).

O interesse por metabolômica tem se expandido de forma acelerada em diversos campos de pesquisa, que compreendem a biotecnologia e a agricultura (SAITO e MATSUDA, 2010), desenvolvimento de fármacos (ZHAO et al., 2012), nutrição (JONES et al., 2012), segurança e qualidade alimentar (ANTIGNAC et al., 2011), diagnósticos clínicos, química ambiental e toxicologia (VIANT e SOMMER, 2013), descoberta de produtos naturais (DO et al., 2014), dentre outras. Essa grande aplicabilidade da metabolômica em vários ramos transcorre devido principalmente da proximidade que o metaboloma apresenta com a fisiologia celular e o estado atual da célula.

O primeiro passo de um estudo de metaboloma global envolve a comparação diferencial de vários grupos disciplinares ou de tratamento (por exemplo: normal *versus* tratados, saudáveis *versus* doentes) sem identificação prévia de todos os metabólitos detectados. Após a coleta e análises das amostras, os dados são processados através de técnicas estatísticas adequadas, a fim de isolar um número menor de metabólitos potencialmente relevantes que são selecionados para diferenciar os grupos (potenciais biomarcadores). Um esquema geral das etapas de um estudo metabolômico pode ser representado pela Figura 2.1.

FIGURA 2. 1. Fluxograma simplificado, de um estudo de metabolômico.

FONTE: Autoria própria.

Um biomarcador pode ser definido como uma espécie característica que é seletivamente medida e avaliada como um indicador de processos biológicos normais, processos patogênicos ou em respostas farmacológicas em função de uma intervenção terapêutica (ACKERMANN et al., 2006). A principal utilização de biomarcadores centra-se na área da medicina para o diagnóstico de doenças; a avaliação da eficácia ou segurança de um determinado medicamento e seleção de pacientes com maior probabilidade de apresentar uma pré-disposição para determinada doença ou então uma pré-disposição para se comportar positivamente frente à algum tratamento terapêutico.

A maior parte dos estudos de metabolômica global inicia-se com essa etapa de isolar os potenciais metabólitos de interesse (diferenciação de metabólitos) e melhorar ou desenvolver uma metodologia analítica apropriada (KOULMAN *et al.*, 2009). Todavia, os resultados de tais estudos iniciais podem não serem confirmados como biomarcadores, ou seja

pode não estarem diretamente relacionados à doença de interesse, porém podem estar envolvidos em processos gerais, como por exemplo uma inflamação. Assim, após essa etapa, um biomarcador considerado clinicamente útil deve distinguir não apenas entre um indivíduo saudável e doente, ele também deve ser capaz de distinguir entre os indivíduos com uma doença em particular em relação a outras doenças.

1.2 Métodos de preparo de amostra para metabolômica utilizando LC-MS

A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) ou espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS) tem se tornado a técnica de escolha para bioanálises nas últimas décadas (WATT et al., 2000 e AUBRY, 2011).

O desempenho da técnica de separação e identificação é de total dependência da natureza das amostras a serem analisadas, que pode ser comprometida com suas características físico-químicas. Em geral, amostras biológicas não podem ser diretamente introduzidas em um sistema de LC-MS sem algum pré-tratamento ou extração, independente da tecnologia de LC-MS utilizada. Exceto quando se trata de técnicas de inserção direta no MS ou técnicas de dessorção. As análises por LC-MS requerem amostras na forma líquida, e dessa forma algumas são as opções para tratamento ou extração do analito. As amostras comumente utilizadas em estudos bioanalíticos são: plasma, soro, sangue, urina, fluido cérebro espinhal e tecido, onde cada uma requer diferentes tipos de preparo amostra.

Resumidamente, o preparo de amostra é responsável por alterar o aspecto da amostras, (por exemplo uma amostra sólida ou heterogênea tornando uma solução límpida), simplificar a composição da amostra (ou reduzir o efeito de matriz) ou enriquecer o analito de interesse (ou seja, pré-concentrar a amostra), podendo ser considerada uma das etapas mais críticas de uma bioanálise.

A Figura 2.2 mostra um esquema geral dos tipos de preparo mais utilizados para estudos metabolômicos.

FIGURA 2.2. Esquema geral de tipos de preparo de amostra biológicas para análise por LC-MS. Diluição, precipitação de proteínas (PPT), extração líquido-líquido (LLE), extração em fase sólida (SPE) e microextração em fase sólida (SPME).

FONTE: Autoria própria.

1.2.1 Microextração em fase sólida (SPME)

A microextração em fase sólida (SPME) é um método de preparação de amostra não exaustiva que permite a integração entre amostragem e etapas de preparação da amostra em uma só técnica. A técnica foi originalmente introduzida para a extração de compostos orgânicos voláteis e semi-voláteis utilizando a cromatografia gasosa (GC) como técnica de análise (BELARDI e PAWLISZYN, 1989; ARTHUR e PAWLISZYN, 1990). Porém, ao longo das últimas décadas, a SPME tem se expandido com inúmeras aplicações que vem abrangendo a área ambiental, alimentícia, farmacêutica, forense e clínica.

A SPME apresenta algumas opções de revestimentos extratores, dependendo da característica físico-química do (s) analito (os) de interesse. As fases de extração como polidimetilsiloxano (PDMS) ou poliacrilato (PA), foram uma das primeiras a serem utilizadas, aplicáveis para compostos não polares e polares, respectivamente. Eram inicialmente aplicadas e compatíveis, na maioria das vezes, com compostos voláteis

(termicamente estáveis), utilizando como técnica de análise a cromatografia gasosa (GC) (DEAN et al., 1996).

Atualmente a SPME não tem sido restrita apenas a compostos voláteis ou semivoláteis, expandindo suas aplicações para analitos termicamente lábeis analisáveis por cromatografia líquida (LC) hifenizada com diversas formas de detecção, como por exemplo uma das mais aplicadas atualmente, a espectrometria de massas (MS). Dessa forma, a análise de vários tipos de matrizes tem sido possibilitada, como por exemplo: alimentos (SAGRATINI et al., 2007; QUINTO et al., 2009), urina (SAITO e MATSUDA, 2010) e plasma (LIU et al., 2017).

As principais etapas do processo de SPME são: *i*) extração do (s) analito (s) pela fase extratora de modo direto (Figura 2.3 A), quando há contato com a amostra ou *headspace*, quando a fibra é exposta em uma posição acima da solução correspondente à amostra (Figura 2.3 B) e *ii*) a dessorção dos analitos extraídos do revestimento, podendo ser térmica, no caso de compostos voláteis extraídos no modo *headspace* ou utilizando solvente orgânico (Figura 2.3 C), de acordo com as características dos compostos de interesse.

FIGURA 2.3. Esquema do procedimento de SPME utilizando o modo de extração direta (A), *headspace* (B) e dessorção por solvente orgânico (C).

FONTE: Autoria própria.

Outros formatos de SPME, tais como película fina, barra de agitação revestida e capilar revestido também estão disponíveis, e o formato do dispositivo pode ser modificado de acordo com as necessidades da aplicação. Os revestimentos da fibra estão disponíveis em espessuras crescentes de 7 a 150 μm , conforme aumenta a quantidade de fase extratora, aumenta a capacidade de analito a ser extraído, porém também ocorre aumento nos tempos de equilíbrio de extração e dessorção.

A quantidade de analito possível de ser extraído por SPME depende do tempo de contato entre a amostra e fase de extração. Neste caso, a quantidade de analito extraído é dada pela Equação 1, onde n é o número de mols de analito extraído, C_0 representa a concentração inicial do analito na amostra, V_s é o volume da amostra, V_f é o volume de revestimento de fibras, K_{Afs} é a constante de distribuição do analito entre o revestimento extrator e a matriz da amostra definido como a razão da concentração de analito no revestimento e a concentração do analito na amostra, no equilíbrio, C_{fmax} é concentração máxima de sítios ativos na fase extratora e C_f^∞ é a concentração de analito sobre a fibra (PAWLISZYN, 1999).

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

O processo de microextração é considerado completo quando o equilíbrio entre a amostra e o revestimento extrator é alcançado, e o aumento do tempo de extração para além do tempo necessário para atingir o equilíbrio não resulta em qualquer aumento adicional da quantidade extraída dentro do erro experimental. Esse é o fator que difere os métodos de microextração dos métodos tradicionais exaustivos de preparo de amostra, como por exemplo a extração em fase sólida (SPE) (PAWLISZYN, 1999).

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

$$K_{fs} = \frac{C_f^\infty}{C_s^\infty} \quad \text{Equação 2}$$

A magnitude de K_{fs} depende tanto da natureza do analito quando do tipo de revestimento da fibra selecionada para o estudo, além de outras propriedades da matriz referentes à condições da mesma como: temperatura, pH, adição de algum solvente orgânico ou líquido iônico, fatores os quais devem ser mantidos constantes durante uma análise.

As principais vantagens da técnica de SPME são a simplicidade, eliminação de grandes volumes de solventes orgânicos, sensibilidade, possibilidade de manuseio de pequenos volumes de amostras, custos relativamente baixos e possibilidade de automação. Essas características são vantagens atrativas para preparo de amostras em bioanalítica, embora

o foco inicial da SPME tenha sido a extração de analitos em matrizes relativamente simples, como as amostras ambientais (PAWLISZYN, 1999).

Atualmente, o interesse para a combinação de SPME com o preparo de amostras para matrizes biológicas complexas como urina, soro, plasma, sangue total e saliva, tem crescido significativamente.

1.2.1.1 Microextração em fase sólida *in vivo* (SPME- *in vivo*)

Novos revestimentos para SPME têm sido desenvolvidos e dessa forma ampliando as possibilidades de aplicações, em especial o surgimento de fases extratoras biocompatíveis (VUCKOVIC e PAWLISZYN, 2011).

A SPME tem sido uma ferramenta útil para o preparo de amostra para aplicações em bioanálises, incluindo aplicações *in vivo*. Por meio dessa técnica de preparo é possível a obtenção de amostras mais limpas, minimizando assim efeitos de matriz que podem mascarar sinais de metabólitos importantes durante o estudo.

Essa característica faz da SPME uma técnica extremamente compatível com análises por LC-MS, sendo adequada para aplicações em diferentes tipos de amostra biológicas como: urina, plasma, fluido cérebro espinhal, soro, sangue total e tecido. A Figura 2.4 demonstra um esquema de um fluxo típico de trabalho utilizando SPME *in vivo* em um dado sistema biológico.

A quantidade de metabólitos extraídos pela fase extratora de SPME depende principalmente do tempo de exposição da fibra na matriz e do tempo de dessorção utilizando solvente orgânico, uma vez que a eficiência de extração é dependente do equilíbrio dos analitos entre a fase extratora e a matriz da amostra.

FIGURA 2.4. Esquema de um fluxo de trabalho utilizando SPME *in vivo* como método direto de extração e análise por LC-MS/MS.

FONTE: Autoria própria.

A SPME *in vivo* tem sido aplicada com sucesso em bioanálises como estudo de fármacos em cães (ZHANG et al, 2007), ratos (LORD et al., 2003), camundongos e peixes (TOGUNDE et al., 2012; ZHOU et al., 2008). Estudos realizados com a abordagem de metabolômica *target* em estudos farmacocinéticos também têm sido explorados (VUCKOVIC et al., 2011b).

Conforme já mencionado, a seletividade dos compostos extraídos por SPME depende do tipo de fase extratora utilizada para a análise. Essa característica permite ao analista a flexibilidade para a escolha dos tipos de compostos biológicos que se pretende investigar. Do ponto de vista de estudos de metaboloma global, essa característica pode ser considerada uma desvantagem da técnica, uma vez que se pode obter em maior quantidade de metabólitos hidrofóbicos ou hidrofílicos a depender do revestimento utilizado.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Utilizar a microextração em fase sólida *in vivo* (SPME-*in vivo*) como preparo de amostra para avaliação metabólica *untarget* do fluido peritoneal de Ehrlich.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Otimizar os tempos de extração e dessorção dos analitos utilizando SPME;
- ✓ Realizar a extração *in vivo* em camundongos *Swiss* com tumor de Ehrlich induzido;
- ✓ Obter um método cromatográfico para análises por LC-MS;
- ✓ Aplicar métodos uni e multivariados para comparação entre os grupos;
- ✓ Avaliar a cobertura metabólica utilizando SPME.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Otimização dos parâmetros de microextração em fase sólida no modo direto – *in vitro*

Inicialmente, foi realizado um planejamento experimental com intuito de otimizar a melhor condição para extração metabólica das amostras de líquido peritoneal com tumor de Ehrlich, no entanto foram utilizados padrões de ácidos graxos de cadeia longa, mimetizando um ambiente rico em lipídeos.

Após análise dos dados, observou-se que essa condição não mimetizaria bem o ambiente *in vivo* o qual seriam realizadas as extrações, principalmente devido a complexidade da matriz. Dessa forma, optou-se por realizar um novo planejamento utilizando-se dessa vez um *pool* de amostras de fluido peritoneal de 9 camundongos, e realizar as extrações *in vitro*.

Assim, um planejamento fatorial completo 2^2 foi realizado, tendo como variáveis: tempo de extração e tempo de dessorção. O planejamento foi integrado por quadruplicata no ponto central e 4 pontos axiais. Como resposta do planejamento utilizado no delineamento, foi utilizado como base o número de sinais de m/z após o *threshold* estipulado.

Na Tabela 2.1, seguem os níveis avaliados, bem como a matriz experimental utilizada.

TABELA 2.1. Níveis avaliados no planejamento experimental realizado para obtenção da melhor condição de SPME para extração *untarget* de líquido tumoral de Ehrlich, onde: V1-variável 1 (tempo de extração) e V2 – variável 2 (tempo de dessorção).

Experimento	V1	V2	Real	
	t extração	t dessorção	t extração	t dessorção
1	-1	-1	13	13
2	1	-1	27	13
3	-1	1	13	27
4	1	1	27	27
5	0	0	20	20
6	0	0	20	20
7	0	0	20	20
8	0	0	20	20
9	-1,414	0	10	20
10	1,414	0	30	20
11	0	-1,414	20	10
12	0	1,414	20	30

Fonte: Autoria própria.

As fibras utilizadas foram biocompatíveis com revestimento de C18 adsorvido em partículas de sílica porosa, totalizando uma camada de fase extratora de 45 μm de espessura e 15 mm de comprimento (Supelco®). Geralmente os polímeros utilizados são associados a aglutinantes biocompatíveis, o que permite esses dispositivos serem utilizados com sucesso em matrizes biológicas. O suporte sólido utilizado nessas sondas consiste de uma liga metálica flexível e inerte, sendo alojados no interior de agulhas hipodérmicas e devidamente vedados (Figura 2.5).

FIGURA 2.5. Dispositivos de SPME biocompatíveis para bioanálises e amostragem *in vivo* (45 μm de espessura, 15 mm de comprimento do revestimento).

FONTE: Sigma Aldrich.

Os 12 experimentos foram realizados aleatoriamente, onde foi utilizado um volume de 390 μL de líquido peritoneal de cada camundongo doente, totalizando 3500 μL de volume total do *pool* de amostras. Após preparado o *pool*, 280 μL de fluido peritoneal foram transferidos para *inserts* de 350 μL posicionados no interior de *vials* âmbar de 2 mL, totalizando 12 vials preenchidos. Concomitante, foi preparado o branco da extração, substituindo o fluido peritoneal por PBS pH 7,4; e para esta amostra foi fixado os tempos máximos utilizados no planejamento.

Inicialmente, as fibras de C18 utilizadas foram pré-condicionadas com (MeOH:H₂O 1:1 v/v) por um período de 60 min (VUCKOVIC et al., 2009). Após a extração direta, as fibras foram lavadas com água ultrapura por 10 segundos, essa etapa ajuda a minimizar a contaminação do extrato final com células ou partículas indesejáveis que podem ser interferentes no processo de ionização (BIRJANDI et al., 2014).

A dessorção foi realizada também de acordo com o planejamento experimental, fixando-se a proporção dos solventes de dessorção (ACN:H₂O 90:10 v/v). As análises foram realizadas por inserção direta em um espectrômetro de massas *Ion Trap Linear* (LTQ XL Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemanha). Os parâmetros para infusão direta foram

estabelecidos *online* de acordo com o número de sinais adquiridos e com menor quantidade de ruído. Na Tabela 2.2 seguem os parâmetros utilizados nas análises.

TABELA 2.2. Parâmetros ajustados no espectrômetro de massas (LTQ XL Thermo Fisher).

<i>Sheath gas Flow Rate (arb)</i>	<i>Aux Gas Flow Rate (arb)</i>	<i>Sweep Gas Flow Rate (arb)</i>	<i>I Spray Voltage (kV)</i>	<i>Capillary Temp (°C)</i>	<i>Capillary Voltage (V)</i>	<i>Tube Lens (V)</i>
10	5	0	4	250	43	100

3.2 Tratamento dos dados obtidos pelo planejamento experimental

Inicialmente, os dados foram exportados para o formato *.xls e transferidos para o Excel. Em seguida o branco da extração foi devidamente subtraído das amostras dos experimentos e então normalizados para escala de 100 %, onde foi observado o nível de ruído nos espectros, e estabelecido um *threshold* de 7%. Finalmente, utilizando a ferramenta de contagem do Excel, considerando apenas valores acima de 7%, foi obtido o número de sinais com esse *threshold* para cada experimento, sendo o maior número de sinais o desejável.

3.3. Animais utilizados nos experimentos *in vivo*

Os animais utilizados nesses experimentos seguem as mesmas condições descritas nos itens 3.1 e 3.2 do Capítulo 1 dessa tese.

Conforme já descrito, todos os camundongos utilizados foram fêmeas. Anterior à amostragem utilizando SPME, os animais foram anestesiados utilizando uma solução composta por 7,5 mL de ketamina (50 mg mL⁻¹) e 2,5 mL de xilazina (20 mg mL⁻¹) sendo utilizado 100 µL de anestésico para cada 10 g do animal. Foram utilizados dois grupos de animais contendo n= 10 em cada grupo (grupo com tumor de Ehrlich induzido e grupo controle com PBS intraperitoneal).

As extrações foram realizadas aos pares, a fim de monitorar os animais. Inicialmente, as fibras foram condicionadas com uma solução (MeOH:H₂O 1:1 v/v) por um período de 60 min. Em seguida, as extrações foram realizadas no peritônio do animal, região contendo o fluido tumoral. Após 10 min de extração direta, as fibras foram lavadas com água ultrapura por 10 s e então realizada a dessorção em uma solução de (ACN:H₂O 90:10 % v/v) por 20

min. Após a primeira dessorção, todas as fibras utilizadas foram deixadas em solução de MeOH 100% por 24h, a fim de evitar *carryover*.

No entanto, devido a quantidade de macromoléculas e metabólitos presentes no ambiente biológico, é impossível conhecer com total segurança a completa ausência de *carryover*, dessa forma o ideal seria a utilização dessas fibras biocompatíveis apenas para uma extração *in vivo*, o que evitaria possíveis contaminações.

O branco da extração *in vivo* foi realizado utilizando animais saudáveis, onde foi injetado solução salina de PBS pH 7,4 na região peritoneal e então introduzida a fibra de SPME da mesma maneira que nos animais com tumor de Ehrlich induzido. Diferentes fibras foram utilizadas em cada animal.

3.3 Análises por das amostras obtidos pela extração por SPME *in vivo* utilizando LC-MS

3.4.1 Separação cromatográfica

As separações cromatográficas foram realizadas em uma coluna C18 *Thermo Scientific Accucore* (150 × 21 mm, 2,6 µm de tamanho de partícula) mantida à uma temperatura de 50°C e um fluxo de 250 µL min⁻¹, sendo o equipamento utilizado um HPLC PROMINENCE (Série 20A; Shimadzu, Kyoto, Japão). As fases móveis consistiram de (A) água desionizada e (B) acetonitrila. Na polaridade negativa não houve nenhum acréscimo de aditivo e na polaridade positiva houve o acréscimo de 0,1% v/v de ácido fórmico. Um gradiente binário de 70 a 98% de B foi utilizado para o modo positivo totalizando 60 min de corrida, para ambos os modos positivo e negativo. O volume de injeção foi de 5 µL. Todos os solventes utilizados foram grau LC-MS, variando entre as marcas J.T Baker e Sigma Aldrich.

3.4.2 Espectrometria de massas

A detecção foi realizada por espectrometria de massas (MS – sigla do inglês) utilizando equipamento da Bruker®, modelo *micrOTOF-Q II*TM ESI-Qq-TOF (híbrido quadrupolo com tempo de voo – “*time of flight*”), o qual possibilitou a aquisição simultânea de dados operando no modo de varredura completa “*full scan*” (*m/z* 100 a 1200) tanto na polaridade negativa quanto positiva. Os parâmetros utilizados no MS foram:

- Calibrantes para o sistema os íons de *m/z* 121,0508 e *m/z* 922,0097 para o modo positivo e os íons de *m/z* 112,9856 e de *m/z* 966,0007 para o modo negativo;

- Voltagem do capilar: 4,5 kV;
- Pressão do gás nebulizador (N_2): 4 bar;
- Vazão do gás secante (N_2): 8 L min⁻¹;
- Temperatura da fonte de íons: 200°C.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Otimização das condições de SPME

Vários são os parâmetros que podem influenciar na eficiência da extração por SPME, incluindo fase extratora, tempo de extração, tempo de dessorção, solvente de dessorção, pH de extração e temperatura. O pH e temperatura de extração são parâmetros não controláveis *in vivo*, dessa forma não foram avaliados. Os revestimentos para extração *in vivo* devem ser biocompatíveis, e atualmente está disponível comercialmente apenas SPME com fase de C18.

O branco foi devidamente subtraído das amostras dos experimentos e em seguida os espectros de inserção direta foram normalizados para escala de 100 %. Na Figura 2.6 estão demonstrados todos os espectros de massas obtidos, sendo A modo positivo e B modo negativo, observando-se o nível de ruído foi considerado um *threshold* de 7%.

FIGURA 2.6. Espectro de massas obtidos através de inserção direta no MS para cada experimento realizado para otimizar os tempos de extração e dessorção por SPME. A) Modo positivo, B) modo negativo e C) branco da extração.

FONTE: Autoria própria.

Na Figura 2.7 estão demonstrados as quantidades de sinais para cada experimento visualizado através do gráfico de barras. Podendo-se perceber que a melhor condição foi obtida pelo experimento 9, em ambas as polaridades de análise. Sendo assim, foi estabelecido o tempo de extração de 10 min e tempo de dessorção 20 min para extração *in vivo*. Nota-se que os tempos ficaram intermediários aos valores de mínimo e máximo estabelecidos, fato este que pode ser justificado pelo tempo ideal de equilíbrio dos analitos entre a matriz e a fase extratora.

Além disso, vários são os fatores que podem influenciar no equilíbrio, e um dos principais pode estar relacionado à saturação da fase extratora após determinado tempo de extração. Devido a essa saturação pode ocorrer o desprendimento indesejado de alguns analitos, o que resulta na diminuição da quantidade extraída. O mesmo fato pode ocorrer com a etapa de dessorção após determinado tempo de dessorção, uma vez que os analitos podem voltar a terem interação com a fase estacionária, e esse fenômeno pode ocorrer continuamente. Entretanto, é indispensável a obtenção de tempos de extração e dessorção suficientes que resultem na maior quantidade possível de metabólitos extraídos e dessorvidos, respectivamente.

FIGURA 2.7. Respostas obtidas para cada experimento do planejamento realizado para verificar o melhor tempo de extração e dessorção utilizando SPME em amostra de fluido tumoral. Algarismos na parte superior das barras indicam a quantidade de sinais obtidos.

FONTE: Autoria própria.

Assim, quatro principais hipóteses podem estar relacionadas à quantidade de metabólitos extraídos: *i)* a elevada heterogeneidade do fluido tumoral; *ii)* a difusão dos metabólitos através da matriz, devido a complexidade da mesma; *iii)* variabilidade da quantidade de fase extratora presente na fibra observada pela grande variação do ponto central (embora utilizando mesmos parâmetros) e *iv)* a baixa reprodutibilidade de análises no MS por inserção direta.

4.2 Análises metabólicas de tumor de Ehrlich utilizando SPME *in vivo*

4.2.1 Comparação das análises do modo negativo e modo positivo utilizando LC-MS

O número de metabólitos detectados utilizando SPME *in vivo* em amostras de fluido tumoral foi avaliado utilizando o software MZmine e *DataAnalysis*. Inicialmente, os dados foram pré-processados utilizando o MZmine e após extração da planilha contendo os *molecular features* foi realizada a conferência manual de todos os picos. A função *dissect* do *DataAnalysis* foi utilizada para confirmação do que realmente era banda cromatográfica ao longo da faixa de massa utilizada (100 a 1200 m/z) e tempos de retenção entre 2 e 61 min. Após essa análise, a matriz de dados foi então construída excluindo os *molecular features* com coeficientes de variação (CV) > 30 baseado nas amostras de QCs.

Na Tabela 2.3 estão demonstrados os números de *molecular features* em cada estágio do processamento de dados: *i)* extraídos do MZmine; *ii)* comparação com os picos confirmados pelo *dissect* através do software *DataAnalysis* e *iii)* consideração dos *molecular features* com CV < 30.

TABELA 2.3. Número de *molecular features* detectados utilizando SPME *in vivo* em fluido tumoral de Ehrlich em cada etapa do tratamento de dados.

Polaridade da análise	MZmine	Confirmação DataAnalysis	CV < 30%
Modo positivo	1134	328	142
Modo negativo	3359	176	78

FONTE: Autoria própria.

Pode-se melhor visualizar a distribuição de *molecular features* nos modos positivo e negativo na Figura 2.8. Os mapas de íons representados na parte superior correspondem aos dados brutos extraídos após processamento no MZmine, enquanto os mapas de íons da parte

inferior são referentes à consideração manual dos picos após confirmação utilizando a função *dissect* do software *DataAnalysis*.

Comparando os mapas de íons, observou-se que no modo negativo ocorreu uma maior diversidade de m/z detectados na faixa de trabalho (100 a 1200 m/z), inclusive maior quantidade de metabólitos na faixa de 400 a 750 m/z podendo ser espécies lipídicas, devido à característica hidrofóbica da fase estacionária utilizada (C18).

FIGURA 2.8. Mapa de íons (m/z versus tempo de retenção) referentes à extração por SPME *in vivo* em peritônio de tumor de Ehrlich e animal sadio analisados por LC-MS no modo positivo (A – dados brutos extraídos do MZmine e B – dados após confirmação de picos pelo *DataAnalysis*) e modo negativo (C - dados brutos extraídos do MZmine e D – dados após confirmação de picos pelo *DataAnalysis*).

FONTE: Autoria própria.

Conforme observado na Figura 2.8 os *molecular features* variaram de 221 a 676 m/z para o modo positivo e 91 a 887 m/z para o modo negativo, utilizando a fase extratora composta por C18. Observou-se uma ampla gama de compostos que podem ser detectados utilizando SPME como método de extração, confirmando uma boa e equilibrada cobertura

metabólica, conforme já demonstrados em outros estudos (VUCKOVIC et al., 2011a; VUCKOVIC et al., 2011b; VUCKOVIC; PAWLISZYN, 2011).

No entanto, é evidente que a características dos compostos extraídos depende da fase extratora, nesse caso compostos de média a baixa polaridade serão preferencialmente extraídos, perdendo informações metabólicas em relação à composição de açúcares e aminoácidos por exemplo. Assim, um novo campo para pesquisas poderia ser atribuído, focando no desenvolvimento de novas fases extratores para SPME com características biocompatíveis.

Importante ressaltar que uma fibra de SPME tende a interagir preferencialmente com moléculas livres que estão diretamente relacionadas com o ambiente de amostragem, como um órgão ou fluido biológico. Assim, essa abordagem analítica é bastante promissora na busca de novos biomarcadores com importantes informações biológicas obtidas em tempo real de determinado organismo vivo em estudo.

4.2.2 Análise comparativa entre camundongos com tumor de Ehrlich induzido e camundongos controle utilizando SPME *in vivo*

Os dados após serem pré-processados utilizando o MZmine foram exportados para o formato .csv e processados utilizando a ferramenta online *MetaboAnalyst* (<http://www.metaboanalyst.ca/>). A matriz dos dados foi transformada utilizando log na base 10 e em seguida escalada através do método de Pareto.

Inicialmente, foi realizada uma análise de componentes principais (PCA) com os dados analisados no modo positivo e negativo, com o intuito de verificar o comportamento dos QCs em relação à repetibilidade e estabilidade instrumental. Como pode-se observar na Figura 2.9, os QCs apresentaram bom agrupamento e em relação às amostras não foi observado nenhum *outlier*.

FIGURA 2.9. Score plot PCA entre os grupos: 1 – Controle (N), 2 – Tumor de Ehrlich (D) e 3 – *Quality Controls* (QCs) extraídos por SPME *in vivo* e analisados por LC-MS no modo positivo (A) e modo negativo (B).

FONTE: Autoria própria.

Os grupos de controle e tumor de Ehrlich não apresentaram discriminação utilizando PCA, uma vez que se trata de uma análise não supervisionada, o que provavelmente mínimas diferenças entre os grupos não foram suficientes para separação entre eles. Dessa forma, o conjunto de dados foi submetido à análise supervisionada PLS-DA, objetivando extrair os metabólitos importantes pela diferenciação entre as amostras, conforme Figura 2.10.

FIGURA 2.10. Score plot PLS-DA entre os grupos: 1 – Controle (N) e 2 – Tumor de Ehrlich (D) extraídos por SPME *in vivo* e analisados por LC-MS no modo positivo (A) e modo negativo (B).

FONTE: Autoria própria.

TABELA 2.4. Parâmetros estatísticos obtidos na validação dos modelos de PLS-DA para o conjunto de amostras: 1 – Controle (N) e 2 – Tumor de Ehrlich extraídos utilizando SPME *in vivo*. Onde: A) análises no modo positivo e B) análises no modo negativo.

A – modo positivo					
Medida	Componente 1	Componente 2	Componente 3	Componente 4	Componente 5
Precisão	0,3125	0,3125	0,3125	0,3750	0,3125
R²	0,8736	0,9823	0,99724	0,9995	0,9999
Q²	-0,2805	-0,2358	-0,2287	-0,2079	-0,2045

B – modo negativo					
Medida	Componente 1	Componente 2	Componente 3	Componente 4	Componente 5
Precisão	0,8421	0,8421	0,8421	0,7895	0,7368
R²	0,6437	0,8249	0,9318	0,9848	0,9952
Q²	0,3429	0,5685	0,5451	0,4441	0,4378

FONTE: Autoria própria.

Além do valor de precisão e ajuste do modelo (R^2), o valor de Q^2 é considerado um dos parâmetros estatísticos mais importantes de um modelo de PLS-DA, o qual indica se realmente houve uma boa discriminação entre os grupos em estudo ou não. Ou seja, o valor de Q^2 está diretamente relacionado ao poder de previsão do modelo, que no caso desse trabalho foi obtido através da validação cruzada (LINDGREN et al., 1996).

Na PLS-DA, o vetor de resposta y é composto pelas marcações das classes dos grupos em estudo -1 e 1 (ou 0 e 1). Na validação cruzada, uma parte do conjunto de dados é então “prevista” pelo modelo, e assim uma soma do erro de predição é obtido em relação a essas amostras, designado como valor de PRESS, conforme Equação 3:

$$PRESS = \sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2$$

Equação 3

Onde $\hat{y}_i$ representa uma previsão real na qual a amostra i não foi utilizada na construção do modelo. O valor de Q^2 é então calculado da seguinte forma:

$$Q^2 = 1 - \frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{\sum_i (y_i - \bar{y})^2} = 1 - \frac{PRESS}{TSS}$$

Equação 4

Sendo na Equação 4 o termo TSS refere-se à soma total dos quadrados que é uma constante e o termo PRESS refere-se quão bem as amostras foram classificadas. Dessa forma quanto maior o valor de Q^2 melhor a previsão do modelo, em geral $Q^2 \geq 0,4$ são considerados bons (WESTERHUIS et al., 2008).

Diante do exposto, pode-se observar para o conjunto de dados analisados no modo positivo, que embora o modelo de PLS-DA tenha apresentado boa separação entre os grupos obtidos pela extração *in vivo* por SPME, o parâmetro estatístico de previsão (Q^2) apresentou valor inferior a zero, o que impede a validação do modelo para esse conjunto de dado. Assim, apenas os dados no modo negativo foram analisados em relação aos metabólitos importantes na discriminação entre os grupos.

Após a obtenção dos modelos de predição, a seleção dos *molecular features* responsáveis pela discriminação entre o grupo de amostras extraídos por SPME *in vivo* (camundongos com tumor de Ehrlich induzido e controles) foram avaliados. Para tal, foram utilizados os seguintes parâmetros: $VIP \geq 1,0$; *fold change* ≥ 2 e p-valor $\leq 0,05$ utilizando análise univariada não-paramétrica (Tabela 2.5), além disso na Figura 2.11 pode-se observar os *boxplots* para os *features* considerados relevantes.

TABELA 2.5. Tentativa de identificação dos metabólitos significativos entre as amostras provenientes da extração por SPME in vivo (modo negativo).

<i>Molecular feature</i>	VIP	<i>Fold Change</i> (Ehrlich/Controle)	p-valor	Identificação	Diferença de massa (Da)	Fórmula	Aduto	<i>Pathways envolvidos</i>
283,2679	1,66	4,48	$2,2 \times 10^{-5}$	Ácido esteárico	0,004	C ₁₈ H ₃₅ O ₂	[M-H] ⁻	mapa00061 Biossíntese de ácidos graxos mapa01040 Biossíntese de ácidos graxos insaturados
281,2573	1,51	3,92	$2,6 \times 10^{-4}$	Ácido oléico	0,009	C ₁₈ H ₃₃ O ₂	[M-H] ⁻	mapa00061 Biossíntese de ácidos graxos mapa01040 Biossíntese de ácidos graxos insaturados
437,2656	1,83	11,19	$9,7 \times 10^{-4}$	LPA(18:0)	0,002	C ₂₁ H ₄₂ O ₇ P	[M-H] ⁻	mapa00561 Metabolismo dos glicerolípidos mapa00564 Metabolismo dos glicerofosfolípidos mapa04070 Sistema de sinalização de fosfatidilinositol mapa04072 Caminho de sinalização de fosfolipase D mapa04666 Fagocitose mediada por Fc gamma R mapa05200 Caminhos em câncer mapa05231 Metabolismo da colina no câncer
887,6046	1,98	18,85	$9,7 \times 10^{-4}$	PI (36:0)	0,026	C ₄₅ H ₈₉ O ₁₂ P	[M+Cl] ⁻	C00626 – não encontrado
152,9888	1,60	6,40	$9,7 \times 10^{-4}$	Ácido succínico	0,007	C ₄ H ₆ O ₄	[M+Cl] ⁻	mapa04922 Caminho de sinalização de glucagon mapa05230 Metabolismo central do carbono no câncer

TABELA 2.5 (continuação). Tentativa de identificação dos metabólitos significativos entre as amostras provenientes da extração por SPME in vivo (modo negativo).

<i>Molecular feature</i>	VIP	<i>Fold Change</i> (Ehrlich/Controle)	p-valor	Identificação	Diferença de massa (Da)	Fórmula	Aduto	<i>Pathways envolvidos</i>
303,2370	1,60	4,13	$2,1 \times 10^{-3}$	Ácido araquidônico	0,004	$C_{20}H_{31}O_2$	$[M-H]^-$	mapa00590 Metabolismo do ácido araquidônico mapa00591 Metabolismo do ácido linoléico mapa04666 Fagocitose mediada por Fc gamma R mapa04217 Necroptosis map04750 Regulação do mediador inflamatório dos canais TRP
409,2573	1,58	6,88	$4,1 \times 10^{-3}$	PGF2alpha-11-acetate methyl ester	0,002	$C_{23}H_{37}O_6$	$[M-H]^-$	-
581,3530	1,85	15,42	$1,3 \times 10^{-2}$	cholest-5,24-dien-3beta-ol 3-O-beta-D-glucopyranoside	0,008	$C_{33}H_{54}O_6$	$[M+Cl]^-$	-

FONTE: Autoria própria.

FIGURA 2.11. VIP *plot* das 9 variáveis com maior influência no modelo de PLS-DA referente às análises das amostras obtidas pela extração por SPME *in vivo*. Do lado direito os *boxplots* para os *features* representando as variações em cada grupo de amostra. Onde 1: grupo de camundongos com tumor de Ehrlich induzido e 2: grupo de camundongos controle.

FONTE: Autoria própria.

A análise do impacto das vias metabólicas envolvendo os compostos com diferença significativa entre os grupos em estudo foi realizada utilizando também a ferramenta *MetaboAnalyst*. Na Tabela 2.6 e Figura 2.12 podem ser visualizadas quais vias metabólicas e seus respectivos impactos no organismo em questão (*Mus musculus*).

TABELA 2.6. Resultados das vias metabólicas em relação aos respectivos impactos causados.

Name do <i>Pathway</i>	p- valor	Impacto
Metabolismo de glicerolipídeos	0,062	0,019
Ciclo do citrato (TCA)	0,069	0,026
Metabolismo de glicerofosfolipídeos	0,102	0,198
Metabolismo do ácido araquidônico	0,121	0,326

FONTE: Autoria própria.

FIGURA 2.12. Impacto das vias metabólicas identificadas para alguns metabólitos significativamente diferentes entre os grupos de amostras extraídas por SPME *in vivo* em camundongos com tumor de Ehrlich induzido e camundongos controle. O eixo X representa o impacto da via metabólica em relação à via correspondente no metabolismo do animal. E o eixo Y refere-se ao p – valor. Onde: A) Metabolismo da alanina, aspartato e glutamato; B) Metabolismo do butanoato; C) Metabolismo do propanoato; D) Biosíntese de ácido graxo; E) Biosíntese de ácidos graxos insaturados; F) Metabolismo de glicerolipídeos; G) Ciclo do citrato (TCA); H) Metabolismo de glicerofosfolipídeos; I) Metabolismo do ácido araquidônico.

FONTE: Autoria própria, utilizando a base de dados online *Metaboanalyst* (<http://www.metaboanalyst.ca/>).

Na Figura 2.13 estão demonstrados os cromatogramas de íons extraídos referentes ao metabólitos considerados significativamente relevantes entre os grupos de camundongos com tumor de Ehrlich induzido e camundongos controle extraídos via SPME *in vivo*. Como esperado, todos os picos tiveram intensidade relativamente baixa, devido à baixa capacidade extratora da técnica utilizada (SPME), sendo uma desvantagem ao se tratar de metabólitos em baixíssimas quantidades na matriz. Contudo, considerando a capacidade de *clean-up* tem-se uma grande vantagem devido à minimização do efeito de matriz quando comparado com técnicas clássicas de preparo de amostra, como por exemplo precipitação de proteínas.

FIGURA 2.13. Cromatogramas de íons extraídos (XIC) referentes ao metabólitos considerados significativamente relevantes em relação à discriminação entre as amostras extraídas por SPME *in vivo* analisadas no modo negativo.

FONTE: Autoria própria, utilizando o software *DataAnalysis* (Bruker).

Observa-se que a maioria dos metabólitos com maior peso na discriminação entre os grupos avaliados neste capítulo são da classe de lipídeos, resultado este já esperado, devido à característica da fase extratora utilizada para realização da SPME (C18). As vias metabólicas envolvidas se assemelham às vias relacionadas às amostras de plasma como relatado no Capítulo 1 dessa tese, demonstrando a importância de estudos lipidômicos a cerca do câncer de mama, em busca de novos biomarcadores e vias terapêuticas.

5 CONCLUSÕES

Neste estudo foi demonstrado a capacidade de técnica de SPME *in vivo* aplicada à análise metabolômica. Através do delineamento experimental aqui proposto, pôde-se observar melhores resultados no modo negativo, uma vez que o modelo obtido pelos dados referentes ao modo positivo não apresentou boa previsibilidade (Q^2) invalidando o modelo.

Os resultados do presente trabalho indicam que o SPME *in vivo* pode ser utilizado como técnica promissora para amostragem em fluidos biológicos (fluido tumoral). Os dados obtidos mostraram que o método oferece enriquecimento de metabólitos livres na matriz, que podem estar diretamente relacionados à patologia em estudo.

A extração pôde ser realizada com o tempo de 10 min e dessorção de 20 min, onde após o processamento dos dados obtidos por LC-MS foi possível detectar 142 e 78 *features* pelos modos positivo e negativo, respectivamente.

Para o modo negativo o modelo obtido apresentou bons parâmetros estatísticos e assim revelando alguns possíveis biomarcadores entre os dois grupos em estudo, destacando-se alguns ácidos graxos, o ácido lisofosfatídico (LPA 18:0), o fosfatidilinositol (PI 36:0) e os derivados de colesterol. As vias metabólicas mais impactadas foram o metabolismo do ácido araquidônico e o de glicerofosfolipídeos, concordando com os resultados mostrados no primeiro capítulo dessa tese.

Além disso, a SPME pode ser considerada uma técnica de amostragem menos invasiva, podendo ser utilizada *in situ* e facilitando uma cobertura metabólica de compostos lábeis, especialmente em estudos em animais, onde a invasividade mínima é um importante fator. Portanto, é uma técnica que aliada a ferramentas analíticas de *high-throughput* pode ser considerada promissora para fins diagnósticos.

REFERÊNCIAS

- ABOAGYE, E.O.; BHUJWALLA, Z.M., Malignant transformation alters membrane choline phospholipid metabolism of human mammary epithelial cells. **Cancer Research**, v. 59, n. 1 p. 80-84, 1999.
- ACKERMANN, B. L.; HALE, J. E.; DUFFIN, K. L. The Role of Mass Spectrometry in Biomarker Discovery and Measurement. **Current Drug Metabolism**. v. 7 , n. 5, 525-539, 2006.
- ANTIGNAC, J.-P.; COURANT, F.; PINEL, G.; BICHON, E.; MONTEAU, F.; ELLIOTT, C.; LE BIZEC, B. Mass spectrometry-based metabolomics applied to the chemical safety of food, **Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, n. 2, 292-301, 2011.
- ARTHUR, C. L.; PAWLISZYN, J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. **Analytical Chemistry**, v. 62, n. 19, 2145-2148, 1990.
- AUBRY, A.F. LC-MS/MS bioanalytical challenge: ultra-high sensitivity assays. **Bioanalysis**, v. 16, n. 3, 1819–1825, 2011.
- BANDU, R.; MOK, H. J.; KIM, K. P. Phospholipids as cancer biomarkers: Mass spectrometry-based analysis. **Mass Spectrometry Reviews**, 2016. DOI: 10.1002/mas.21510.
- BARTEL, J.; KRUMSIEK, J.; THEIS, F. J. Statistical methods for the analysis of high-throughput metabolomics data. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 4, n. 5, p. e201301009, 2013.
- BARTKE, N.; HANNUN, Y. A. Bioactive sphingolipids: metabolism and function. **Journal of Lipid Research**, v. 50, n. Supplement, p. S91–S96, 2009.
- BELARDI, R. P.; PAWLISZYN, J. B. The application of chemically modified fused silica fibers in the extraction of organics from water matrix samples and their rapid transfer to capillary columns. **Water pollution research journal of Canada**, v. 24, p. 179–191, 1989.
- BIRJANDI, A. P.; MIRNAGHI, F. S.; BOJKO, B.; WĄSOWICZ, M.; PAWLISZYN, J. Application of solid phase microextraction for quantitation of polyunsaturated Fatty acids in biological fluids. **Analytical chemistry**, v. 86, n. 24, p. 12022–9, 2014.
- BLIGH, E.; DYER, W. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology. **Canadian Journal of Biochemistry**, v. 37, n. 2, p. 911–917, 1959.
- BODEN, G. Obesity and free fatty acids. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 37, n.3, p.635 -646, 2008.
- BROWN, H. A.; MARNETT, L. J. Introduction to lipid biochemistry, metabolism, and signaling. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 10, p. 5817–5820, 2011.
- BRÜGGER, B.; ERBEN, G.; SANDHOFF, R.; WIELAND, F. T.; LEHMANN, W. D. Quantitative analysis of biological membrane lipids at the low picomole level by nano-

electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 6, p. 2339–2344, 1997.

CAJKA, T., FIEHN, O. Comprehensive analysis of lipids in biological systems by liquid chromatography-mass spectrometry. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 61, p. 192–206, 2014.

CALIXTO-CAMPOS, C.; ZARPELON, A. C.; CORRÊA, M.; CARDOSO, R. D. R.; PINHO-RIBEIRO, F. A.; CECCHINI, R.; MOREIRA, E. G.; CRESPIGIO, J.; BERNARDY, C. C. F.; CASAGRANDE, R.; VERRI, W. A. The ehrlich tumor induces pain-like behavior in mice: A novel model of cancer pain for pathophysiological studies and pharmacological screening. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 624815, 2013.

CHUGHTAI, K.; JIANG, L.; GREENWOOD, T. R.; GLUNDE, K.; HEEREN, R. M. A. Mass spectrometry images acylcarnitines, phosphatidylcholines, and sphingomyelin in MDA-MB-231 breast tumor models. **Journal of Lipid Research**, v. 54, n. 2, p. 333–344, 2013.

CÍFKOVÁ, E.; HOLČAPEK, M.; LÍSA, M.; VRÁNA, D.; GATĚK, J.; MELICHAR, B. Determination of lipidomic differences between human breast cancer and surrounding normal tissues using HILIC-HPLC/ESI-MS and multivariate data analysis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, n. 3, p. 991–1002, 2015.

DEAN, J. R.; TOMLINSON, W. R.; MAKOVSKAYA, V.; CUMMING, R.; HETHERIDGE, M.; COMBER, M. Solid-phase microextraction as a method for estimating the octanol-water partition coefficient. **Analytical chemistry**, v. 68, n. 1, p. 130–3, 1996.

DO, T. K. T., HADJI-MINAGLOU, F., ANTONIOTTI, S., FERNANDEZ, X. Secondary metabolites isolation in natural products chemistry: comparison of two semipreparative chromatographic techniques (high pressure liquid chromatography and high performance thin-layer chromatography). **Journal of Chromatography A**, v. 1325, p. 256–260, 2014.

DÓRIA, M. L., COTRIM, Z., MACEDO, B., SIMÕES, C., DOMINGUES, P., HELGUERO, L., DOMINGUES, M. R. Lipidomic approach to identify patterns in phospholipid profiles and define class differences in mammary epithelial and breast cancer cells, **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 133, p. 635–648, 2012.

DÓRIA, M. L.; COTRIM, C. Z.; SIMÕES, C.; MACEDO, B.; DOMINGUES, P.; DOMINGUES, M. R.; HELGUERO, L. A. Lipidomic analysis of phospholipids from human mammary epithelial and breast cancer cell lines. **Journal of Cellular Physiology**, v. 228, n. 2, p. 457–468, 2013.

EHRLICH, P.; APOLANT, H. Beobachtungen über maligne Mausetumoren. **Berl. Klin. Wschr.**, v. 28, p. 871–874, 1905.

ELIYAHU, G., KREIZMAN, T., DEGANI, H., Phosphocholine as a biomarker of breast cancer: Molecular and biochemical studies. **International Journal of Cancer**, v. 120, n. 8, p. 1721–1730, 2007.

FALVELLA, F. S.; PASCALE, R. M.; GARIBOLDI, M.; MANENTI, G.; DE MIGLIO, M. R.; SIMILE, M. M.; DRAGANI, T. A.; FEO, F. Stearoyl-CoA desaturase 1 (Scd1) gene

overexpression is associated with genetic predisposition to hepatocarcinogenesis in mice and rats. **Carcinogenesis**, v. 23, n. 11, p. 1933–1936, 2002.

FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; DIKSHIT, R.; ESER, S.; MATHERS, C.; REBELO, M.; PARKIN, D. M.; FORMAN, D.; BRAY, F. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International Journal of Cancer**, v. 136, n. 5, p. E359–E386, 2015.

FONVILLE, J. M.; RICHARDS, S. E.; BARTON, R. H.; BOULANGE, C. L.; EBBELS, T. M. D.; NICHOLSON, J. K.; HOLMES, E.; DUMAS, M. E. The evolution of partial least squares models and related chemometric approaches in metabonomics and metabolic phenotyping. **Journal of Chemometrics**, v. 24, n.11-12, p. 636–649, 2010.

FRITZ, V.; BENFODDA, Z.; RODIER, G.; HENRIQUET, C.; IBORRA, F.; AVANCÈS, C.; ALLORY, Y.; DE LA TAILLE, A.; CULINE, S.; BLANCOU, H.; CRISTOL, J. P.; MICHEL, F.; SARDET, C.; FAJAS, L. Abrogation of de novo lipogenesis by stearyl-CoA desaturase 1 inhibition interferes with oncogenic signaling and blocks prostate cancer progression in mice. **Molecular cancer therapeutics**, v. 9, n. 6, p. 1740–54, 2010.

GERMAN, J. B.; GILLIES, L. A.; SMILOWITZ, J. T.; ZIVKOVIC, A. M.; WATKINS, S. M. Lipidomics and lipid profiling in metabolomics. **Current Opinion in Lipidology**, v. 18, n.1, p. 66-71, 2007.

GERSZTEN, R. E.; WANG, T. J. The search for new cardiovascular biomarkers. **Nature**, v. 451, n. 7181, p. 949–952, 2008.

GLUNDE, K., JIE, C., BHUJWALLA, Z.M., Molecular Causes of the Aberrant Choline Phospholipid Metabolism in Breast Cancer. **Cancer Research**, v. 64, n.12, p.4270-4276, 2004.

GOLLAND, P., LIANG, F., MUKHERJEE, S., PANCHENKO, D., Permutation tests for classification. **Lecture notes in Computer Science**, v. 3559, p. 501-515, 2005.

HAMMAD, L.A., G. WU, M.M. SALEH, I. KLOUCKOVA, L.E. DOBROLECKI, R.J. HICKEY, L. SCHNAPER, M.V. Novotny, and Y. Mechref, Elevated levels of hydroxylated phosphocholine lipids in the blood serum of breast cancer patients. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 23, n. 6, p. 863-876, 2009.

HAN, X.; YANG, K.; GROSS, R. W. Multi-dimensional mass spectrometry-based shotgun lipidomics and novel strategies for lipidomic analyses. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 31, n.1, p.134 - 178, 2012.

HAOULA, Z.; RAVIPATI, S.; STEKEL, D. J.; ORTORI, C. A.; HODGMAN, C.; DAYKIN, C.; RAINE-FENNING, N.; BARRETT, D. A.; ATIOMO, W. Lipidomic analysis of plasma samples from women with polycystic ovary syndrome. **Metabolomics**, v. 11, n. 3, p. 657–666, 2015.

HILVO, M.; DENKERT, C.; LEHTINEN, L.; MÄLLER, B.; BROCKMÄLLER, S.; SEPPÄNEN-LAAKSO, T.; BUDCZIES, J.; BUCHER, E.; YETUKURI, L.; CASTILLO, S.; BERG, E.; NYGREN, H.; SYSI-AHO, M.; GRIFFIN, J. L.; FIEHN, O.; LOIBL, S.;

RICHTER-EHRENSTEIN, C.; RADKE, C.; HYÖTYLÄINEN, T.; KALLIONIEMI, O.; ILJIN, K.; OREŠIČ, M. Novel theranostic opportunities offered by characterization of altered membrane lipid metabolism in breast cancer progression. **Cancer Research**, v. 71, n. 9, p. 3236–3245, 2011.

HILVO, M.; GADE, S.; HYÖTYLÄINEN, T.; NEKLJUDOVA, V.; SEPPÄNEN-LAAKSO, T.; SYSI-AHO, M.; UNTCH, M.; HUOBER, J.; VON MINCKWITZ, G.; DENKERT, C.; ORESIC, M.; LOIBL, S.; HYÖTYLÄINEN, T.; NEKLJUDOVA, V.; SEPPÄNEN-LAAKSO, T.; SYSI-AHO, M.; UNTCH, M.; HUOBER, J.; VON MINCKWITZ, G.; DENKERT, C.; OREŠIČ, M.; LOIBL, S.; HYÖTYLÄINEN, T.; NEKLJUDOVA, V.; SEPPÄNEN-LAAKSO, T.; SYSI-AHO, M.; UNTCH, M.; HUOBER, J.; VON MINCKWITZ, G.; DENKERT, C.; ORESIC, M.; LOIBL, S.; HYÖTYLÄINEN, T.; NEKLJUDOVA, V.; SEPPÄNEN-LAAKSO, T.; SYSI-AHO, M.; UNTCH, M.; HUOBER, J.; MINCKWITZ, G. von; DENKERT, C.; OREŠIČ, M.; LOIBL, S. Monounsaturated fatty acids in serum triacylglycerols are associated with response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients. **International Journal of Cancer**, v. 134, n. 7, p. 1725–1733, 2014.

HIRASAWA, A.; TSUMAYA, K.; AWAJI, T.; KATSUMA, S.; ADACHI, T.; YAMADA, M.; SUGIMOTO, Y.; MIYAZAKI, S.; TSUJIMOTO, G. Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. **Nature Medicine**, v. 11, n. 1, p. 90–94, 2005.

<http://www2.inca.gov.br/>, acesso em novembro de 2017.

JONES, D. P.; PARK, Y.; ZIEGLER, T. R. Nutritional metabolomics: progress in addressing complexity in diet and health. **Annual Review of Nutrition**, v. 32, p. 183–202, 2012.

KAHN, S. E.; HULL, R. L.; UTZSCHNEIDER, K. M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 840–846, 2006.

KAMPHORST, J. J.; CROSS, J. R.; FAN, J.; DE STANCHINA, E.; MATHEW, R.; WHITE, E. P.; THOMPSON, C. B.; RABINOWITZ, J. D. Hypoxic and Ras-transformed cells support growth by scavenging unsaturated fatty acids from lysophospholipids. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 22, p. 8882–8887, 2013.

KANG, H. S.; LEE, S. C.; PARK, Y. S.; JEON, Y. E.; LEE, J. H.; JUNG, S. Y.; PARK, I. H.; JANG, S. H.; PARK, H. M.; YOO, C. W.; PARK, S. H.; HAN, S. Y.; KIM, K. P.; KIM, Y. H.; RO, J.; KIM, H. K. Protein and lipid MALDI profiles classify breast cancers according to the intrinsic subtype. **BMC Cancer**, v. 11, p. 465–574, 2011.

KAWASHIMA, M.; IWAMOTO, N.; KAWAGUCHI-SAKITA, N.; SUGIMOTO, M.; UENO, T.; MIKAMI, Y.; TERASAWA, K.; SATO, T. A.; TANAKA, K.; SHIMIZU, K.; TOI, M. High-resolution imaging mass spectrometry reveals detailed spatial distribution of phosphatidylinositols in human breast cancer. **Cancer Science**, v. 104, n. 10, p. 1372–1379, 2013.

KIM, H.-Y.; LEE, K.-M.; KIM, S.-H.; KWON, Y.-J.; CHUN, Y.-J.; CHOI, H.-K. Comparative metabolic and lipidomic profiling of human breast cancer cells with different metastatic potentials. **Oncotarget**, v. 7, n. 41, p. 67111–67128, 2016.

KOULMAN, A., CAO, M., FAVILLE, M., LANE, G., MACE, W., RASMUSSEN, S. Semi-quantitative and structural metabolic phenotyping by direct infusion ion trap mass spectrometry and its application in genetical metabolomics. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 23, n.15, p. 2253-2263, 2009.

LACORTE, S.; FERNANDEZ-ALBA, A. R. Time of flight mass spectrometry applied to the liquid chromatographic analysis of pesticides in water and food. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 25, n. 6, p. 866–880, 2006.

LINDGREN, F.; HANSEN, B.; KARCHER, W. Model Validation By Permutation Tests : **Journal of Chemometrics**, v. 10, p. 521–532, 1996.

LIU, C.; GÓMEZ-RÍOS, G. A.; SCHNEIDER, B. B.; LE BLANC, J. C. Y.; REYES-GARCÉS, N.; ARNOLD, D. W.; COVEY, T. R.; PAWLISZYN, J. Fast quantitation of opioid isomers in human plasma by differential mobility spectrometry/mass spectrometry via SPME/open-port probe sampling interface. **Analytica Chimica Acta**, v. 991, p. 89–94, 2017.

LORD, H. L. Strategies for interfacing solid-phase microextraction with liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1152, n. 1-2, p. 2-13, 2007.

LORD, H. L.; GRANT, R. P.; WALLES, M.; INCLEDON, B.; FAHIE, B.; PAWLISZYN, J. B. Development and evaluation of a solid-phase microextraction probe for *in vivo* pharmacokinetic studies. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 19, p. 5103–5115, 2003.

LUYIMBAZI, D.; AKCAKANAT, A.; MCAULIFFE, P. F.; ZHANG, L.; SINGH, G.; GONZALEZ-ANGULO, A. M.; CHEN, H.; DO, K.-A.; ZHENG, Y.; HUNG, M.-C.; MILLS, G. B.; MERIC-BERNSTAM, F. Rapamycin regulates stearyl CoA desaturase 1 expression in breast cancer. **Molecular cancer therapeutics**, v. 9, n. 10, p. 2770–84, 2010.

LV, W.; YANG, T. Identification of possible biomarkers for breast cancer from free fatty acid profiles determined by GC-MS and multivariate statistical analysis. **Clinical Biochemistry**, v. 45, n. 1–2, p. 127–133, 2012.

MATOS DO CANTO, L.; MARIAN, C.; VARGHESE, R. S.; AHN, J.; DA CUNHA, P. A.; WILLEY, S.; SIDAWY, M.; RONE, J. D.; CHEEMA, A. K.; LUTA, G.; NEZAMI RANJBAR, M. R.; RESSOM, H. W.; HADDAD, B. R. Metabolomic profiling of breast tumors using ductal fluid. **International journal of oncology**, v. 49, n. 6, p. 2245–2254, 2016.

MERCURI, O., DE TOMAS, M. E., DE ANTUENO, R. J. *In vitro* conversion of saturated to monounsaturated fatty acid by Ehrlich ascites cells. **Lipids**, v. 16, n. 12, p. 893-896, 1981.

MIKKELSEN, S. R., CORTÓN, E., **Bioanalytical Chemistry**, New Jersey: John Wiley, 2016, 382 p.

MIN, H. K.; KONG, G.; MOON, M. H. Quantitative analysis of urinary phospholipids found in patients with breast cancer by nanoflow liquid chromatography-tandem mass spectrometry: II. Negative ion mode analysis of four phospholipid classes. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 396, n. 3, p. 1273–1280, 2010.

NAGAHASHI, M.; TSUCHIDA, J.; MORO, K.; HASEGAWA, M.; TATSUDA, K.; WOELFEL, I. A.; TAKABE, K.; WAKAI, T. High levels of sphingolipids in human breast cancer. **Journal of Surgical Research**, v. 204, n. 2, p. 435–444, 2016.

NELSON, D. L., COX, M. M. *Princípios de bioquímica de Lehninger*. 6ed. **Porto Alegre: Artmed**, 2014, 1328 p.

NOVOTNY, M. V.; SOINI, H. A.; MECHREF, Y. Biochemical individuality reflected in chromatographic, electrophoretic and mass-spectrometric profiles. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 866, n. 1-2, p.26-47, 2008.

PATON, C. M.; NTAMBI, J. M. Biochemical and physiological function of stearyl-CoA desaturase. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 297, n. 1, p. E28-37, 2009.

PAWLISZYN, J. **Applications of solid phase microextraction**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1999, 252 p.

PAYRASTRE, B.; MISSY, K.; GIURIATO, S.; BODIN, S.; PLANTAVID, M.; GRATACAP, M. P. Phosphoinositides: Key players in cell signalling, in time and space. **Cellular Signalling**, v. 13, n. 6, p. 377-387, 2001.

PODO, F., SARDANELLI, F., IORIO, E., CANESE, R., CARPINELLI, G., FAUSTO, A., CANEVARI, S., Abnormal choline phospholipid metabolism in breast and ovary cancer:molecular bases for Noninvasive Imaging approaches. **Current Medical Imaging Reviews**, v.3; p. 123–37, 2007.

QUEHENBERGER, O.; ARMANDO, A. M.; BROWN, A. H.; MILNE, S. B.; MYERS, D. S.; MERRILL, A. H.; BANDYOPADHYAY, S.; JONES, K. N.; KELLY, S.; SHANER, R. L.; SULLARDS, C. M.; WANG, E.; MURPHY, R. C.; BARKLEY, R. M.; LEIKER, T. J.; RAETZ, C. R. H.; GUAN, Z.; LAIRD, G. M.; SIX, D. A.; RUSSELL, D. W.; MCDONALD, J. G.; SUBRAMANIAM, S.; FAHY, E.; DENNIS, E. A. Lipidomics reveals a remarkable diversity of lipids in human plasma. **Journal of Lipid Research**, v. 51, n. 11, p. 3299–3305, 2010.

QUINTO, M.; SPADACCINO, G.; PALERMO, C.; CENTONZE, D. Determination of aflatoxins in cereal flours by solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography and post-column photochemical derivatization-fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 49, p. 8636–8641, 2009.

RAPAKA, R. S.; PIOMELLI, D.; SPIEGEL, S.; BAZAN, N.; DENNIS, E. A. Targeted lipidomics: Signaling lipids and drugs of abuse. **Prostaglandins and Other Lipid Mediators**, v. 77, n1-4, p.223-234, 2005.

RYAN, D.; ROBARDS, K. Metabolomics: The greatest omics of them all? **Analytical Chemistry**, v. 78, n.23, p. 7954-7958, 2006.

SAGRATINI, G.; MAÑES, J.; GIARDINÁ, D.; DAMIANI, P.; PICÓ, Y. Analysis of carbamate and phenylurea pesticide residues in fruit juices by solid-phase microextraction and

liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1147, n. 2, p. 135–143, 2007.

SAITO, K.; MATSUDA, F. Metabolomics for functional genomics, systems biology, and biotechnology. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, p. 463–489, 2010.

SCHILLER, J.; SÜS, R.; ARNHOLD, J.; FUCHS, B.; LESSI, J.; MÜLLER, M.; PETKOVIĆ, M.; SPALTEHOLZ, H.; ZSCHÖRNIG, O.; ARNOLD, K. Matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry in lipid and phospholipid research. **Progress in Lipid Research**, v. 43, n. 5, p.449-488, 2004.

SEPPÄNEN-LAAKSO, T.; OREŠIČ, M. How to study lipidomes. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 42, n.3, p. 185-910, 2009.

SILVA, A. E., SANTOS, F. G. A., CASSALI, G. D. Cell proliferation markers for evaluating the growth of solid and ascitic forms of Ehrlich tumor. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n.4, p. 658 – 661, 2006.

SILVA, C.; CAVACO, C.; PERESTRELO, R.; PEREIRA, J.; CÂMARA, J. Microextraction by Packed Sorbent (MEPS) and Solid-Phase Microextraction (SPME) as Sample Preparation Procedures for the Metabolomic Profiling of Urine. **Metabolites**, v. 4, n. 1, p. 71–97, 2014.

SZÁSZ, A. M.; GYÖRFFY, B.; MARKO-VARGA, G. **Cancer heterogeneity determined by functional proteomics**Seminars in Cell and Developmental Biology, 2017. .

TOGUNDE, O. P.; OAKES, K. D.; SERVOS, M. R.; PAWLISZYN, J. Determination of pharmaceutical residues in fish bile by solid-phase microextraction couple with liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). **Environmental Science and Technology**, v. 46, n. 10, p. 5302–5309, 2012.

VAN DEN BERG, R. A.; HOEFSLOOT, H. C. J.; WESTERHUIS, J. A.; SMILDE, A. K.; VAN DER WERF, M. J. Centering, scaling, and transformations: Improving the biological information content of metabolomics data. **BMC Genomics**, v. 7, p. 142-157, 2006.

VAN DER GREEF, J.; SMILDE, A. K. Symbiosis of chemometrics and metabolomics: Past, present, and future. **Journal of Chemometrics**, v. 19, n.5-7, p.376-786, 2005.

VANGAVETI, V. N.; JANSEN, H.; KENNEDY, R. L.; MALABU, U. H. Hydroxyoctadecadienoic acids: Oxidised derivatives of linoleic acid and their role in inflammation associated with metabolic syndrome and cancer. **European Journal of Pharmacology**, v. 785, p. 70–76, 2016.

VIAANT, M. R.; SOMMER, U. Mass spectrometry based environmental metabolomics: A primer and review. **Metabolomics**, v. 9, S-1, p.144-158, 2013.

VUCKOVIC, D, SHIREY, R., CHEN, Y., SIDISKY, L., AURAND, C., STENERSON, K., PAWLISZYN, J. In vitro evaluation of new biocompatible coatings for solid-phase microextraction: Implications for drug analysis and *in vivo* sampling applications. **Analytica Chimica Acta**, v. 638, n. 2, p.175 – 185, 2009.

VUCKOVIC, D.; DE LANNOY, I.; GIEN, B.; SHIREY, R. E.; SIDISKY, L. M.; DUTTA, S.; PAWLISZYN, J. *In vivo* solid-phase microextraction: Capturing the elusive portion of metabolome. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 50, n. 23, p. 5344–5348, 2011a.

VUCKOVIC, D.; DE LANNOY, I.; GIEN, B.; YANG, Y.; MUSTEATA, F. M.; SHIREY, R.; SIDISKY, L.; PAWLISZYN, J. *In vivo* solid-phase microextraction for single rodent pharmacokinetics studies of carbamazepine and carbamazepine-10,11-epoxide in mice. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 21, p. 3367–3375, 2011b.

VUCKOVIC, D.; PAWLISZYN, J. Systematic evaluation of solid-phase microextraction coatings for untargeted metabolomic profiling of biological fluids by liquid chromatography-mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 83, n. 6, p. 1944–1954, 2011.

WAITE, M.; PARCE, B.; MORTON, R.; CUNNINGHAM, C. The Deacylation and Reacylation of Phosphoglyceride in Microsomes of Morris Hepatoma 7777 and Host Rat Liver. **Cancer Research**, v. 37, p. 2092–2098, 1977.

WANT, E. J., MASSON, P., MICHPOULOS, F., WILSON, I. D., THEODORIDIS, G., PLUMB, R. S., SHOCKCOR, J., LOFTUS, N., HOLMES, E., NICHOLSON, J. K. Global metabolic profiling of animal and human tissues via UPLC-MS. **Nature Protocols**, v. 8, n. 1, p. 17 – 32, 2013.

WATSON, A. D. Thematic review series: systems biology approaches to metabolic and cardiovascular disorders. Lipidomics: a global approach to lipid analysis in biological systems. **J Lipid Res**, v. 47, n. 10, p. 2101–2111, 2006.

WATT, A. P., MORRISON, D., LOCKER, K. L., EVANS, D. C. Higher throughput bioanalysis by automation of a protein precipitation assay using a 96-well format with detection by LC-MS/MS. **Analytical Chemistry**, v. 72, n. 5, p. 979 – 984, 2000.

WEI, S., LIU, L., ZHANG, J., BOWERS, J., GOWDA, G.A., SEEGER, H., FEHM, T., NEUBAUER, H. J., VOGEL, U., CLARE, S.E., RAFTERY, D. Metabolomics approach for predicting response to neoadjuvant chemotherapy for breast cancer. **Molecular Oncology**, v. 7, n. 3, p. 297-307, 2013.

WEIJERS, R. N. M. Lipid composition of cell membranes and its relevance in type 2 diabetes mellitus. **Current diabetes reviews**, v. 8, p. 390–400, 2012.

WENK, M. R. The emerging field of lipidomics. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4., n.7, p. 594-610, 2005.

WESTERHUIS, J. A.; VAN VELZEN, E. J. J.; HOEFSLOOT, H. C. J.; SMILDE, A. K. Discriminant Q2(DQ2) for improved discrimination in PLS-DA models. **Metabolomics**, v. 4, n. 4, p. 293–296, 2008.

WICKRAMASEKARA, S. I., ZANDKARIMI, F., MORRÉ, J., KIRKWOOD, J., LEGETTE, L., JIANG, Y., GOMBART, A. F., STEVENS, J. F., MAIER, C. S. Electrospray Quadrupole Travelling Wave Ion Mobility Time-of-Flight Mass Spectrometry for the Detection of Plasma

Metabolome Changes Caused by Xanthohumol in Obese Zucker (fa/fa) Rats. **Metabolites**, v. 3, p. 701-717, 2013.

WILSON e WALKER. Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology, 7ed, 352 p.

WORLEY, B.; POWERS, R. Multivariate Analysis in Metabolomics. **Current Metabolomics**, v. 1, n. 1, p. 92–107, 2012.

XIA, J., WISHART, D. S., Using MetaboAnalyst 3.0 for Comprehensive Metabolomics Data Analysis. **Current Protocols in Bioinformatics**, v. 55, n. 14, p. 1-14, 2016.

ZEHEHOFER, N.; PINTO, D. M. Recent developments in tandem mass spectrometry for lipidomic analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 627, n.1, p. 62-70, 2008.

ZHANG, X.; ES-HAGHI, A.; MUSTEATA, F. M.; OUYANG, G.; PAWLISZYN, J. Quantitative *in vivo* microsampling for pharmacokinetic studies based on an integrated solid-phase microextraction system. **Analytical Chemistry**, v.79, n. 12, 4507–4513, 2007.

ZHAO, L.; NICHOLSON, J. K.; LU, A.; WANG, Z.; TANG, H.; HOLMES, E.; SHEN, J.; ZHANG, X.; LI, J. V; LINDON, J. C. J. Targeting the human genome-microbiome axis for drug discovery: inspirations from global systems biology and traditional Chinese medicine. **Journal of Proteome Research**. v. 11, n.7, 3509-3519, 2012.

ZHOU, S. N.; OAKES, K. D.; SERVOS, M. R.; Pawliszyn, J. Application of solid-phase microextraction for *in vivo* laboratory and field sampling of pharmaceuticals in fish. **Environmental Science & Technology**, v. 42, n.16, p. 6073–9, 2008.

ANEXO I

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Utilização de ferramentas bioanalíticas para estudo metabólico em modelo animal: busca de novos biomarcadores tumorais", registrada com o Protocolo CEUA/FCF/CAR: 09/2016, sob a responsabilidade de Fabiana Aparecida Marques e Prof. Dr. Emanuel Carrilho - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da UNESP em reunião de 07 de julho de 2016.

Finalidade	☐ Ensino ☒ Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Abril de 2020
Espécie/linhagem/raça	Camundongo Swiss
Nº de animais	10
Peso/Idade	18 a 25 g 4 a 6 semanas
Sexo	Fêmea
Origem	UNESP - Araraquara

Araraquara, 19 de Julho de 2016.

Prof. Dr. CARLOS CESAR CRESTANI
Coordenador da CEUA

MIX ÁCIDO GRAXOS - GLC-566 - COMPOSIÇÃO		
Ácido graxo	WEIGHT (%)	MM (g / mol)
C8:0	4	144,2
C9:0	1	158,2
C10:0	2	172,2
C11:0	3	186,3
C11:1	1	184,3
C12:0	5	200,3
C12:1	3	198,3
C13:0	1	214,3
C13:1	2	212,3
C14:0	5	228,4
C14:1	1	226,4
C15:0	3	242,4
C16:0	5	256,4
C16:1	1	254,4
C17:0	2	270,5
C18:0	1	284,5
C18:1	5	282,5
C18:1	2	282,5
C18:2	4	280,5
C18:3	3	278,4
C18:3	1	278,4
C20:0	4	312,5
C20:1	1	310,5
C20:2	3	308,5
C20:3	2	306,5
C20:3	1	306,5
C20:4	5	304,5
C20:5	3	302,5
C22:0	1	340,6
C22:1	4	338,6
C22:2	2	336,6
C22:3	1	334,5
C22:4	4	332,5
C22:5	1	330,5
C22:6	5	328,5
C23:0	4	354,6
C24:0	1	368,6
C24:1	3	366,6

ANEXO II

ANEXO III – Fluxograma geral do tratamento de dados utilizado nesse trabalho.