UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)

Joseana de Oliveira

Identificação de alterações bioquímicas em células epiteliais bronquiais humanas (BEAS-2B) expostas a fumarato

São Paulo

2020

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)

Joseana de Oliveira

Identificação de alterações bioquímicas em células epiteliais bronquiais humanas (BEAS-2B) expostas a fumarato

Versão corrigida da Dissertação conforme Resolução CoPGr 6018/2011

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia).

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula de Melo Loureiro

São Paulo

2020

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

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

O48i Oliveira, Joseana de
Identificação de alterações bioquímicas em células epiteliais bronquiais humanas normais expostas a fumarato. / Joseana de Oliveira. -- São Paulo, 2020.
142p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia).
Orientador: Loureiro, Ana Paula de Melo.

1. Bioquímica. 2. Metabolismo. 3. Toxicologia. I. T. II. Loureiro, Ana Paula de Melo, orientador.

615.9 CDD

Joseana de Oliveira

Identificação de alterações bioquímicas em células epiteliais bronquiais humanas (BEAS-2B) expostas a fumarato

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia).

Aprovado em:

Banca Examinadora

Profa. Dra. Ana Paula de Melo Loureiro

orientador/presidente

_____

1º examinador

_____

2º examinador

_____

3º examinador

_____

4º examinador

São Paulo, ____ de _____ de 2020.

APOIO FINANCEIRO

FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

- Processo 2016/20925-7

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

- Bolsa de Mestrado
- Auxílio Financeiro (Processo 429184/2016-6)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Profa. Dra. Ana Paula de Melo Loureiro pela orientação rigorosa, extremamente rica e necessária para conduzir esta dissertação de mestrado. Agradeço aos meus parceiros de laboratório Everson Fialho, Giovanna Silva, Matheus Relvas, Taina Cury e João Moreno pelo companheirismo diário, além de muitas trocas de leituras, diálogos e discussões. Em especial agradeço imensamente ao Everson Fialho "Ever" ao qual a ajuda foi fundamental para o desenvolvimento dos experimentos laboratoriais, além do que nossa amizade foi além do muro dessa universidade. Muito obrigada.

Meus agradecimentos a minha família: mãe querida Dorismar e irmãs Adriana e Fabiana, por sentir muito orgulho de mim e não economizar incentivos. Devo minha eterna gratidão aos meus grandes amigos: Paula Felice, Leandro Boldrin e Marcel Khaled, ao qual contribuíram muito para minhas reflexões e fizeram muito por mim ao longo desses anos. Não poderia deixar de citar minha velha amiga Paloma Carvalho do Carmo, não tenho como descrever tamanha reciprocidade em uma amizade. Você é demais. Muito obrigada.

Agradeço as amizades que fiz do laboratório do prof Maurício Yonamine: Gabi, Ana, Felipe, Katia e Jeferson que me acolheram com muito afeto em momentos difíceis. Também agradeço aos amigos da comissão do SIMPAC: Guilherme, Maylla, Branquinho, Maysa, Maria Carmem, Fernando e Thais, a realização desse evento foi crucial para a junção afetiva dos departamentos.

Agradeço pelo amistoso acolhimento dos professores Elizabeth Nascimento e Ernani Pinto. Aos professores: Sylvia Stuch, Sandra Farsky, Tania Marcourakis, Maurício Yonamine. E aos professores de Instituto de Química da Universidade de São Paulo: Paolo Di Mascio, Massuo Jorge Kato, Marina Franco Maggi Tavares agradeço por colocar à disposição a área experimental e o laboratório. Não poderia deixar de ressaltar a Andrea Faccio ao qual a participação foi fundamental para a finalização deste projeto. Muito obrigada pela paciência.

Gostaria de agradecer a Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo pelo amparo institucional de sempre e a todos os professores, colegas, alunos e funcionários. Em especial ao Marcelo Sylvestre, Krisley Ghilardi e Elaine Ishiko pela ajuda e incentivo diário além do trabalho deles.

Agradeço ao apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (de agosto de 2017 a julho de 2019), pela concessão da bolsa de mestrado e ao apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP. Essas agencias foram fundamentais para o desenvolvimento da pesquisa.

Estou imensamente grata a toda vivência profissional, educacional, sociocultural e antropológica adquirida durante esses anos.

“Madame Curie, a viúva do ilustre sábio tão tragicamente morto, inicia o seu curso na Sorbonne 5 de novembro uma e meia da tarde. Madame Curie exporá a teoria dos íons nos gases, e tratará da radioatividade (...) falará num “anfiteatro de curso”. Ora, esses anfiteatros contêm vinte e cinco lugares mais ou menos, na maior parte ocupada por estudantes. O público e a imprensa, que também possuí direitos, terão que contentar-se com uns vinte lugares no máximo! Em vista dessa circunstância, o que é única na vida da Sorbonne, não seria possível torcer o regulamento e por à disposição de Madame Curie, para a sua primeira aula, um anfiteatro grande?”

Eve Curie, 1949. (PUGLIESE, 2009).

RESUMO

de OLIVEIRA, J **Identificação de alterações bioquímicas em células epiteliais bronquiais humanas normais expostas a fumarato.** 2020. 143f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2020.

A reprogramação metabólica de células do câncer é apontada como uma característica essencial para o desenvolvimento da doença (*cancer hallmark*). Estudos mostram que mutações na enzima fumarato hidratase levam ao aumento da concentração intra e extracelular de fumarato, o que ocorre paralelamente à indução da transformação maligna. Neste trabalho, a fim de entender se o excesso de fumarato extracelular pode propiciar a transformação de células normais, foram quantificados alguns *endpoints* relacionados aos efeitos do fumarato e à transformação maligna, além de alterações metabólicas em células imortalizadas de epitélio brônquico humano normal (BEAS-2B) expostas ao fumarato. Uma vez que fumarato nas concentrações de 0,1 a 10 mM ao longo de 144 h não foi citotóxico, foram selecionadas as concentrações de 1 mM, 5 mM e 10 mM para as incubações. Fumarato induziu a formação de colônias em *soft-agar* após o período de sete dias (168 h) de exposição, o que indica a indução de transformação celular. Fumarato é um oncometabólito que inibe enzimas que dependem de α-cetoglutarato como co-substrato, dentre as quais as enzimas *ten eleven translocation* (TET) que catalisam a formação de 5-hidroximetilcitosina (5-hmC) a partir de 5-metilcitosina (5-mC), o primeiro passo da sequência de reações que levam à desmetilação do DNA. Os níveis totais de 5-hmC estavam diminuídos no DNA das células expostas. Colônias retiradas do *soft-agar* (controle, 1, 5 e 10 mM de fumarato) foram cultivadas e, após 90 dias em cultura, as células foram submetidas ao ensaio de invasão e migração em câmara de Boyden (*transwell*), tendo sido observada maior capacidade de migração/invasão das células anteriormente expostas ao fumarato. Foi observada indução de estresse redox nas células expostas ao fumarato. A partir da quantificação de metabólitos intracelulares por HPLC-ESI-MS/MS e HPLC-ESI-Q-TOF, verificamos que as células BEAS-2B absorveram o fumarato adicionado ao meio de cultura, o qual foi convertido intracelularmente a malato, aspartato, argininosuccinato, citrato, succinato e glutamato. O oncometabólito 2-L-hidroxiglutarato foi detectado em níveis aumentados nas células expostas a fumarato, assim como adenosina, enquanto que NAD^+ e $NADP^+$ apareceram diminuídos. As alterações metabólicas na presença de fumarato contribuíram para a manutenção do balanço energético das células, ou mesmo para um saldo positivo de energia. A exposição das células a [$^{13}C_4$]fumarato permitiu a análise do fluxo inicial do fumarato absorvido pelas células. A partir dessa análise verificamos que o fumarato absorvido entra no ciclo de Krebs, gerando malato, que é em grande parte desviado para reações externas ao ciclo, como a geração de aspartato e argininosuccinato. Citrato proveniente das reações de [$^{13}C_4$]fumarato no ciclo de Krebs foi detectado em níveis inferiores aos endógenos. O uso de [$^{13}C_4$]fumarato permitiu a visualização da geração de [$^{13}C_4$]succinato, que tem como possível fonte a atividade reversa da succinato desidrogenase. Verificamos também a geração de [$^{13}C_3$]glutamato. Supõe-se que as alterações metabólicas induzidas pelo

fumarato absorvido pelas células BEAS-2B contribuam para a modulação da expressão de genes e da atividade de proteínas que favorecem o processo tumorigênico.

Palavras-chave: oncometabólito, fumarato, transformação celular, epigenética, metabolismo

ABSTRACT

de OLIVEIRA, J **Identification of biochemical changes in normal human bronchial epitelial cells exposed to fumarate.** 2020. 143f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2020.

The metabolic reprogramming of cancer cells is identified as an essential feature for the development of the disease (a cancer hallmark). Studies show that mutations in the enzyme fumarate hydratase lead to increased intra- and extracellular fumarate concentration, which occurs in parallel with the induction of malignant transformation. In this work, in order to understand if excess extracellular fumarate can lead to the transformation of normal cells, some endpoints related to the effects of fumarate and malignant transformation were quantified, as well as metabolic alterations in the immortalized normal human bronchial epithelial cell line BEAS-2B exposed to fumarate. Since fumarate at concentrations from 0.1 to 10 mM over 144 h was not cytotoxic, the concentrations of 1 mM, 5 mM and 10 mM were selected for incubations. Fumarate induced colony formation in soft agar after the seven day (168 h) exposure period, which indicates the induction of cell transformation. Fumarate is an oncometabolite that inhibits α-ketoglutarate-dependent enzymes, among which are ten eleven translocation (TET) enzymes that catalyze the formation of 5-hydroxymethylcytosine (5-hmC) from 5-methylcytosine (5-mC), the first step in the sequence of reactions leading to DNA demethylation. Total 5-hmC levels were decreased in the DNA of exposed cells. Colonies removed from the soft-agar (control, 1, 5 and 10 mM fumarate) were cultured and after 90 days in culture the cells were subjected to the Boyden chamber (transwell) invasion and migration assay, and a greater capacity for migration/invasion of cells previously exposed to fumarate was observed. Redox stress induction was observed in cells exposed to fumarate. From the quantification of intracellular metabolites by HPLC-ESI-MS/MS and HPLC-ESI-Q-TOF, we found that BEAS-2B cells absorbed the fumarate added to the culture medium, which was intracellularly converted to malate, aspartate, argininosuccinate, citrate, succinate and glutamate. The oncometabolite 2-L-hydroxyglutarate was detected at increased levels in cells exposed to fumarate, as well as adenosine, while NAD^+ and $NADP^+$ appeared decreased. Metabolic changes in the presence of fumarate contributed to the maintenance of the energy balance of the cells, or even to a positive energy balance. Exposure of cells to $[^{13}C_4]$fumarate allowed the analysis of the initial flow of the fumarate absorbed by the cells. From this analysis we found that the absorbed fumarate entered the Krebs cycle, generating malate, which was largely diverted to reactions outside the cycle, such as the generation of aspartate and argininosuccinate. Citrate from the reactions of $[^{13}C_4]$fumarate in the Krebs cycle was detected at levels lower than endogenous. The use of $[^{13}C_4]$fumarate allowed the detection of $[^{13}C_4]$succinate, which has as its possible source the reverse activity of succinate dehydrogenase. We also observed the generation of $[^{13}C_3]$glutamate. The metabolic changes induced by the absorbed fumarate are supposed to contribute to the modulation of gene expression and protein activity that favor the tumorigenic process.

Keywords: oncometabolite, fumarate, cell transformation, epigenetics, metabolism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Reações bioquímicas do ciclo TCA, representação adaptada de Anderson e colaboradores (2018) (ANDERSON et al., 2018). **37**

Figura 2 – Representação da regulação do fator induzível por hipóxia (HIFα). Adaptação de Yang (2014) (YANG et al., 2014). **38**

Figura 3 – Produtos da reação de fumarato com arginina no citoplasma das células. Figura adaptada de Sullivan e colaboradores (2016) (SULLIVAN; GUI; VAN DER HEIDEN, 2016). **40**

Figura 4 – **A.** Eletroforese em gel de agarose 3%. PCR para teste de *Mycoplasma sp* no meio de cultura. PM = padrão de peso molecular com tamanho de 1000 pares de base (pb); CN = controle negativo; CP = controle positivo; amostras A1 e A2. **B.** Imagens de microscopia para visualização da morfologia celular após suplementação do meio de cultura de células BEAS-2B com fumarato (1, 5 10 mM) por 144 horas. **66**

Figura 5 – Crescimento das células BEAS-2B expostas a fumarato (0,1, 1, 5 e 10 mM). As análises foram feitas utilizando o método do CVD conforme descrito em Material e Métodos. Asteriscos indicam a significância das diferenças entre o grupo exposto ao fumarato e o grupo controle em cada tempo, ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, * $p < 0,05$; N = 4 ou 5. **67**

Figura 6 – Atividade mitocondrial de células BEAS-2B expostas a diferentes concentrações de fumarato. A análise da atividade da cadeia respiratória mitocondrial utilizando o ensaio do MTT foi realizado conforme descrito em Material e Métodos. Asteriscos indicam a significância das diferenças entre o grupo exposto ao fumarato e o grupo controle em cada tempo, ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, *$p < 0.05$, **p < **68**

0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001; N = 4 ou 5.

Figura 7 – Tempo de duplicação da população de células (PDT, média ± desvio padrão) calculado para o período de crescimento exponencial (72 a 120 h). **69**

Figura 8 – Análise do ciclo de células BEAS-2B expostas a fumarato (1, 5 e 10 mM) por 24, 72, 96 e 144 h (N=4). As fases do ciclo celular (subG0, G0/G1, S e G2/M) e as porcentagens de células em cada fase estão apresentadas. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, **** p < 0.0001 em relação ao controle, ANOVA com teste de comparações múltiplas de Dunnett. **71**

Figura 9 – **A.** Imagens de microscopia para visualização das colônias crescidas no *soft agar*. **B.** Contagem de colônias em meio semissólido *soft-agar* após 168 h de exposição das células BEAS-2B a diferentes concentrações de fumarato, e do grupo controle (N = 5). ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, *p < 0.05, ****p < 0.0001. **73**

Figura 10 – **A.** Colônias removidas do *soft-agar* e que foram, na sequência, mantidas por 90 dias em cultura, com repiques realizados ao atingirem a confluência. **B.** Esquema do desenho experimental para os ensaios de transformação e invasão de células BEAS-2B. Colônias crescidas no meio semissólido *soft-agar* foram coletadas e cultivadas separadamente em poços para cada grupo de exposição prévia (controle, 1 mM, 5 mM e 10 mM). Após a aderência das colônias nos poços, células crescidas ao redor da colônia foram cultivadas durante 90 dias com trocas do meio de cultura a cada 72 horas e tripsinização ao atingirem 80% de confluência. Para o ensaio de transwell, essas células foram tripsinizadas e plaqueadas para a câmara de Boyden. **C.** Análise da invasão em câmara de Boyden (*transwell*) das células das colônias após 90 dias em cultura. As exposições ao fumarato ocorreram por 168 h antes da transferência para o *soft-agar*. **D.** *Population Doubling Time* **75**

(PDT) das células obtidas a partir das colônias, após 90 dias em cultura. Asteriscos indicam a significância das diferenças entre o grupo exposto ao fumarato e o grupo controle, ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, *p < 0,05, **p < 0,01; N = 3 ou 4.

Figura 11 – **A.** Quantificação de 5-mC e 5-hmC no DNA das células BEAS-2B após 168 h de exposição a diferentes concentrações de fumarato, e do grupo controle (N = 3 a 5). Os dados foram obtidos como descrito em Material e Métodos. Sem diferenças estatísticas, ANOVA com teste de comparações múltiplas de Dunnett. **B.** Quantificação de 5-mC e 5-hmC no DNA das células BEAS-2B que permaneceram em cultura por 22 dias após 168 h de exposição a diferentes concentrações de fumarato, e do grupo controle (N = 3 a 5). Os dados foram obtidos como descrito em Material e Métodos. *p < 0.05, **p < 0.01, ANOVA com teste de comparações múltiplas de Dunnett. **C.** Quantificação de 5-mC e 5-hmC no DNA das células BEAS-2B que cresceram no *soft-agar* após 168 h de exposição a diferentes concentrações de fumarato, e do grupo controle (N = 3 a 5). Os dados foram obtidos como descrito em Material e Métodos. Sem diferenças estatísticas, ANOVA com teste de comparações múltiplas de Dunnett. **77**

Figura 12 – Análise da geração de ROS intracelular em células BEAS-2B expostas por 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a fumarato (1, 5 e 10 mM), grupo controle, e grupo controle positivo (H_2O_2), N = 5. Média ± erro padrão, *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001 em relação ao controle. **80**

Figura 13 – Níveis do produto MDA-DNPH no meio de cultura ao longo de 168 h de exposição das células BEAS-2B a 1, 5 e 10 mM de fumarato e no grupo controle, N = 4 ou 5, média ± erro padrão. Asteriscos indicam a significância das diferenças entre o grupo exposto ao fumarato e o grupo **81**

controle em cada tempo, ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, *p < 0.05, **p < 0.01, ***P < 0,001.

Figura 14 – Análise da taxa de consumo de glicose de células BEAS-2B após 24, 48, 96 e144 horas de incubação com diferentes concentrações de fumarato e do grupo controle, N=4. Asteriscos indicam a significância das diferenças entre o grupo exposto ao fumarato e o grupo controle em cada tempo, ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, *p < 0.05. **82**

Figura 15 – Visão geral dos níveis das moléculas quantificadas nas células BEAS-2B expostas por 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a 1, 5 e 10 mM de fumarato e grupo controle. São apresentadas as médias ao longo do tempo. Os maiores níveis em cada linha são apresentados na cor vermelha intensa. É possível visualizar alterações ao longo do tempo para os períodos 48 – 96 h e 120 – 168 h. **88**

Figura 16 – Níveis de fumarato em células BEAS-2B expostas por 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a 1, 5 e 10 mM de fumarato e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período para visualização das alterações significativas. Média ± erro padrão, *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001 em relação ao controle. **89**

Figura 17 – Níveis de arginina em células BEAS-2B expostas por 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a 1, 5 e 10 mM de fumarato e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período para visualização das alterações significativas. Média ± erro padrão, *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001 em relação ao controle. **90**

Figura 18 – Níveis de argininosuccinato em células BEAS-2B expostas por 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a 1, 5 e 10 mM de fumarato e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período para visualização das alterações significativas. Média ± erro padrão, *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001 em relação ao controle. **91**

Figura 19 – Níveis de aspartato em células BEAS-2B expostas por 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a 1, 5 e 10 mM de fumarato e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período para visualização das alterações significativas. Média ± erro padrão, *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001 em relação ao controle. **92**

Figura 20 – Níveis de asparagina em células BEAS-2B expostas por 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a 1, 5 e 10 mM de fumarato e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período para visualização das alterações significativas. Média ± erro padrão, *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001 em relação ao controle. **93**

Figura 21 – Níveis de glutamina em células BEAS-2B expostas por 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a 1, 5 e 10 mM de fumarato e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período para visualização das alterações significativas. Média ± erro padrão, *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001 em relação ao **94**

controle.

Figura 22 – Níveis de glutamato em células BEAS-2B expostas por 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a 1, 5 e 10 mM de fumarato e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período para visualização das alterações significativas. Média ± erro padrão, *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001 em relação ao controle. **95**

Figura 23 – Razão glutamina/glutamato em células BEAS-2B expostas por 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a 1, 5 e 10 mM de fumarato e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período para visualização das alterações significativas. Média ± erro padrão, *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001 em relação ao controle. **96**

Figura 24 – Níveis de malato em células BEAS-2B expostas por 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a 1, 5 e 10 mM de fumarato e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período para visualização das alterações significativas. Média ± erro padrão, *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001 em relação ao controle. **97**

Figura 25 – Níveis de succinato em células BEAS-2B expostas por 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a 1, 5 e 10 mM de fumarato e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período para visualização das alterações significativas. Média ± erro padrão, *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, **98**

*P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001 em relação ao controle.

Figura 26 – Níveis de citrato em células BEAS-2B expostas por 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a 1, 5 e 10 mM de fumarato e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período para visualização das alterações significativas. Média ± erro padrão, *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001 em relação ao controle. **99**

Figura 27 – Níveis de lactato em células BEAS-2B expostas por 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a 1, 5 e 10 mM de fumarato e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período para visualização das alterações significativas. Média ± erro padrão, *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001 em relação ao controle. **100**

Figura 28 – Níveis de 2-L-hidroxiglutarato em células BEAS-2B expostas por 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a 1, 5 e 10 mM de fumarato e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período para visualização das alterações significativas. Média ± erro padrão, *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001 em relação ao controle. **101**

Figura 29 – Níveis de NAD^+ em células BEAS-2B expostas por 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a 1, 5 e 10 mM de fumarato e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período para visualização das alterações significativas. Média ± erro **102**

padrão, *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001 em relação ao controle.

Figura 30 – Níveis de $NADP^+$ em células BEAS-2B expostas por 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a 1, 5 e 10 mM de fumarato e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período para visualização das alterações significativas. Média ± erro padrão, *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001 em relação ao controle. **103**

Figura 31 – Níveis de adenosina em células BEAS-2B expostas por 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a 1, 5 e 10 mM de fumarato e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período para visualização das alterações significativas. Média ± erro padrão, *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001 em relação ao controle. **104**

Figura 32 – Níveis de AMP em células BEAS-2B expostas por 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a 1, 5 e 10 mM de fumarato e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período para visualização das alterações significativas. Média ± erro padrão, *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001 em relação ao controle. **105**

Figura 33 – Níveis de ADP em células BEAS-2B expostas por 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a 1, 5 e 10 mM de fumarato e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em **106**

cada período para visualização das alterações significativas. Média ± erro padrão, *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001 em relação ao controle.

Figura 34 – Níveis de ATP em células BEAS-2B expostas por 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a 1, 5 e 10 mM de fumarato e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período para visualização das alterações significativas. Média ± erro padrão, *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001 em relação ao controle. **107**

Figura 35 – Razão ATP/AMP em células BEAS-2B expostas por 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a 1, 5 e 10 mM de fumarato e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período para visualização das alterações significativas. Média ± erro padrão, *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001 em relação ao controle. **108**

Figura 36 – Razão ATP/ADP em células BEAS-2B expostas por 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a 1, 5 e 10 mM de fumarato e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período para visualização das alterações significativas. Média ± erro padrão, *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001 em relação ao controle. **109**

Figura 37 – Destinos metabólicos da glutamina (Figura retirada de Altman *et al.*, 2016) (ALTMAN; STINE; DANG, 2016). **110**

Figura 38 – *Shuttle* malato-aspartato (Figura retirada de French (2015) (FRENCH, 2015). **110**

Figura 39 – Via interconectada do metabolismo dos aminoácidos não essenciais. Glutamina e glutamato têm papel central e podem ser usados para a síntese de outros aminoácidos não essenciais. Glutamato pode ser utilizado para gerar alanina, aspartato, serina e prolina. Aspartato gera asparagina e arginina (CHOI; COLOFF, 2019). **111**

Figura 40 – Aminoácidos e processos celulares dos quais participam. (CHOI; COLOFF, 2019). **112**

Figura 41 – Níveis de [$^{13}C_4$]fumarato e fumarato endógeno em células BEAS-2B expostas por 3, 24, 48, 72, 96 e 120 h a 5 mM de [$^{13}C_4$]fumarato e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período para visualização das alterações significativas. Média ± erro padrão, *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001 em relação ao controle. **114**

Figura 42 – Níveis de [$^{13}C_4$]malato e malato endógeno em células BEAS-2B expostas por 3, 24, 48, 72, 96 e 120 h a 5 mM de [$^{13}C_4$]fumarato e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período para visualização das alterações significativas. Média ± erro padrão, *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001 em relação ao controle. **115**

Figura 43 – Níveis de citrato endógeno (painel superior) e [$^{13}C_4$]citrato (painel inferior) em células BEAS-2B expostas por 3, 24, 48, 72, 96 e 120 h a 5 mM de [$^{13}C_4$]fumarato e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período para **116**

visualização das alterações significativas. Média ± erro padrão, teste t não pareado, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001 em relação ao controle.

Figura 44 – Níveis de aspartato endógeno (painel superior) e [$^{13}C_4$]aspartato (painel inferior) em células BEAS-2B expostas por 3, 24, 48, 72, 96 e 120 h a 5 mM de [$^{13}C_4$]fumarato e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período para visualização das alterações significativas. Média ± erro padrão, teste t não pareado, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001 em relação ao controle. **117**

Figura 45 – Níveis de succinato endógeno (painel superior) e [$^{13}C_4$]succinato (painel inferior) em células BEAS-2B expostas por 3, 24, 48, 72, 96 e 120 h a 5 mM de [$^{13}C_4$]fumarato e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período para visualização das alterações significativas. Média ± erro padrão, teste t não pareado, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001 em relação ao controle. **118**

Figura 46 – Níveis de [$^{13}C_4$]argininosuccinato e argininosuccinato endógeno em células BEAS-2B expostas por 3, 24, 48, 72, 96 e 120 h a 5 mM de [$^{13}C_4$]fumarato e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período para visualização das alterações significativas. Média ± erro padrão, *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001 em relação ao controle. **119**

Figura 47 – Níveis de glutamato endógeno (painel superior) e [$^{13}C_3$]glutamato (painel inferior) em células BEAS-2B expostas por 3, 24, 48, 72, 96 e 120 h a 5 mM de [$^{13}C_4$]fumarato e grupo controle. São apresentados os níveis ao **120**

longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período para visualização das alterações significativas. Média ± erro padrão, teste t não pareado, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001 em relação ao controle.

Figura 48 – Cromatogramas sobrepostos dos isótopos do fumarato (*m/z* 115.0041), [$^{13}C_3$]fumarato (*m/z* 118.0142) e [$^{13}C_4$]fumarato (*m/z* 119.00173) em amostra do grupo exposto ao [$^{13}C_4$]fumarato por 120 h. **121**

Figura 49 – Cromatogramas obtidos por HPLC-Q-TOF dos metabólitos analisados, apresentando os íons extraídos das amostras de controle de qualidade puro (vermelho) e amostra de controle de qualidade após a adição do padrão do metabólito correspondente (azul). **122**

Figura 50 – Áreas relativas (metabólito/padrão interno) do fumarato endógeno no controle (cinza), fumarato endógeno nas células expostas a [$^{13}C_4$]fumarato (preto), [$^{13}C_3$]fumarato (azul claro) e [$^{13}C_4$]fumarato (azul escuro) nas células expostas a [$^{13}C_4$]fumarato. Média ± erro padrão, *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001 em relação ao controle; $^{\#}$P < 0,05, $^{\#\#}$P < 0,01, $^{\#\#\#}$P < 0,001, $^{\#\#\#\#}$P < 0,0001 em relação ao grupo fumarato não marcado. **123**

Figura 51 – Áreas relativas (metabólito/padrão interno) do malato endógeno no controle (cinza), malato endógeno nas células expostas a [$^{13}C_4$]fumarato (preto), [$^{13}C_3$]malato (azul claro) e [$^{13}C_4$]malato (azul escuro) nas células expostas a [$^{13}C_4$]fumarato. Média ± erro padrão, *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001 em relação ao controle; $^{\#}$P < 0,05, $^{\#\#}$P < 0,01, $^{\#\#\#}$P < 0,001, $^{\#\#\#\#}$P < 0,0001 em relação ao grupo malato não marcado **124**

Figura 52 – Áreas relativas (metabólito/padrão interno) do glutamato endógeno no **125**

controle (cinza), glutamato endógeno (preto) e [$^{13}C_3$]glutamato (azul) nas células expostas a [$^{13}C_4$]fumarato. Média ± erro padrão, *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001 em relação ao controle.

Figura 53 – Áreas relativas (metabólito/padrão interno) do aspartato endógeno no controle (cinza), aspartato endógeno (preto) e [$^{13}C_4$]aspartato (azul) nas células expostas a [$^{13}C_4$]fumarato. Média ± erro padrão, *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001 em relação ao controle; $^{\#}$P < 0,05, $^{\#\#}$P < 0,01, $^{\#\#\#}$P < 0,001, $^{\#\#\#\#}$P < 0,0001 em relação ao grupo aspartato não marcado. **126**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Fragmentações e energias utilizadas para análises dos níveis de metilação e hidroximetilação do DNA de células BEAS-2B (DP: potencial de dissociação; CE: energia de colisão; CXP: potencial de saída da célula). **54**

Tabela 2 – Fragmentações e energias utilizadas para quantificação de metabólitos (Método 1) em células BEAS-2B (DP: potencial de dissociação; CE: energia de colisão; CXP: potencial de saída da célula). **59**

Tabela 3 – Fragmentações e energias utilizadas para quantificação de metabólitos (Método 2) em células BEAS-2B (DP: potencial de dissociação; CE: energia de colisão; CXP: potencial de saída da célula). **61**

Tabela 4 – Fragmentações e energias utilizadas para quantificação de metabólitos (Método 3) em células BEAS-2B (DP: potencial de dissociação; CE: energia de colisão; CXP: potencial de saída da célula). **62**

Tabela 5 – Fragmentações e energias utilizadas para quantificação dos isótopos de intermediários metabólicos em células BEAS-2B expostas a [$^{13}C_4$]fumarato (DP: potencial de dissociação; CE: energia de colisão; CXP: potencial de saída da célula). **65**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACLY: acetil-CoA carboxilase

ADP adenosina difosfato

ADK: adenosina quinase

AMP: adenosina monofosfato

AMPK: Proteína quinase ativada por AMP

ANOVA: Análise de variância

ASL: argininosuccinato liase

ATP adenosina trifosfato

B[*a*]P: benzo[*a*]pireno

BEAS-2B: células imortalizadas de epitélio brônquico humano normal

BEGM: *Bronchial Epithelial Grow Medium*

CN: Controle negativo

CP: Controle positivo

CpG: citosina-fosfato-guanina

CS: citrato sintase

CVD: Cristal violeta

DCF: 2',7'-diclorofluoresceína

DCFH: 2',7'-diclorodihidrofluoresceína

DCFH-DA: 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína

dG: 2'-desoxicitidina

DMF: dimetilfumarato

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: ácido desoxirribonucleico

DNMT: DNA metiltransferase

DNPH: 2,4-dinitrofenilhidrazina

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

EMT: *epitelial-mesenchymal transition*

FADH *flavin adenine dinucleotide*

FATP: *fatty acid transporter*

FH: fumarato hidratase

GLS: glutaminase

GLUD: glutamato desidrogenase

GLUT: transportador de glicose

GSF: glutationa succinada

GSH: glutationa

HMC-1: linhagem de células de mastócitos humanos

HepG2: células de carcinoma hepatocelular humano

HIF-1α: *hypoxia-inducible transcription factor-1α*

HLRCC: *Hereditary leiomyomatosis and renal cell carcinoma*

H_2O_2: Peróxido de hidrogênio

HPAs: hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

HPLC: Cromatografia líquida de alta eficiência

HPLC-DAD: HPLC acoplado a um detector de arranjos de fotodiodos

HPLC-ESI-Q-TOF: HPLC acoplado a um espectrômetro de massas com analisador do tipo quadupolo-tempo-de-vôo e ionização por *electrospray*

hTERT: telomerase humana

IDH: isocitrato desidrogenase

KEAP1: *Kelch-like ECH-associated protein 1*

KGDHC: α-cetroglutarato desidrogenase

MCF-7: Células de câncer de mama humano

MDA: malonaldeído

MDH: malato desidrogenase

MMF: monometilfumarato

MRM: Monitoramento de reações múltiplas

MT: microambiente tumoral

NA: ácido nicotínico

NAD^+: *Nicotinamide adenine dinucleotide*$^+$

NADP: *nicotinamide adenine dinucleotde phosphate*

NADH *nicotinamide adenine dinucleotide*

NADPH: *nicotinamide adenine dinucleotde phosphate*

NAM: nicotinamida

NMN: nicotinamida mononucleotídeo

NMNAT: nicotinamida mononucleotídeo adenililtransferase

NR: nicotinamida ribosídeo

Nrf2: *fator nuclear eritróide* 2

NSCLC: *non-small-cell lung cancer*

ODDD: domínio de degradação dependente de oxigênio

QC: Controle de qualidade

PBS: salina fosfato tamponada

PCR: Rea;áo em cadeia de polimerase

PDK1: *pyruvate dehydrogenase kinase 1*

PDT *Population doubling time*

PHDs: prolil hidroxilases

PM: Peso molecular

pVHL: von Hippel-Lindau

RB: retinoblastoma

RNA: Ácido ribonucleico

ROS: *reative oxigen species*

SAH: *S*-adenosil-homocisteína

SCL38A: transportador de sódio acoplado ao aminoácido

SCLC: *small-cell lung cancer*

SCS: succinil-CoA sintetase

SDH: succinato desidrogenase

SFB: Soro fetal bovino

TCA *Tricarboxylic acid cycle*

TET: *Ten eleven translocation*

UV/VIS espectroscopia ultravioleta visível

VEGF: *vascular endothelial growth fator*

1N^6-εdA: 1N^6-eteno-2´-desoxiadenosina

2-HG: 2-hidroxiglutarato

5-hmC: 5-hidroximetilcitosina

5-mC: 5-metilcitosina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO **32**

1.1 Apresentação **32**

1.2 Câncer de Pulmão **33**

1.3 Estudo Prévio do Grupo de Pesquisa **34**

1.4 Efeito Warburg **35**

1.5 Oncometabólitos **36**

1.6 Alterações metabólicas mediadas por fatores de transcrição **38**

1.7 Consequências do excesso de fumarato no citoplasma das células **39**

1.8 Oncometabólitos e alterações epigenéticas **40**

1.9 Efeitos do fumarato no balanço redox das células **41**

1.10 Oncometabólitos no câncer **42**

2 OBJETIVOS **45**

2.1 Objetivo Específico **45**

3 MATERIAL E MÉTODOS **46**

3.1 Equipamentos **46**

3.1.1 Equipamentos básicos **46**

3.1.2 Espectrofotômetros **46**

3.1.3 Citometria de Fluxo **47**

3.1.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) **47**

3.1.4.1 HPLC-DAD **47**

3.1.4.2 HPLC-ESI-MS/MS (API4000 QTrap) **47**

3.1.4.3 HPLC-ESI-Q-TOF **47**

3.2 Ensaios Biológicos **48**

3.2.1 Cultivo Celular **48**

3.2.1.1 Cultura de células BEAS-2B **48**

3.2.1.2 Teste PCR para detecção de *Mycoplasma sp* **48**

3.2.2 Exposição das células BEAS-2B ao fumarato **49**

3.2.3 Análise do crescimento e sobrevivência celular após a exposição ao fumarato **49**

3.2.4 Ensaio de tempo de dobramento da população de células (*population* **50**

doubling time, PDT)
3.2.5 Análise da atividade mitocondrial **50**
3.2.6 Análise do consumo de glicose **50**
3.2.7 Formação de colônias em *Soft-agar* **51**
3.2.8 Extração do DNA das células do *soft-agar* **51**
3.2.9 Extração do DNA das células após as exposições **52**
3.2.10 Hidrólise do DNA para as análises de 5-mC e 5-hmC **53**
3.2.11 Quantificação de 5-mC e 5-hmC por HPLC-ESI-MS/MS **54**
3.2.12 Ensaio de invasão e migração em câmara de Boyden (*transwell*) **55**
3.2.13 Análise de fragmentação do DNA e ciclo celular **55**
3.2.14 Geração intracelular de ROS **56**
3.2.15 Quantificação de malonaldeído no meio de cultura por HPLC-DAD **57**
3.2.16 Quantificação dos metabólitos intracelulares **58**
3.2.17 Quantificação de proteínas totais **62**
3.2.18 Análise dos isótopos de intermediários metabólicos por HPLC-ESI-QTOF **62**
3.2.19 Análise dos isótopos de intermediários metabólicos por HPLC-ESI-MS/MS triplo-quadrupolo **63**
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES **66**
4.1 Citotoxidade do fumarato **66**
4.2 Análise da transformação de células BEAS-2B expostas a fumarato **72**
4.3 Efeito do fumarato em marcas epigenéticas **74**
4.4 Efeito do fumarato no estresse redox celular **77**
4.5 Efeito do fumarato em vias metabólicas de células BEAS-2B **80**
5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS **126**
REFERÊNCIAS **128**
ANEXOS **137**

1. INTRODUÇÃO

1.1 Apresentação

O câncer é um problema de saúde pública, apesar dos esforços e avanços para o controle das múltiplas manifestações da doença (TEIXEIRA; FONSECA, 2007). Sabe-se que grande parte dos casos se deve a fatores ambientais, comportamentais e dieta, tais como tabagismo, sedentarismo, contatos com carcinógenos ambientais e infecções, dentre outros (GOLEMIS et al., 2018).

Medidas preventivas, tais como mudanças no estilo de vida, quimioprevenção, triagem para diagnóstico precoce e terapias voltadas a impedir o crescimento do tumor, são importantes estratégias de combate ao câncer (KRSTIC et al., 2019).

A multicelularidade é caracterizada pela cooperação entre células normais para o desenvolvimento, manutenção e reprodução do organismo. As células do câncer desviam este sistema cooperativo multicelular a seu favor (ATHENA AKTIPIS et al., 2015). O processo de carcinogênese ocorre em múltiplas etapas divididas em três fases: iniciação, promoção e progressão. A iniciação corresponde à ocorrência de mutações resultantes da exposição a agentes mutagênicos, havendo pouca ou nenhuma alteração da morfologia e função celular ou tecidual, com proliferação normal das células nessa fase. Na promoção, características como mutações em supressores tumorais e vários outros estímulos conduzem para a formação de um tumor não maligno, que ainda pode regredir na falta dos estímulos necessários. Já na fase de progressão, o tumor adquire uma potente capacidade de proliferação e invasão tecidual (VINCENT; GATENBY, 2008).

Além da célula do câncer favorecer sua replicação por meio da inibição de supressores de tumor, ela também adquire outras características, tais como a resistência à morte, a capacidade de induzir angiogênese e possibilitar a metástase para outros tecidos (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Conhecer os mecanismos pelos quais o câncer se desenvolve é necessário para o desenvolvimento de novos tratamentos e de estratégias preventivas mais eficazes (BYERS; RUDIN, 2015).

1.2 Câncer de pulmão

O câncer de pulmão, mundialmente, foi responsável por aproximadamente 2 milhões de mortes em 2018 (GLOBOCAN, 2018). No Brasil, em 2018, foram estimados 18.740 novos casos de câncer de traqueia, brônquios e pulmões entre homens, e 12.530 entre mulheres (INTITUTO NACIONAL DE CÂNCER - INCA, 2018). Sua principal causa é o hábito de fumar (30% dos casos) e a exposição secundária ao tabaco (20 a 50% dos casos) (BIALOUS; SARNA, 2017) além de exposições a diversos carcinógenos ocupacionais e ambientais, tais como asbestos, arsênio, radônio, cromo, cadmio e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, dentre outros (KASSIE et al., 2010). A alta taxa de mortalidade está relacionada à dificuldade de diagnóstico precoce e ao emprego de tratamentos convencionais aos estágios avançados da doença, o que demanda o desenvolvimento de terapias mais efetivas (DAMIANI et al., 2008; SCRIMA et al., 2012).

Sabe-se que aproximadamente 95% dos cânceres de pulmão podem ser categorizados entre câncer de pulmão de células pequenas (SCLC, do inglês *small-cell lung cancer*) ou câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC, do inglês *non-small-cell lung cancer*). Esta distinção é necessária para o gerenciamento, prognóstico e tratamento (NANAVATY; ALVAREZ; MICHAEL ALBERTS, 2014). SCLC está localizado na parte mais centralizada do pulmão, comumente nas vias aéreas maiores, como brônquios primários e secundários. É considerado um tumor agressivo, caracterizado pelo rápido período de duplicação e metástase precoce, tornando mais difícil a detecção durante os estágios iniciais. Já o NSCLC é frequentemente encontrado na periferia do tecido pulmonar, tornando-o mais acessível à detecção por triagem (NANAVATY; ALVAREZ; MICHAEL ALBERTS, 2014). Essa classe tumoral pode ser dividida em adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas e carcinoma de células grandes (HUANG et al., 2014). NSCLC compreende até 80% de todos os cânceres pulmonares recém-diagnosticados, e mais da metade de todos os pacientes (57%) são diagnosticados com doença metastática (LI et al., 2019). A triagem é uma prática importante para possível detecção precoce e diminuição da taxa de mortalidade, que pode chegar a 85% quando a detecção ocorre em estágio avançado. Quando detectado em estágio inicial, a taxa de cura para NSCLC após a ressecção pode ser superior a 70%, com sobrevida de 5 anos (NANAVATY; ALVAREZ; MICHAEL ALBERTS, 2014).

Muito progresso tem sido feito em pesquisas com foco no rastreamento de câncer de pulmão e terapia de precisão. A cirurgia é o tratamento recomendado para pacientes com estágio I-II de câncer de pulmão NSCLC. Para pacientes que tenham contra-indicações médicas à ressecção cirúrgica ou que recusarem a cirurgia, é recomendado radioterapia. Terapias moleculares direcionadas para pacientes mais jovens com adenocarcinoma pulmonar, para não fumantes e pacientes com aberrações genômicas neoplásicas específicas têm melhor efeito. Para muitos subgrupos de pacientes com NSCLC, futuramente, terapia combinada (usando terapias direcionadas ou imunoterapias) poderia ser uma ótima opção curativa. Novos alvos moleculares são continuamente detectados, levando ao desenvolvimento de novas terapias (HIRSCH et al., 2017).

1.3 Estudo prévio do grupo de pesquisa

Nosso grupo tem utilizado benzo[*a*]pireno (B[*a*]P) como indutor de transformação maligna em células epiteliais bronquiais humanas imortalizadas (BEAS-2B). B[*a*]P é um dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) presentes no processo de combustão de materiais orgânicos, considerado um agente carcinogênico presente na fumaça do cigarro e na poluição do ar (SHRIVASTAVA et al., 2017). Selecionamos as células BEAS-2B para o estudo devido à sua sensibilidade à transformação por estímulos carcinogênicos *in vitro* (XU et al., 2012). É uma linhagem imortalizada pelo vírus SV40, que codifica proteínas ligantes e inativadoras de proteínas reguladoras do crescimento celular, como p53 e o produto do gene do retinoblastoma (RB), processo que libera o crescimento das células (LUNDBERG et al., 2002; RAMIREZ et al., 2004). A linhagem celular imortalizada mantém, no entanto, as características das células progenitoras. É importante constar que a superexpressão da telomerase humana (hTERT) mantém as funções celulares de pRB e p53 (SHIN et al., 2018). Assim, as células BEAS-2B não são tumorigênicas, porém têm a facilidade de se transformar devido à susceptibilidade a mutações (LUNDBERG et al., 2002; RAMIREZ et al., 2004).

A exposição das células BEAS-2B ao B[*a*]P (0,1, 0,5 e 1 µM) ao longo de 168 horas levou a alterações no metabolismo celular, sendo detectado o aumento da concentração de intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico (succinato, fumarato, malato) e de produtos da via glicolítica (piruvato, lactato) ao longo do tempo, além de aumento da taxa de consumo de glicose e aumento

da concentração intracelular de glutamina, glutamato, nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada (NAD^+, do inglês *nicotinamide adenine dinucleotide*$^+$), nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH, do inglês *nicotinamide adenine dinucleotde phosphate*) e adenosina difosfato (ADP). Além do que, este maquinário alterado pode inibir ou ativar uma cascata de enzimas que modificam o padrão de metilação do ácido desoxirribonucleico (DNA), levando a alterações em marcas epigenéticas que podem facilitar a transformação para o fenótipo maligno (trabalho de pós-doutorado do Dr. Tiago Franco de Oliveira intitulado "Transformação de células epiteliais bronquiais humanas por benzo[*a*]pireno: processos metabólicos redox e metilação/desmetilação do DNA", finalizado em 2017).

Observando o aumento dos níveis de intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA, do inglês *Tricarboxylic acid cycle*), principalmente fumarato e succinato, surgiu a hipótese de esses intermediários estarem contribuindo para o processo de carcinogênese induzido pelo B[*a*]P. Sendo assim, um estudo mais detalhado sobre os efeitos do fumarato em células BEAS-2B, independentemente da presença de um carcinógeno como o B[*a*]P, poderia contribuir para a obtenção dessa resposta.

1.4 Efeito Warburg

A mitocôndria é a principal fonte de energia para a manutenção da estrutura, função e replicação celular (SALMINEN et al., 2014). Esta organela possui localizada na sua membrana interna a cadeia de transporte de elétrons, onde ocorre a fosforilação oxidativa geradora de adenosina trifosfato (ATP). Na matriz mitocondrial e na membrana interna da mitocôndria encontram-se componentes do ciclo do TCA, uma via cíclica de reações enzimáticas que oxidam piruvato resultante da glicólise, ácidos graxos e aminoácidos, gerando nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH, do inglês *nicotinamide adenine dinucleotide*) e flavina adenina dinucleotídeo reduzida ($FADH_2$, do inglês *flavin adenine dinucleotide*) que entram na cadeia de transporte de elétrons para a geração de ATP (SALMINEN et al., 2014; TROTTA; CHIPUK, 2017). Disfunções metabólicas são características importantes no processo de tumorigênese, interferindo em funções bioenergéticas, reações de biossíntese e no equilíbrio redox da célula (BADUR; METALLO, 2018).

Células não proliferantes dos tecidos diferenciados, sob condição aeróbica, metabolizam glicose para dióxido de carbono por meio da oxidação de piruvato no TCA, gerando NADH e $FADH_2$ que transferem os elétrons para a cadeia de transporte de elétrons e levam, consequentemente, à geração de ATP. Nesse processo há mínima geração de lactato como produto da via glicolítica. Já sob condição anaeróbica, a fosforilação oxidativa é inibida e as células passam a produzir altas quantidades de lactato a fim de suprir a necessidade energética na falta de oxigênio (HEIDEN; CANTLEY; THOMPSON, 2010). É bem estabelecido na literatura que células tumorais têm um consumo de glicose exacerbado (HEIDEN; CANTLEY; THOMPSON, 2010; SAN-MILLÁN; BROOKS, 2017). Em 1923, Otto Warburg observou em células do câncer o aumento do consumo de glicose e a formação excessiva de lactato mesmo sob condição aeróbica (PAVLOVA; THOMPSON, 2016; SAN-MILLÁN; BROOKS, 2017). Este fenômeno ficou conhecido como "Efeito Warburg" ou "glicólise aeróbica" e foi um dos primeiros relatos de disfunção do metabolismo energético no câncer (HEIDEN; CANTLEY; THOMPSON, 2010).

1.5 Oncometabólitos

O ciclo TCA **(Figura 1)** está envolvido na oxidação de diversos nutrientes, tais como glicose, glutamina e ácidos graxos (ANDERSON et al., 2018). Alterações no metabolismo celular são consideradas de fundamental importância para o fenótipo do câncer. Um dos mais notáveis exemplos de conexão entre metabolismo e câncer é a verificação da existência de oncometabólitos. Oncometabólitos são pequenas moléculas que podem ocorrer em níveis aumentados no câncer devido a alterações de atividades enzimáticas, seja por ocorrência de mutações ou alterações epigenéticas, e que contribuem para o processo carcinogênico. Fumarato, succinato e 2-hidroxiglutarato (2-HG) são moléculas conhecidas como oncometabólitos (SHANMUGASUNDARAM et al., 2014). Mutações nas enzimas succinato desidrogenase (SDH) e fumarato hidratase (FH) provocam acúmulo dos intermediários succinato e fumarato (CAIRNS; HARRIS; MAK, 2011; CYR; DOMANN, 2011; SHANMUGASUNDARAM et al., 2014; LAURENTI; TENNANT, 2016). É descrito que mutações em isocitrato desidrogenase 1 (IDH1) com subsequente geração de altas concentrações de 2-HG (5 – 35 mM) são encontradas em gliomas. Altas concentrações também são encontradas em soro de pacientes com leucemia

mielóide aguda (CAIRNS; HARRIS; MAK, 2011; CYR; DOMANN, 2011). Mutações germinativas no gene da FH levam a uma rara síndrome autossômica dominante conhecida como carcinoma de células renais e leiomiomatose hereditária (HLRCC) (termo em inglês para *Hereditary leiomyomatosis and renal cell carcinoma*). Indivíduos afetados desenvolvem leiomiomas cutâneos e uterinos (SIEGLER et al., 2018). Além destes, sabe-se que inibições das enzimas SDH, IDH e FH estão relacionadas a um risco aumentado de desenvolvimento de tumores, tais como feocromocitoma, paraganglioma, carcinoma gástrico, carcinoma renal, câncer da tireóide e carcinoma do cólon (SELAK et al., 2005; FAVIER et al., 2009; LAURENTI; TENNANT, 2016).

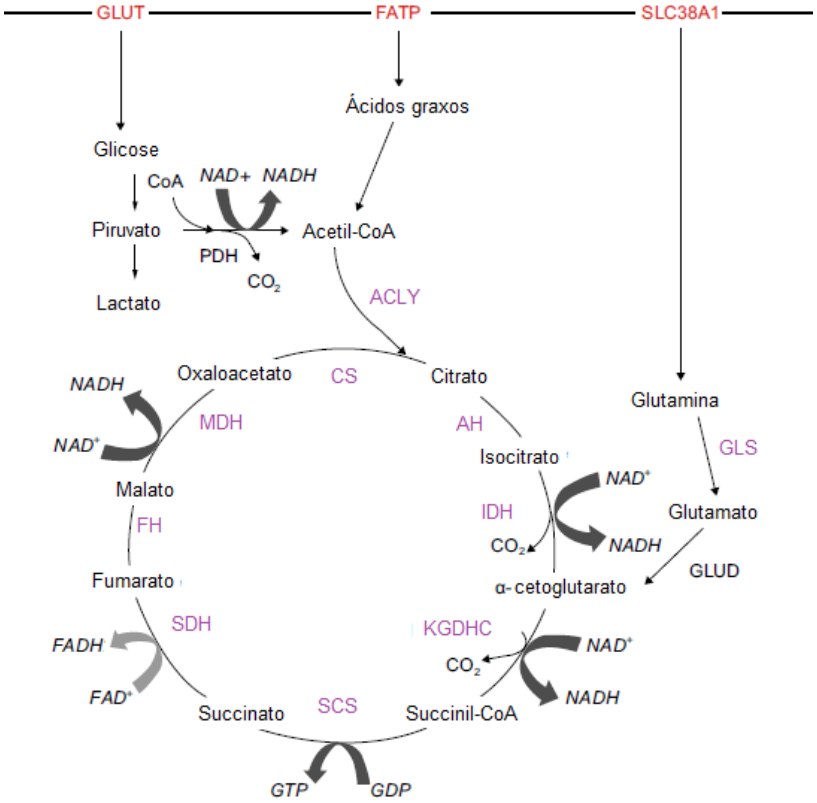

Figura 1 – Reações bioquímicas do ciclo TCA, representação adaptada de Anderson e colaboradores (2018). Reações catalisadas por algumas enzimas levam à geração de nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido (NADH) e flavina adenina dinucleotídeo reduzido ($FADH_2$) que transferem os elétrons para a cadeia de transporte de elétrons, havendo a geração de ATP pela fosforilação oxidativa. Abreviações: citrato sintase (CS), acetil-CoA carboxilase (ACLY), isocitrato desidrogenase (IDH), α-cetroglutarato desidrogenase (KGDHC), succinil-CoA sintetase (SCS), succinato desidrogenase (SDH), fumarato hidratase (FH), malato desidrogenase (MDH), glutamato desidrogenase (GLUD), glutaminase (GLS), transportador de glicose (GLUT), transportador de ácidos graxos (termo em inglês, *fatty acid transporter*, FATP) e transportador de sódio acoplado ao aminoácido (SCL38A) (ANDERSON et al., 2018).

1.6 Alterações metabólicas mediadas por fatores de transcrição

Fatores de transcrição como HIF-1α (termo em inglês *hypoxia-inducible transcription factor-1α*), c-Myc e p53 estão envolvidos na desregulação metabólica celular (HEIDEN; CANTLEY; THOMPSON, 2010; SAN-MILLÁN; BROOKS, 2017). HIF-1α é um regulador transcricional que induz a transcrição de genes em resposta a hipóxia, tais como os genes do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) (termo em inglês, *vascular endothelial growth fator)*, transportadores de glicose (GLUT1) e piruvato desidrogenase quinase 1 (PDK1) (termo em inglês, *pyruvate dehydrogenase kinase 1*) necessários para a sobrevivência celular sob hipóxia (KUO et al., 2016). Sob condição de normóxia, enzimas prolil hidroxilases (PHDs) hidroxilam resíduos de prolina de HIF-1α, permitindo que a proteína von Hippel-Lindau (pVHL) se ligue ao domínio de degradação dependente de oxigênio (ODDD) de HIF-α, levando à sua degradação via proteassomo (CHEN et al., 2011; DESIDERI; VEGLIANTE; CIRIOLO, 2015). As PHDs fazem parte de uma família de dioxigenases dependentes de α-cetoglutarato (ou 2-oxoglutarato), oxigênio, Fe(II) e ascorbato para sua atividade. Assim, sob hipóxia ou na presença de moléculas que competem com α-cetoglutarato pelo sítio de ligação nas PHDs, tais como succinato, fumarato e 2-hidroxiglutarato, há diminuição da atividade de PHDs e maior disponibilidade de HIF-1α para a transcrição de genes que modulam o metabolismo celular (**Figura 2**) (YANG et al., 2014; DESIDERI; VEGLIANTE; CIRIOLO, 2015).

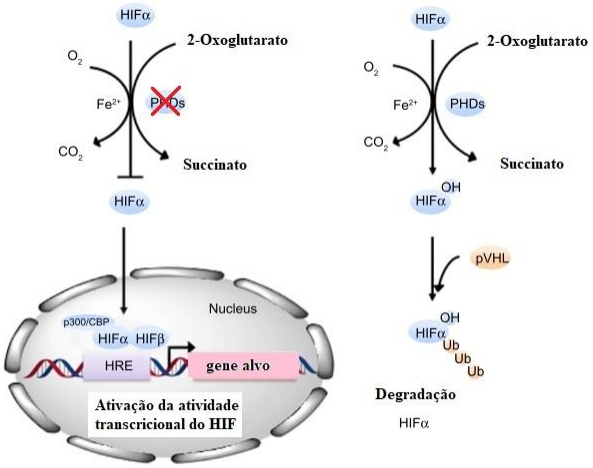

Figura 2 – Representação da regulação do fator induzível por hipóxia (HIFα). Adaptação de (YANG et al., 2014).

Em células tumorais há uma super regulação de HIF-1α mesmo em situação de normóxia, um processo importante para promover a vascularização e a sobrevivência das células (KUO et al., 2016). Células tumorais possuem uma super expressão de enzimas da via glicolítica. Estudos afirmam que transportadores de glicose como GLUT1 e GLUT2 estão expressos em vários tipos de câncer, tais como câncer de mama, pulmão, coloretal, próstata e carcinoma hepatocelular. A super expressão de GLUT está associada ao grau de agressividade tumoral. Além de HIF-1α, mutações nas proteínas p53 e Myc também resultam na desregulação dos transportadores GLUT, facilitando o consumo de glicose por tumores (SAN-MILLÁN; BROOKS, 2017). A vascularidade tumoral está altamente associada com a progressão para metástase (HUI; CHEN, 2015; HIRATA; SAHAI, 2017).

Fumarato e succinato são capazes de inibir PHDs e, consequentemente, a elevada atividade de HIF induz a expressão de genes responsivos à hipóxia mesmo na presença de concentrações normais de oxigênio. Essa alteração facilita a angiogênese e metástase, conduzindo para um câncer mais agressivo (SELAK et al., 2005; KUO et al., 2016). Foi observado aumento dos níveis de HIF-1α e indução dos genes responsivos a hipóxia em tumores contendo mutações nas enzimas FH e SDH e consequente acúmulo de fumarato e succinato (FAVIER et al., 2009). Mutações na enzima isocitrato desidrogenase 1 (IDH1) citosólica e IDH2 mitocondrial fazem com que essas enzimas passem a consumir NADPH para converter α-cetoglutarato em 2-HG. O metabólito 2-HG inibe, competitivamente, oxigenases dependentes de α-cetoglutarato, como as PHDs, resultando também em maior atividade de HIF (CAIRNS; HARRIS; MAK, 2011; CYR; DOMANN, 2011; LAURENTI; TENNANT, 2016).

1.7 Consequências do excesso de fumarato no citoplasma das células

No ciclo da ureia, argininosuccinato é clivado em arginina e fumarato pela enzima argininosuccinato liase (ASL). Entretanto, o excesso de fumarato no citoplasma pode gerar argininosuccinato por reagir com arginina pela ação reversa da enzima ASL. Dessa forma, a célula começa a depender do consumo de arginina para a sobrevivência e passa a excretar argininosuccinato. Consequentemente, a expressão e/ou atividade da enzima argininosuccinato sintetase (ASS) pode diminuir, permitindo que aspartato fique mais disponível (ZHENG et al., 2013; SULLIVAN; GUI; VAN DER HEIDEN, 2016). O aumento dos níveis de aspartato leva ao

aumento concomitante de síntese de nucleotídeos e outros aminoácidos, o que é verificado em muitos tipos de câncer (**Figura 3**) (DELAGE et al., 2010; VAZQUEZ et al., 2016).

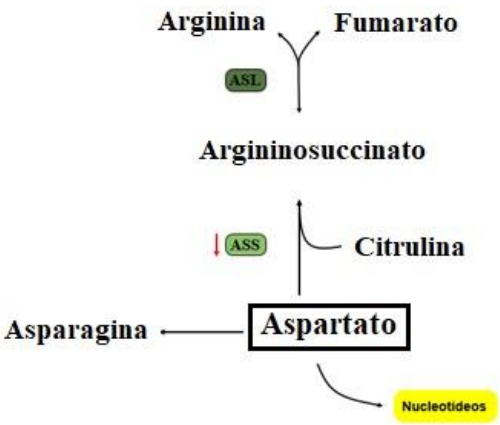

Figura 3 – Produtos da reação de fumarato com arginina no citoplasma das células. Figura adaptada de Sullivan e colaboradores (2016) (SULLIVAN; GUI; VAN DER HEIDEN, 2016).

1.8 Oncometabólitos e alterações epigenéticas

A epigenética define padrões de expressão gênica sem envolver alterações na sequência de bases do DNA, padrões esses que são transferidos para gerações celulares subsequentes (ETCHEGARAY; MOSTOSLAVSKY, 2016). Marcas epigenéticas controlam a expressão da informação contida no DNA e incluem a metilação do DNA, modificações pós-traducionais de histonas, e RNAs não codificantes. A metilação do DNA, quando associada a modificações nas histonas e outras proteínas, desempenha um papel regulatório na manutenção da estrutura da cromatina (BENDER, 2004; MAGAÑA et al., 2008).

No DNA, a base citosina pode ser metilada para 5-metilcitosina (5-mC) pela enzima DNA metiltransferase (DNMT). A metilação do DNA funciona como uma marca repressora da transcrição gênica (SCHAEFER; HORNICK; BOVÉE, 2018). Há evidências de que mais de 60 genes sejam silenciados epigeneticamente em tumores de pulmão, sendo que vários desses genes fazem parte de vias envolvidas no processo de transformação celular. É sugerido que tal silenciamento ocorra em estágios iniciais da carcinogênese (DAMIANI et al., 2008).

Sequências citosina-fosfato-guanina (CpG) localizadas em ilhas CpG estão associadas com acessibilidade de fatores de transcrição ao DNA e transcrição gênica. As ilhas CpG são geralmente encontradas próximas a regiões promotoras dos genes, e sua metilação relaciona-se inversamente com a transcrição dos genes por elas regulados (SCOURZIC; MOULY; BERNARD, 2015). Grande parte das regiões promotoras de genes humanos (mais de 60%) contêm ilhas CpG desmetiladas. Os mecanismos responsáveis pela manutenção dessas ilhas CpG desmetiladas ainda é pouco conhecido, podendo haver a participação de proteínas *Ten-Eleven-Translocation* (TET) metilcitosina hidroxilases (WILLIAMS; CHRISTENSEN; HELIN, 2012). As proteínas TET pertencem à família de dioxigenases dependentes de α-cetoglutarato e Fe(II), com três representantes em mamíferos, denominadas TET1, TET2 e TET3. Catalisam a oxidação de 5-mC para 5-hidroximetil-citosina (5-hmC), sendo o primeiro passo para a completa reação de desmetilação do DNA (ITO et al., 2010; WILLIAMS; CHRISTENSEN; HELIN, 2012). Células tumorais apresentam caracteristicamente uma hipometilação global do DNA, acompanhada por hipermetilações focais. Essas alterações podem levar a instabilidade genômica (hipometilação) e silenciamento transcricional de genes supressores de tumor via hipermetilação de suas regiões promotoras (DOI et al., 2010; WILLIAMS; CHRISTENSEN; HELIN, 2012).

Estudos sugerem que a hipermetilação de regiões promotoras de genes pode ser devida à perda de atividade das proteínas TET (WILLIAMS; CHRISTENSEN; HELIN, 2012). É hipotetizado que o acúmulo de fumarato e succinato em células mutadas para fumarato hidratase e succinato desidrogenase leva à inibição da hidroxilação de 5-mC no DNA (XIAO et al., 2012). Mutações inibidoras das enzimas SDH e FH estão relacionadas a um risco aumentado do desenvolvimento de tumores, provavelmente devido a alterações de vias de sinalização e da expressão de genes pelo acúmulo dos oncometabólitos succinato e fumarato (ZHENG et al., 2013; VAZQUEZ et al., 2016). É importante considerar que uma vez que as proteínas TET são dependentes de α-cetoglutarato para sua atividade catalítica, pode haver uma relação entre alterações no TCA e níveis de 5-mC e 5-hmC no DNA.

1.9 Efeitos do fumarato no balanço redox das células

Espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxigen species*) são resultantes do metabolismo oxidativo celular, formadas a partir da redução parcial da molécula de oxigênio

(DAYEM et al., 2017; MOLONEY; COTTER, 2018). Grande parte da produção de ROS ocorre na cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria, especialmente nos complexos I e III. Dados indicam que 2% do oxigênio consumido pelas mitocôndrias é reduzido parcialmente para radical superóxido (HOLZEROVÁ; PROKISCH, 2015; BERTERO; MAACK, 2018). O controle dos níveis intracelulares de ROS se dá por meio da ação de antioxidantes não enzimáticos e enzimáticos, tais como vitaminas C e E, glutationa, catalase e glutationa peroxidase. O desbalanço entre a geração de ROS e a capacidade antioxidante celular caracteriza o estresse redox e pode levar a danos e alterações da homeostase celular (LOUREIRO; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2017).

Fumarato é um composto carbonílico α,β-insaturado que reage espontaneamente com resíduos de cisteína em peptídeos e proteínas via adição de Michael para formar S-2-succinil cisteína. Esse processo é chamado de succinação (FRIZZELL et al., 2009; BARDELLA et al., 2011; SULLIVAN; GUI; VAN DER HEIDEN, 2016). A glutationa (GSH) é um alvo importante para a succinação, pois contém cisteína na sua estrutura tripeptídica. A adição do carbono β do fumarato à sulfidrila da cisteína forma um produto conhecido como *succinic*-GSH ou GSF. Portanto, o excesso de fumarato nas células impede que GSH exerça sua ação antioxidante, favorecendo a ocorrência de estresse redox. Adicionalmente, a restauração de GSH a partir de GSF consome NADPH, o que também diminui a capacidade antioxidante da célula (SULLIVAN; GUI; VAN DER HEIDEN, 2016). Uma proteína que também pode sofrer succinação é a *Kelch-like ECH-associated protein 1* (KEAP1). Essa proteína mantém o fator de transcrição nomeado *fator nuclear eritróide* 2 (Nrf2) no citoplasma. Quando migra para o núcleo, Nrf2 ativa a transcrição de genes do sistema antioxidante, incluindo aqueles envolvidos na síntese e utilização da glutationa. A succinação de KEAP1 libera Nrf2, que favorece a transcrição de genes que permitem o aumento da capacidade antioxidante da célula e sua proteção contra danos excessivos. Foi verificado que a diminuição dos níveis de Nrf2 compromete a proliferação de células UOK262 deficientes em FH, sugerindo que Nrf2 favorece o balanço redox necessário para manter a proliferação celular na presença de excesso de fumarato (SULLIVAN; GUI; VAN DER HEIDEN, 2016).

1.10 Oncometabólitos no câncer

Alterações de metabólitos intra e extracelulares podem acompanhar a reprogramação metabólica associada ao câncer. Essas alterações influenciam a expressão gênica das células presentes no microambiente tumoral (HUI; CHEN, 2015; HIRATA; SAHAI, 2017; PAVLOVA; THOMPSON, 2017). O microambiente tumoral (MT) é composto pela matriz contida na adjacência de células tumorais. Contém vasos sanguíneos, células não malignas (células dendríticas derivadas da medula óssea, células tronco / estromais mesenquimais, fibroblastos, pericitos, células do sistema imune), metabólitos e moléculas sinalizadoras que estimulam o crescimento tumoral (MENG; XUE; CHEN, 2018). Influências extracelulares determinam significativamente a evolução do tumor. Células cancerosas passam por uma seleção para explorar ao máximo possível as condições microambientais favoráveis e superar as desfavoráveis. De fato, a composição extracelular tem sido usada como preditor de prognóstico clínico (HUI; CHEN, 2015; HIRATA; SAHAI, 2017).

Diversas linhas de pesquisa indicam que, durante a transformação, as células epiteliais cancerígenas adquirem características mesenquimais através de um processo denominado transição epitelial-mesenquimal (EMT, do inglês *epitelial-mesenchymal transition*). Este processo permite que as células cancerígenas aumentem a capacidade invasiva e migratória, permitindo a disseminação do tumor e metástase. Existem estudos que relacionam mutações em genes como FH, SDH e IDH com a ativação de EMT, interligando este processo com uma reprogramação metabólica complexa, orquestrada por fatores de transcrição que mantêm as exigências energéticas de maior mobilidade e o crescimento exponencial mesmo sob condições ambientais adversas (SCIACOVELLI; FREZZA, 2016).

Estudos apontam que metabólitos como fumarato e succinato foram detectados em soro de crianças saudáveis nas concentrações médias aproximadas de 20 μM e 8 μM, respectivamente (NAGASAKA et al., 2017). Entretanto, no meio de cultura de células epiteliais renais de camundongos deficientes em FH foi observada a concentração aproximada de 1 mM de fumarato, enquanto a concentração de fumarato intracelular foi de aproximadamente 9 mM. Uma outra linhagem de células, UOK262, obtida de câncer renal humano deficiente em FH, apresentou uma concentração intracelular aproximada de 7 mM de fumarato (ZHENG et al., 2013).

Na análise metabolômica de tecido de câncer pulmonar humano, fumarato e succinato foram dois dos metabólitos encontrados em concentrações mais elevadas quando comparado ao tecido pulmonar normal (KAMI et al., 2013). No caso de células de câncer de pulmão humano, foi

verificada menor expressão da proteína fumarato hidratase em comparação com o tecido pulmonar normal, tendo sido essa deficiência sugerida como importante para a fase inicial do desenvolvimento do câncer pulmonar (MING et al., 2014).

O excesso de fumarato excretado de células com baixa atividade de FH poderia modular vias de sinalização e a expressão gênica de outras células presentes nesse microambiente, o que poderia favorecer a promoção e progressão tumoral.

Em geral, a fim de entender alguns efeitos específicos do fumarato em cultura de células, são utilizados derivados do fumarato capazes de atravessar facilmente a membrana plasmática, como monometilfumarato (MMF) e dimetilfumarato (DMF) (ZHENG et al., 2015). Entretanto, apesar de úteis para alguns objetivos, ésteres do fumarato não terão nas células o mesmo destino e efeitos do fumarato na forma de dicarboxilato. DMF tem apresentado, inclusive, propriedades anti-tumorigênicas (KALUZKI et al., 2016).

Células BEAS-2B expressam transportadores de ânions orgânicos (OAT4, OATP1A2, OATP1B3, OATP3A1, OATP4A1, OATP5A1) (ENDTER et al., 2009) e podem, assim, absorver fumarato na sua forma ionizada. Transportadores de dicarboxilatos foram detectados na membrana plasmática de células da musculatura lisa vascular, cardiomiócitos e células epiteliais hepáticas, renais e intestinais (FINDER; HARDIN, 1999).

Pouco se sabe sobre os efeitos que a suplementação com os oncometabólitos fumarato e succinato desencadeia em células normais que não apresentam mutações nas enzimas FH e SDH (WENTZEL et al., 2017). O único estudo encontrado nessa linha de investigação foi realizado em células de carcinoma hepatocelular humano (HepG2), tendo sido observada a indução de apoptose, fragmentação e hipermetilação do DNA das células expostas a fumarato (0,1 – 1,5 mM) e succinato (0,5 – 5 mM) por 24 h (WENTZEL et al., 2017). Entender os fatores que medeiam a ação tumorigênica dos oncometabólitos é apontado como importante no estudo do metabolismo do câncer e poderá revelar novos alvos para terapia e quimioprevenção (VAZQUEZ et al., 2016).

2 OBJETIVOS

Investigar o efeito da suplementação com fumarato (1, 5 e 10 mM) no metabolismo, estado redox, em marcas epigenéticas e na transformação das células BEAS-2B. Verificar o fluxo do fumarato ao entrar nas células, por meio da análise de isótopos dos produtos gerados a partir das reações intracelulares de [$^{13}C_4$]fumarato.

2.1 Objetivos Específicos

- Expor células BEAS-2B a fumarato nas concentrações de 0,1 a 10 mM para avaliação da citotoxicidade ao longo de 168 h de exposição. Seleção de três concentrações não citotóxicas para os experimentos subsequentes.
- Avaliar a transformação celular pelo ensaio da formação de colônias em *soft-agar* após o período de sete dias (168 h) de exposição das células BEAS-2B a três diferentes concentrações de fumarato.
- Avaliar a capacidade de invasão das células das colônias removidas do *soft-agar*, utilizando o ensaio em câmara de Boyden.
- Avaliar os níveis de 5-mC e 5-hmC no DNA das células após 168 h de exposição a fumarato e no DNA das células obtidas após crescimento em *soft-agar*.
- Avaliar a indução do estresse redox celular na exposição ao fumarato (1 a 10mM) ao longo de 7 dias.
- Avaliar a taxa de consumo de glicose.
- Quantificar ATP, ADP, AMP, NAD^+, $NADP^+$, adenosina, lactato, succinato, fumarato, malato, glutamina, glutamato, citrato, aspartato, asparagina, argininosuccinato, arginina e 2-L-hidroxiglutarato intracelular por HPLC-ESI-MS/MS.
- Expor as células BEAS-2B a [$^{13}C_4$]fumarato em concentração não citotóxica e coletar as amostras em 3 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 120 h para análise dos isótopos de intermediários do ciclo de Krebs a fim de verificar se há indução da atividade reversa da succinato desidrogenase, com geração de [$^{13}C_4$]succinato a partir da redução de [$^{13}C_4$]fumarato. Verificar o fluxo do [$^{13}C_4$]fumarato no ciclo de Krebs e em parte do ciclo da ureia.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Equipamentos

3.1.1 Equipamentos básicos

Os equipamentos básicos utilizados para a realização dos procedimentos experimentais foram os seguintes: Microcentrífuga modelo Mikro 120 (marca Hettich, Alemanha), incubadora com controle de temperatura e agitação modelo Vortemp56 (marca Labnet, EUA), banho maria modelo 245 (marca Cientec, Belo Horizonte, Brasil), agitador de tubos modelo 251 (marca Fanem, São Paulo, Brasil), centrífuga modelo 5702r (marca Eppendorf, Alemanha), centrífuga modelo 5810R (marca Eppendorf, Alemanha), balança analítica modelo AT261-DeltaRange (marca Mettler Toledo, EUA), balança semi-analítica modelo AUY220 (marca Shimadzu, Japão), fluxo laminar vertical modelo PDR-2 (marca Pachane, Brasil), fluxo laminar vertical modelo VLPS-10 (marca Veco, Brasil), autoclave modelo 415 (marca Fanem, Brasil), microscópio binocular invertido modelo DMI 1 (marca Leica, Alemanha), estufa de CO_2 modelo galaxy 170S (marca Eppendorf, Alemanha). As etapas de concentração a vácuo foram realizadas em um concentrador modular modelo miVac (marca Genevac, Ipswich, Reino Unido).

3.1.2 Espectrofotômetros

As leituras de absorbância foram realizadas no espectrofotômetro modelo Libra S12 (Biochrom, Cambridge, Reino Unido) para leituras em cubeta de quartzo. Para leituras em microplacas foram utilizados os modelos SpectraMAX® ou Synergy H1 Multi–Mode Reader, disponibilizados pelos laboratórios da Profa. Sandra H. P. Farsky (FCF-USP) e da Profa. Tania Marcourakis (FCF-USP). Para determinação de fluorescência foi utilizado o modelo Synergy Mx (Biotek Instruments, EUA) software Gen5 versão 1.10.8 disponibilizado pelo laboratório da Profa. Dulcineia Saes Parra Abdalla (FCF-USP). As concentrações de DNA foram determinada no espectrofotômetro modelo NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific, Waltham, EUA), (*software* ND 1000), disponível no Laboratório da Professora Silvya Stuchi Maria-Engler, FCF-USP.

3.1.3 Citometria de Fluxo

Foi utilizado o equipamento FACs CANTO II (BD, Biosciences, EUA) disponibilizado pelo Prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida (FCF–USP). Para a aquisição dos dados foi utilizado o *software* BD FACs DIVA (BD, Biosciences, EUA). Para a análise dos dados foi utilizado o *software* FlowJo (FlowJO LCC, Oregon, EUA).

3.1.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

3.1.4.1 HPLC-DAD

As análises e purificações realizadas com ultravioleta visível (UV/VIS) foram conduzidas em um equipamento da Shimadzu Corporation (Kyoto, Japão) equipado com duas bombas LC-20AT, um detector de arranjo de fotodiodos PDA-20AV, um auto injetor (Prominence SIL-20AC) e um forno para colunas (CTO-10AS/VP) controlado por um módulo de comunicação CBM-20A. Os dados foram processados pelo software LC-Solution 1.21. (Shimadzu, Kyoto, Japão). As condições cromatográficas utilizadas são apresentadas no decorrer da descrição dos métodos.

3.1.4.2 HPLC-ESI-MS/MS (API4000 QTrap)

As análises por HPLC-ESI-MS/MS foram feitas utilizado-se um sistema analítico constituído por um HPLC Agilent série 1200 (Wilmington, EUA) equipado com uma bomba binária (Agilent 1200 G1312B), uma bomba isocrática (Agilent 1200 G1310A), um forno para coluna (Agilent 1200 G1316B), um detector de absorbância de arranjo de diodos (Agilent 1200 DAD G1315C) e um injetor automático (G1367C Agilent 1200). O sistema de HPLC é integrado a um espectrômetro de massas Linear Quadrupole Ion Trap modelo 4000 QTRAP da empresa Applied Biosystems/MDS Sciex Instruments (Foster City, EUA) disponibilizado pelo Prof. Dr. Paolo Di Mascio (Instituto de Química USP, IQ-USP). Os dados foram processados utilizando o *software* Analyst 1.6 (Applied Biosystems, EUA).

3.1.4.3 HPLC-ESI-Q-TOF

As análises foram realizadas em um sistema de HPLC (Prominence, Shimadzu, Kyoto, Japão) acoplado a um espectrômetro de massas com analisador do tipo quadupolo-tempo-de-vôo e

ionização por eletrospray microQTOF II (HPLC-ESI-Q-TOF) (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) do grupo do Prof. Massuo Jorge Kato (IQ USP), com a colaboração da doutoranda Andréa Tedesco Faccio do grupo da Profa. Marina Franco Maggi Tavares (IQ USP). Os dados foram primeiramente processadas no software DataAnalysis 4.0 (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) e em seguida exportado para o formato ".cdf" para serem lidos posteriormente pelo pacote XCMS.

3.2 Ensaios Biológicos

3.2.1 Cultivo Celular

3.2.1.1 Cultura de células BEAS-2B

A linhagem BEAS-2B, células de epitélio brônquico humano, foi gentilmente fornecida pelo Prof. Dr. Fekadu Kassie (Masonic Cancer Center, Universidade de Minnesota, Minneapolis, Estados Unidos). A cultura foi mantida em meio BEGM® (*Bronchial Epithelial Grow Medium*), suplementado com o conjunto de cofatores do kit (extrato de pituitária bovina, insulina, hidrocortisona, hEGF, epinefrina, transferrina, ácido retinóico, triiodotironina, gentamicina e anfotericina). As células foram mantidas em garrafas e incubadas a 37ºC, em atmosfera contendo 5% de CO_2. Para todos os experimentos, foi padronizado um número de passagens abaixo de 10.

3.2.1.2 Teste PCR para detecção de *Mycoplasma sp*

Este ensaio tem por objetivo monitorar a contaminação por *Mycoplasma sp* nas células em cultura como parte do controle de qualidade de pesquisa no laboratório. Foi coletado o sobrenadante da cultura de células BEAS-2B após 48 h de incubação. Este foi centrifugado, e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi ressuspenso em solução LOTE (Low Tris-EDTA) e então incubado por 5 minutos a 95 °C. A detecção do DNA de *Mycoplasma sp* nas amostras foi realizada por meio da reação em cadeia de polimerase (PCR) convencional utilizando mix (9,7 µL de água Mili-Q autoclavada, 4,5 µL de $MgCl_2$ 50 mM, 3 µL PCR buffer 10x, 1 µL de primer oligo sense (5' GGC GAA TGG GTG AGT AAC ACG 3'), 1 µL de primer oligo anti-sense (5' CGG ATA ACG GTT GCG ACC TAT 3'), 0,6 µL de dNTP e 0,2 µL de Taq polimerase 5 U/µL

por amostra). As amostras amplificadas foram submetidas à corrida de eletrofose (100V, 300 mA), usando gel de agarose 3%. Após a corrida o gel foi incubado com solução de 0,01% de Gel Red em água Mili-Q. Para a detecção das bandas foi utilizado o transiluminador. O ensaio foi realizado com a colaboração do grupo da Professora Silvya Stuchi Maria-Engler, FCF-USP

3.2.2 Exposição das células BEAS-2B ao fumarato

Para os ensaios de citotoxidade, MTT, consumo de glicose, quantificação dos metabólitos intermediários, verificação da transformação celular (*soft-agar*) e análise de espécies reativas de oxigênio, as células foram plaqueadas na densidade de 2 x 10^4 células/poço, N = 5, em placas de cultura de 96 poços. Para as extrações de DNA após as incubações, as células foram plaqueadas na densidade de 1 x 10^5 células/poço, N = 5, em placas de cultura de 6 poços. Para o ensaio de ciclo celular após as incubações, foram plaqueadas na densidade de 5 x 10^4células/poço, N = 5, em placas de 24 poços. Os experimentos foram conduzidos após o período de adesão celular (24 h) em meio de cultura BEGM, seguido pela exposição a diferentes concentrações de fumarato (0,1, 1, 5, 10 mM), por 168 h, com renovação e coleta do meio de cultura a cada 24 h. Incubações controle também foram realizadas.

3.2.3 Análise do crescimento e sobrevivência celular após a exposição ao fumarato

Como as células mortas não aderem às placas de cultura, é possível avaliar o crescimento e a sobrevivência por meio da coloração das células aderidas com o corante cristal violeta (CVD). Após os diferentes períodos de exposição (24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h; N = 5; inicialmente 2 x 10^4 células/poço), o meio de cultura foi removido e a camada celular foi cuidadosamente lavada, por duas vezes, com solução salina fosfato tamponada (PBS) pH 7,0. Em seguida a solução de PBS foi removida dos poços e foi adicionado metanol (100 µL) como agente fixador e aspirado após 40 segundos de contato. As células foram coradas com 50 µL/poço da solução de CVD (1% CVD em metanol 20%), por 10 min à temperatura ambiente. Após o término da incubação, o corante foi cuidadosamente removido e cada poço foi lavado 4 vezes com 200 µL de PBS. O corante aderido às células foi dissolvido pela adição de 200 µL de uma solução de ácido acético 30% (v:v). Para construção de curvas padrão foram plaqueadas de 0,5 x 10^4 a 15 x 10^4

células/poço. Os dados foram obtidos a partir da leitura no comprimento de onda de 540 nm, subtraindo a leitura da placa em 690 nm. Os resultados foram expressos em número de células.

3.2.4 Ensaio de tempo de dobramento da população de células (*population doubling time*, PDT)

A partir dos dados obtidos do ensaio de cristal violeta, o tempo de dobramento foi calculado utilizando a seguinte equação PDT=1/r e r = 3,32*(logNh-logNi)/(t2-t1), na qual r = taxa de multiplicação celular, Nh= número de células coletadas em um determinado período de tempo (t2), Ni = número de células inoculadas no tempo zero (t1) e 3,32 = constante.

3.2.5 Análise da atividade mitocondrial

A citotoxicidade foi avaliada pelos ensaios de proliferação e morte celular utilizando o corante cristal violeta (CVD) citado acima, e pela atividade da cadeia respiratória mitocondrial, por meio do ensaio de MTT. Os ensaios com brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) são úteis para verificar a atividade da cadeia respiratória mitocondrial. Quando o sal tetrazólio é convertido a formazam por clivagem redutiva do anel tetrazólio, formam-se cristais insolúveis (MTT) que podem ser quantificados espectrofotometricamente. Uma vez que a succinato desidrogenase mitocondrial está envolvida na redução de sais de tetrazólio, a quantidade de formazam produzida é proporcional ao número de células vivas. Após terminado o período de exposição, o meio de cultura foi cuidadosamente removido, e as células foram lavadas com PBS. Em seguida, uma solução pré-formulada de meio de cultura e solução de MTT (75 µL da solução 5 mg/mL em PBS) foi adicionada às células, as quais foram incubadas por 2 horas a 37ºC, em atmosfera contendo 5% de CO_2. Após o período de incubação, retirou-se cuidadosamente o meio de cultura e o precipitado azul formado foi ressuspenso com 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). Os valores da absorbância foram mensurados fazendo-se a leitura no comprimento de onda de 595 nm, com leitura de referência no comprimento de onda de 690 nm, em espectrofotômetro com leitor de microplaca. Os resultados foram expressos em porcentagem relativa ao grupo controle.

3.2.6 Análise do consumo de glicose

A taxa de consumo de glicose das células BEAS-2B (inicialmente 2 x 10^4 células, N = 5) expostas por 24, 48, 96 e 144 h ao fumarato (1 mM, 5 mM e 10 mM) foi verificada pelo *kit* Glicose Liquiform ® (Labtest, Brasil). O ensaio se baseia no sistema enzimático glicose oxidase/peroxidase com posterior leitura espectrofotométrica (λ = 540 nm). Essas análises foram realizadas no Laboratório de prestação de serviços vinculado à FCF USP.

3.2.7 Formação de colônias em *Soft-agar*

O ensaio foi realizado conforme o descrito em (BOROWICZ et al., 2014). Após 168 h de exposição ao fumarato (1 mM, 5 mM, 10 mM), as células BEAS-2B foram plaqueadas nas densidades de 5.000 ou 15.000 células por poço em meio de cultura contendo 0,35% de agarose de baixo ponto de fusão em placas de 6 poços (8,87cm^2 área/poço) ou em placas de 24 poços (1,82cm^2 área/poço) com uma camada-base de 0,5% de agarose de alto ponto de fusão. As placas foram incubadas durante 21 dias (5.000 células) ou 15 dias (15.000 células), a 37ºC, em atmosfera contendo 5% CO_2. A adição do meio de cultura fez-se a cada 3 dias. Após o período de incubação, realizou-se a contagem das colônias e em seguida as colônias foram fotografadas usando a câmera Leica MC170 HD para microscópio invertido com magnificação de 10x. As imagens das células foram capturadas em formato JPEG usando *software* LAS V4.9. Os parâmetros foram otimizados para obter alta resolução (2592 x 1944 pixels) e nitidez de imagem. Foram selecionadas 8 fotos por poço (representando 1% e 4% do poço total em placas de 6 e 24 poços, respectivamente) de regiões onde foi visualizado maior número de colônias. O processamento destas imagens foi através do *software* ImageJ, onde foram consideradas colônias maiores de 50 µm ou 100 µm de diâmetro. As imagens foram calculadas relacionando ao espaçamento da imagem obtida e o diâmetro desejado das colônias em pixels. A calibração foi usada para calcular a área da colônia em micrômetros quadrados. Este cálculo produziu densidade líquida de colônias para cada poço.

3.2.8 Extração do DNA das células do *soft-agar*

O DNA das células plaqueadas em *soft-agar* (30.000 células, 15 dias) foi extraído seguindo o protocolo do *kit* de extração Gentra®Puregene, procedimento realizado rotineiramente por nosso

grupo. Em resumo, após o término do período de incubação em meio de cultura semissólido foram adicionados 1,5 mL da solução de lise celular (*Cell Lysis Solution, Gentra Puregene® Kit*) suplementado com 25 μg de proteinase K em cada poço (placa seis poços), as amostras foram incubadas por 12 h à temperatura ambiente. Posteriormente, a solução foi transferida para tubos de 15 mL, sendo vigorosamente agitada por 20 segundos. Foram adicionados 30 μL de uma solução contendo a enzima RNAse na concentração de 15 mg/mL e as amostras foram incubadas por 1 h a 37 ºC. Após a incubação foi adicionado 1 mL da solução de precipitação proteica (*Protein Preciptation, Gentra Puregene® Kit*) e novamente as amostras foram submetidas a uma vigorosa agitação por 20 segundos e posterior centrifugação a 8000 *g* por 10 min, 4 °C. Após a centrifugação coletou-se o sobrenadante e aos tubos foram adicionados 3 mL de uma solução tampão (iodeto de sódio 7,6 M, Tris 40 mM, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 20 mM, desferroxamina 0,3 mM, pH 8,0) e 5 mL de isopropanol gelado. Após leve agitação, para precipitação do DNA, as soluções foram centrifugadas a 8000 *g* por 3 min, 4 ºC, e o isopropanol foi descartado. O DNA foi lavado duas vezes com 3 mL de etanol 70% em água, centrifugado a 8000 *g* por 3 min, 4 ºC, seco ao ar e ressuspenso em 20 μL de solução de desferroxamina (0,1 mM). A solução de desferroxamina contendo o DNA extraído foi mantida a 4 ºC por 24 h para a solubilização do mesmo, e, em seguida, estocada a -20 ºC. A concentração de DNA nas soluções foi verificada pela intensidade de absorbância em λ = 260 nm, utilizando-se o equipamento nanodrop.

3.2.9 Extração do DNA das células após as exposições

Após o término do período de exposição, o meio de cultura foi retirado e em cada poço foram adicionados 1,5 mL da solução de lise celular (*Cell Lysis Solution, Gentra Puregene® Kit*) com 25 μg de proteinase K, e as amostras foram incubadas por 30 min à temperatura ambiente. Posteriormente, a solução foi transferida para tubos tipo "*falcon*" de 50 mL, sendo vigorosamente agitada por 20 segundos. Foram adicionados 5 μL de uma solução contendo a enzima RNAse A (15 mg/mL) e as amostras foram incubadas por 1 h a 37 ºC. Após a incubação foram adicionados 500 μL da solução de precipitação proteica (*Protein Preciptation, Gentra Puregene® Kit*) e novamente as amostras foram submetidas a uma vigorosa agitação por 20 segundos e posterior centrifugação a 8000 *g* por 10 min, 4 ºC. Após a centrifugação, coletou-se o sobrenadante e aos

tubos foram adicionados 2,5 mL de isopropanol gelado. Após leve agitação para precipitação do DNA, as soluções foram centrifugadas a 8000 *g* por 3 min, 4 ºC, e o isopropanol foi descartado. O DNA foi lavado com 3 mL de etanol 70% em água, centrifugado a 8000 *g* por 3 min, 4 ºC, seco ao ar e ressuspenso em 20 µL de solução de desferroxamina (0,1 mM). A concentração de DNA nas soluções foi verificada pela intensidade de absorbância em λ = 260 nm, utilizando-se o equipamento nanodrop (software ND 1000) disponível no laboratório da Profa. Silvya Stuchi Maria Engler (FCF USP).

3.2.10 Hidrólise do DNA para as análises de 5-mC e 5-hmC

Alíquotas contendo 5 µg de DNA foram adicionadas a 2 µL de tampão Tris-HCl/$MgCl_2$ 200 mM (pH 7,4), 1 µL do padrão interno 1N^6-eteno-2´-desoxiadenosina (1,N^6-etenodA) (400 fmol/µL), 1 µL do padrão interno [$^{15}N_3$]5-hmC (400 fmol/µL) e 1 µL (0,31 unidade) de deoxirribonuclease I de pâncreas bovino (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA). As amostras foram incubadas a 37 ºC por 1 h com agitação de 1000 rpm. Após a incubação foram adicionados 1 µL (0,00016 unidade) de fosfodiesterase I de *Crotalus atrox* (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) e 1 µL (0,8 unidade) de fosfatase alcalina de mucosa intestinal bovina (Sigma Aldrich, St. Louis, USA). As amostras foram novamente incubadas a 37 ºC por 1 h com agitação de 1000 rpm. Ao término da segunda hora, com volume final da incubação de 40 µL, as amostras foram centrifugadas a 9300 *g* por 10 min. Após a centrifugação, alíquotas de 25 µL foram injetadas no sistema HPLC-DAD para quantificação de 2'-desoxicitidina (dC) e 5-mC, e alíquotas de 8 µL foram injetadas no sistema de HPLC-ESI-MS/MS (API4000 QTrap, Laboratório do Prof. Paolo Di Mascio, IQ USP) para quantificação de 5-hmC e 5-mC.

Curvas de calibrações foram construídas no sistema de HPLC-DAD (λ = 286 nm) utilizando-se 10 – 4000 pmol de dC e 2 – 160 pmol de 5-mC, e no sistema de HPLC-ESI-MS/MS utilizando-se 0,1 – 20 pmol de 5-mC, 0,01 – 0,1 pmol de 5-hmC, e 80 fmol dos padrões internos 1,N^6-etenodA e [$^{15}N_3$]5-hmC.

Para as quantificações no sistema de HPLC-DAD foi utilizada a seguinte condição cromatográfica: coluna Shim-pack VP-ODS (250 x 4.6 mm i.d., 5.0 µm, 100A, Shimadzu) com uma pré-coluna C18 4,0 x 3,0 mm (Phenomenex, Torrance, CA) eluída com um gradiente de ácido fórmico 0,1% em H_2O (Solução A) e ácido fórmico 0,1% em 50% metanol e H_2O (Solução

B), a um fluxo de 1 mL/min, 35 ºC, nas seguintes condições: 0 – 25 min, 0 – 40% B; 25 – 26 min, 40 – 0% B; 26 – 40 min, 0% B. O detector de DAD foi fixado em 286 nm para as quantificações de dC e 5-mC. O método para as quantificações no sistema de HPLC-ESI-MS/MS está descrito abaixo.

3.2.11 Quantificação de 5-mC e 5-hmC por HPLC-ESI-MS/MS

A quantificação de 5-mC e 5-hmC nas amostras de DNA foi feita utilizando-se o método cromatográfico já padronizado pelo grupo, na seguinte condição: coluna Luna Omega PS C18 (150 x 2.1 mm i.d., 5.0 µm, 100A Phenomenex) com uma pré-coluna C18 4,0 x 3,0 mm (Phenomenex, Torrance, CA) eluída em gradiente por uma solução constituída de tampão acetato de amônio 10 mM (Solução A) e 50 % de metanol em água com 0,1% de ácido fórmico (Solução B), a 35 ºC, com fluxo de 350 µL/min (0 – 7 min, 0 – 60% de B; 7 – 8 min, 60 – 100% de B; 8 – 10 min, 100% de B; 10 – 11 min, 100 – 0% de B, 11 – 20 min, 0% de B). A válvula de comutação de fluxo foi configurada para permitir a entrada de eluentes no espectrômetro de massas durante o intervalo de 3 – 8 min.

As análises foram conduzidas com ionização por *electrospray* em modo positivo (ESI^+, $[M+H]^+$), com os seguintes parâmetros otimizados: CUR, 10 psi; GS1, 50 psi; GS2, 50 psi; CAD, medium; TEM, 450 ºC; EP, 10 V e IS, 5500 V. As fragmentações e energias utilizadas no monitoramento de reações múltiplas (MRM) estão apresentadas na **Tabela 1**.

Tabela 1 - Fragmentações e energias utilizadas para análises dos níveis de metilação e hidroximetilação do DNA de células BEAS-2B (DP: potencial de dissociação; CE: energia de colisão; CXP: potencial de saída da célula).

Analito	Q1	Q 3	Dwell Time (msec)	DP (V)	CE (V)
5-hmC 1	258,082	142	100	17	8
5-hmC 2	258,082	124,1	100	33	5
[$^{15}N_3$]5-hmC	261,082	145	100	17	8
5-mC 1	242	126	100	17	5
5-mC 2	242	108,6	100	53	20
єdA 1	276,2	159,9	100	27	8
єdA 2	276,2	105,8	100	69	20
dC 1	228,055	112	100	15	20
dC 2	228,055	116,9	100	19	6

3.2.12 Ensaio de invasão em câmara de Boyden (*transwell*)

O ensaio foi realizado com a colaboração do grupo da Profa. Silvya Stuchi Maria Engler (FCF USP), que possui o método padronizado.

Foram utilizadas células de colônias crescidas em *soft-agar*, que foram plaqueadas e mantidas em meio de cultura por um período de 90 dias, com trocas de meio a cada três dias, e repiques ao atingir 80% de confluência, não ultrapassando 10 repiques. Em resumo, os insertos com poros de 8 µm foram acondicionados em placa de 24 poços, e lavados 3x com BEGM sem o soro fetal bovino (SFB). Posteriormente, os insertos foram recobertos com 20 µL de Matrigel®(BD) diluído 1:6 (cerca de 2-3 mg/mL de proteína) em BEGM e incubados por 30 minutos em estufa de CO_2, a 37°C. Em seguida, foram plaqueadas 1 x 10^4 células sobre o Matrigel®l, diluídas em 200 µL de BEGM. Na câmara inferior, foram adicionados 300 µL de BEGM contendo 10% de SFB. Para o controle negativo, utilizou-se meio sem soro ou PBS na câmara inferior. O período de invasão utilizado foi de 24 horas. Após o tempo estabelecido, o meio de cultura da câmara inferior foi aspirado e as células foram fixadas em glutaraldeído (Sigma) 3% em PBS, por 10 minutos à temperatura ambiente. A câmara inferior foi lavada 3x com água destilada para retirar o excesso de fixador. Em seguida, foi realizada coloração com solução 0,5% de azul de toluidina em 2% de Na_2CO_3 por 20 minutos, à temperatura ambiente. O excesso de corante foi retirado com 3 lavagens com água destilada e, por fim, as células que permaneceram na superfície superior da câmara de Boyden foram removidas com auxílio de uma haste flexível de algodão e as células invasoras, que se localizaram na superfície inferior da câmara de Boyden, foram contadas.

3.2.13 Análise de fragmentação do DNA e ciclo celular

Para a análise concomitante de fragmentação do DNA e ciclo celular, células da linhagem BEAS-2B foram plaqueadas com meio BEGM, em placas de 24 poços na densidade de 5 x 10^4 células por poço (300 µL). Após o período de adesão celular (24 h) o meio de cultura foi substituído por um novo contendo 1, 5 ou 10 mM de fumarato, dissolvido em BEGM (10% v/v). Incubações controles foram feitas utilizando apenas o meio de cultura BEGM. Ao término de cada período de exposição (24, 72, 96 e 144 h), o meio de cultura foi removido da placa e descartado, as células foram lavadas três vezes com PBS e tripsinizadas (300 µL/poço). Após 5 min de contato, a tripsina foi removida e foram adicionados 1000 µL de meio de cultura DMEM

livre de fenol vermelho suplementado com 15% SFB. As células foram homogeneizadas, transferidas para tubos de citometria e centrifugadas a 500 *g* por 10 min a 4 ºC. O sobrenadante foi desprezado e foram adicionados a cada tubo 12 µL de uma solução contendo a RNAse A (15 mg/mL) e 150 µL do tampão hipotônico fluorescente (PBS, 2% SFB, 0,05 % triton-X100, 0,1% de citrato de sódio, 25 µg/mL de iodeto de propídio). As amostras foram incubadas por 30 min à temperatura ambiente e as análises foram realizadas por citometria de fluxo no Laboratório do Prof. Sandro Rogério de Almeida (FCF USP).

3.2.14 Geração intracelular de ROS

Para a determinação da produção intracelular de ROS, foi monitorada a fluorescência do produto 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) resultante da oxidação de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH) intracelularmente. As células BEAS-2B foram incubadas com 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína (DCFH–DA), que se acumula no citosol e é desacetilado por esterases para 2',7'-diclorodihidrofluoresceína o qual pode ser, então, oxidado por radicais livres gerados intracelularmente, como $RO_2^{\bullet}$, $RO^{\bullet}$, $NO_2^{\bullet}$, $CO_3^{\bullet-}$ e $HO^{\bullet}$.

As células BEAS-2B foram plaqueadas numa densidade de 2 x 10^4 células/poço em placas de 96 poços e incubadas em estufa de CO_2, a 37°C. Após o período de adesão celular (24 h) substituiu-se o meio de cultura por um novo contendo 1, 5 ou 10 mM de fumarato (N = 5) e meio de cultura para os grupos controle negativo e positivo, trocados a cada 24 h de exposição no período de 24 a 168h. Após a exposição, substituiu-se o meio de cultura de todos os grupos por um novo contendo 10 µM de DCFH-DA, as células foram incubadas por 30 min a 37 °C (no escuro). Após esse período, o meio de cultura foi removido e as células lavadas 2x com PBS para remoção do excesso de DCFH-DA extracelular. Em seguida, as células do grupo controle positivo foram expostas a peróxido de hidrogênio (30 µM), as células dos grupos fumarato foram expostas a 1, 5 e 10 mM de fumarato, e o controle negativo recebeu novo meio de cultura, e foram incubadas por 60 min a 37 °C (no escuro). Foi feita a leitura da intensidade de emissão de fluorescência em $\lambda_{emi.}$= 528 nm, com $\lambda_{exc.}$= 485 nm, no leitor de microplacas. Após a leitura, foi realizado o ensaio de quantificação de proteínas totais pelo método de Bradford. Brevemente, as proteínas presentes nas placas foram solubilizadas com 40 µL de NaOH (300 mM) e armazenadas a -20 °C. Para a quantificação, foram adicionados 195 µL de NaCl (150 mM), 5 µL

de extrato de proteínas e 50 µL de reagente de Bradford. Curvas de calibração foram obtidas em intervalos de concentração de 0,0016 a 0,01 µg/µL (albumina de soro bovino). Os resultados foram expressos em fluorescência de DCF por µg de proteína.

3.2.15 Quantificação de malonaldeído no meio de cultura por HPLC-DAD

A quantificação de malonaldeído (MDA) no meio de cultura foi realizada utilizando-se o método já padronizado pelo grupo. Células BEAS-2B foram plaqueadas na densidade de 2 x 10^4 células/poço em placas de cultura de 96 poços. Após período de adesão celular (24 h), iniciou-se a exposição ao fumarato nas concentrações de 1, 5 e 10 mM, com renovação do meio a cada 24 h. Durante o intervalo de 0 – 168 horas alíquotas do meio de cultura (100 µL) foram removidas e hidrolisadas para obtenção do MDA livre de proteínas através da adição de 10 µL de NaOH 4 M com subsequente incubação a 60 ºC por 30 min sob agitação a 100 rpm. Ao término da incubação, 150 µL de H_2SO_4 1% (v/v) foram adicionados e as amostras foram submetidas à vigorosa agitação por 20 segundos com posterior centrifugação a 9.300 *g* por 10 min. Após a centrifugação, 175 µL do sobrenadante foram coletados e incubados com 25 µL de uma solução de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH, 1 mg/mL em HCl 2M). A reação de derivatização ocorreu em temperatura ambiente, ao abrigo da luz, durante 30 min. Alíquotas de 100 µL foram injetadas no sistema de HPLC–DAD descrito no item 1.4 de Material e Métodos. A seguinte condição cromatográfica foi utilizada para as análises: uma coluna Shim-pack VP-ODS (250 x 4.6 mm i.d., 5.0 µm, 100A, Shimadzu) com uma pré-coluna C18 4,0 x 3,0 mm (Phenomenex, Torrance, CA) foi eluída com um gradiente de água (Solução A) e acetonitrila (Solução B), ambas suplementadas com ácido acético (0,2%; v/v), a 30 ºC, com fluxo de 1 mL/min (0 – 28 min, 20 – 100% de B; 28 – 30 min, 100 – 20% de B; 30 – 40 min, 20% de B). O detector de DAD foi fixado em 306 nm para o monitoramento do produto MDA-DNPH. O padrão de MDA foi preparado pela adição de 22 µL de uma solução de 1,1,3,3-tetrametoxipropano a 10 mL de H_2SO_4 1% (v/v), conforme o descrito por (BASTOS et al., 2012). Após a incubação (2 h, temperatura ambiente, no escuro) a concentração da solução foi calculada através da determinação da absorbância em H_2SO_4 1% (v/v), utilizando o respectivo coeficiente de extinção molar (ε): MDA, $\varepsilon = 13700\ M^{-1}cm^{-1}$ em 245 nm. Curvas de calibração foram feitas no intervalo de 0,05 – 6 µM de MDA.

3.2.16 Quantificação dos metabólitos intracelulares

Foram utilizados três métodos para quantificação dos metabólitos das células BEAS-2B coletadas em 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h de exposição a 1, 5 e 10 mM de fumarato. O **Método 1** foi utilizado para quantificação de malato, citrato, lactato, aspartato, argininosuccinato, asparagina, arginina, fumarato, succinato, 2-L-hidroxiglutarato, glutamina e glutamato. O **Método 2** foi utilizado para quantificação de NAD^+, $NADP^+$, desoxiuridina, adenosina, nicotinamida e nicotinamida mononucleotídeo (NMN). O **Método 3** foi utilizado para quantificação de AMP, ADP e ATP. As proteínas das amostras foram quantificadas e os resultados foram expressos em pmol/µg de proteína.

O preparo das amostras foi realizado como descrito por (RAHMAN et al., 2014), com algumas modificações. Após os períodos de exposição de 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a fumarato e grupo controle, o meio de cultura das células BEAS-2B foi removido e a camada celular foi cuidadosamente lavada com PBS. Subsequentemente, as células foram ressuspensas em 100 µL de uma solução de acetonitrila em água na proporção de 9:1 (v:v) para a completa inibição do metabolismo celular. As amostras foram armazenadas a -80 °C. Na sequência, foram adicionados 385 µL de uma solução de solvente de extração (40% acetonitrila, 40% metanol e 20% água) e 15 µL do padrão interno ($[^{13}C_{10}{}^{15}N_5]$ATP, 500 pmol) nos poços contendo as células. Após homogeneização e centrifugação (20.000 *g*, 10 min), alíquotas de 450 µL foram transferidas para *eppendorfs*. Por fim as amostras foram armazenadas a -20 °C. No momento da análise, antes da secagem a vácuo, foram adicionados outros dois padrões internos para serem utilizados nas quantificações dos metabólitos dos métodos 1 e 2: ácido benzóico (3,05 µL do padrão 0,01 µg/µL, correspondendo no final a 50 pmol no volume de injeção) e benzamida (3,02 µL do padrão 0,001 µg/µL, correspondendo no final a 5 pmol no volume de injeção). Após a secagem a vácuo, as amostras foram ressuspensas em 30 µL de água ultrapura e centrifugadas por 5 min a 16.000 *g*. O volume de 6 µL foi injetado no sistema HPLC-ESI-MS/MS.

Método 1. As análises foram conduzidas com ionização por *electrospray* em modo negativo (ESI^-, $[M–H]^-$), com os seguintes parâmetros otimizados: CUR, 18 psi; GS1, 40 psi; GS2, 45 psi; CAD, medium; TEM, 700 ºC; EP, -10 V e IS, -4500 V. As fragmentações e energias utilizadas no MRM estão apresentadas na **Tabela 2**. A razão entre as áreas (metabólitos/ácido benzóico) foi

utilizada para quantificação. Curvas padrão foram preparadas e injetadas para os metabólitos listados e a seguinte condição cromatográfica foi otimizada para separação dos analitos: coluna Luna Omega PS C18 (150 x 2.1 mm i.d., 5.0 µm, 100A Phenomenex) com uma pré-coluna C18 4,0 x 3,0 mm (Phenomenex, Torrance, CA) eluída em gradiente por uma solução constituída de 0,1% de ácido fórmico em água (Solução A) e 40 % de acetonitrila em tampão acetato de amônio 10 mM (Solução B), a 30 ºC, (0 – 4 min, 2 – 60% de B, 450 µL/min; 4 – 4,5 min, 60 – 100% de B, 450 – 600 µL/min; 4,5 – 5 min, 100% de B, 600 µL/min; 5 – 5,5 min, 100 – 2% de B, 600 µL/min; 5,5 – 6 min, 2 – 40% de B, 600 µL/min; 6 – 6,5 min, 40 – 2% de B, 600 µL/min; 6,5 – 14 min, 2% de B, 600 µL/min. 14 – 15 min, 2% de B, 600 – 450 µL/min). A fração cromatográfica compreendida entre 0,5 e 8,0 min foi direcionada para o espectrômetro de massas.

Tabela 2. Fragmentações e energias utilizadas para quantificação de metabólitos (Método 1) em células BEAS-2B (DP: potencial de dissociação; CE: energia de colisão; CXP: potencial de saída da célula).

Analito	Q1	Q3	Dwell Time (msec)	DP (V)	CE (V)	CXP (V)
Lactato 1	88,900	45,000	50	-25	-14	-7
Lactato 2	88,900	43,000	50	-25	-18	-5
Fumarato 1	114,896	70,933	150	-35	-12	-1
Fumarato 2	114,896	42,041	150	-35	-14	-5
Succinato 1	116,900	72,800	50	-30	-18	-11
Succinato 2	116,900	83,900	50	-30	-10	-13
Malato 1	132,839	114,700	200	-45	-16	-19
Malato 2	132,839	70,900	200	-45	-22	-13
Citrato 1	190,900	111,100	200	-35	-20	-5
Citrato 2	190,900	86,900	200	-35	-26	-3
Aspartato 1	131,900	87,700	50	-45	-20	-5
Aspartato 2	131,900	114,900	50	-45	-16	-3
Glutamina 1	144,845	126,700	50	-50	-18	-7
Glutamina 2	144,845	127,500	50	-50	-18	-5
Glutamato 1	145,900	101,900	50	-50	-18	-5

Glutamato 2	145,900	127,700	50	-50	-16	-7
Argininosuccinato 1	289,000	270,700	50	-60	-16	-5
Argininosuccinato 2	289,000	131,000	50	-60	-34	-1
Arginina 1	173,100	130,800	50	-70	-18	-1
Arginina 2	173,100	155,800	50	-70	-16	-1
Asparagina 1	130,900	112,800	50	-50	-14	-5
Asparagina 2	130,900	113,900	50	-50	-16	-5
2-L-hidroxiglutarato 1	146,900	129,000	50	-35	-16	-7
2-L-hidroxiglutarato 2	146,900	85,000	50	-35	-24	-1
Ácido Benzóico (PI)	120,900	76,900	150	-45	-18	-1

Método 2. As análises foram conduzidas com ionização por *electrospray* em modo positivo (ESI^+, $[M+H]^+$), com os seguintes parâmetros otimizados: CUR, 18 psi; GS1, 40 psi; GS2, 45 psi; CAD, medium; TEM, 700 ºC; EP, 10 V e IS, 4500 V. As fragmentações e energias utilizadas no MRM estão apresentadas na **Tabela 3**. A razão entre as áreas (metabólitos/benzamida) foi utilizada para quantificação. Curvas padrão foram preparadas e injetadas para os metabólitos listados e a seguinte condição cromatográfica foi otimizada para separação dos analitos: coluna Luna Omega PS C18 (150 x 2.1 mm i.d., 5.0 µm, 100A Phenomenex) com uma pré-coluna C18 4,0 x 3,0 mm (Phenomenex, Torrance, CA) eluída em gradiente por uma solução constituída de 0,01% de ácido fórmico em água (Solução A) e 40 % de acetonitrila em tampão acetato de amônio 10 mM (Solução B), a 30 ºC (0 – 2,5 min, 0 – 90% de B, 400 µL/min; 2,5 – 6 min, 90% de B, 400 µL/min; 6 – 6,5 min, 90 – 2% de B, 400 – 600 µL/min; 6,5 – 7 min, 2 – 90% de B, 600 µL/min; 7 – 8 min, 90% de B, 600 µL/min; 8 – 9 min, 90 – 0% de B, 600 µL/min; 9 – 14 min, 0% de B, 600 µL/min; 14 – 15 min, 0% de B, 600 – 400 µL/min). A fração cromatográfica compreendida entre 0,6 e 7,0 min foi direcionada para o espectrômetro de massas.

Tabela 3. Fragmentações e energias utilizadas para quantificação de metabólitos (Método 2) em células BEAS-2B (DP: potencial de dissociação; CE: energia de colisão; CXP: potencial de saída da célula).

Analito	Q1	Q3	Dwell Time (msec)	DP (V)	CE (V)	CXP (V)
Nicotinamida 1	122,9	80,0	150	61	31	14
Nicotinamida 2	122,9	78,0	150	61	35	14
NMN 1	335,1	123,0	150	36	23	6
NMN 2	335,1	97,0	150	36	39	18
Adenosina 1	268,1	136,0	150	56	31	6
Adenosina 2	268,1	119,0	150	56	67	22
NAD^+ 1	664,1	135,9	150	61	67	6
NAD^+ 2	664,1	427,5	150	61	39	10
$NADP^+$ 1	744,0	136,3	150	61	83	4
$NADP^+$ 2	744,0	603,0	150	61	31	16
Benzamida (PI)	122,0	104,9	150	51	19	18

Método 3. As análises foram conduzidas com ionização por *electrospray* em modo negativo (ESI^-, $[M–H]^-$), com os seguintes parâmetros otimizados: CUR, 18 psi; GS1, 40 psi; GS2, 45 psi; CAD, medium; TEM, 700 ºC; EP, -10 V e IS, -4500 V. As fragmentações e energias utilizadas no MRM estão apresentadas na **Tabela 4**. A razão entre as áreas (metabólitos/$[^{13}C_{10}{}^{15}N_5]$ATP) foi utilizada para quantificação. Curvas padrão foram preparadas e injetadas para os metabólitos listados e a seguinte condição cromatográfica foi otimizada para separação dos analitos: coluna Luna Omega PS C18 (150 x 2.1 mm i.d., 5.0 µm, 100A, Phenomenex) com uma pré-coluna C18 4,0 x 3,0 mm (Phenomenex, Torrance, CA) eluída em gradiente por uma solução constituída de 0,01% de ácido fórmico em água (Solução A) e 40 % de acetonitrila em tampão acetato de amônio 10 mM (Solução B), a 30 ºC, com fluxo de 600 µL/min (0 – 1 min, 0% de B; 1 – 1,5 min, 0 a 100% de B; 1,5 – 4 min, 100 a 70% de B; 4 – 5 min, 70 a 20% de B; 5 – 7 min, 20 a 0% de B; 7 – 14 min, 0% de B). A fração cromatográfica compreendida entre 1 e 9 min foi direcionada para o espectrômetro de massas.

Tabela 4. Fragmentações e energias utilizadas para quantificação de metabólitos (Método 3) em células BEAS-2B (DP: potencial de dissociação; CE: energia de colisão; CXP: potencial de saída da célula).

Analito	Q1	Q3	Dwell Time (msec)	DP (V)	CE (V)	CXP (V)
ADP 1	425,878	78,800	500	-70	-64	-13
ADP 2	425,878	158,700	500	-70	-42	-9
ATP 1	505,978	78,800	500	-65	-124	-17
ATP 2	505,978	159,000	500	-65	-48	-3
AMP 1	345,887	78,900	50	-50	-66	-1
AMP 2	345,887	96,800	50	-50	-20	-1
ATP (PI)	521,000	78,800	500	-65	-124	-17

3.2.17 Quantificação de proteínas totais

A quantidade de proteínas em solução foi determinada pelo método de Bradford. O método se baseia na observação de que o azul brilhante de Coomassie se converte da forma vermelha para azul após ligação a proteínas. O complexo é formado rapidamente e permanece estável por um tempo relativamente longo (1 h), e tem alto coeficiente de extinção, o que permite grande sensibilidade na dosagem de proteínas (BRADFORD, 1976). Após o procedimento de extração dos metabólitos intracelulares descritos acima, as proteínas presentes nas placas foram solubilizadas com 40 µL de NaOH (300 mM) e armazenadas a -20 °C. Para a quantificação, foram adicionados 195 µL de NaCl (150 mM), 5 µL ou 7 µL de extrato de proteínas e 50 µL de reagente de Bradford. Curvas de calibração foram obtidas no intervalo de concentração de 0,0016 a 0,016 µg/µL de albumina de soro bovino.

3.2.18 Análise dos isótopos de intermediários metabólicos por HPLC-ESI-QTOF

O preparo das amostras foi realizado como descrito por (RAHMAN et al., 2014), com algumas modificações. Após as células BEAS-2B serem expostas a [$^{13}C_4$]fumarato (5 mM de [$^{13}C_4$]fumarato diluído em PBS, pH 8,2, e incubado a 40 ºC por 30 min sob agitação de 100 rpm) por 3, 24, 48, 72, 96 e 120 h, o meio de cultura foi removido e a camada celular foi cuidadosamente lavada com PBS. Subsequentemente, as células foram ressuspensas em 100 µL

de uma solução de acetonitrila em água na proporção de 9:1 (v:v) para a completa inibição do metabolismo celular. As amostras foram armazenadas a -80 °C. Na sequência, foram adicionados 385 µL de uma solução de solvente de extração (40% acetonitrila, 40% metanol e 20% água). Após homogeneização e centrifugação (20.000 *g*, 10 min), alíquotas de 450 µL foram transferidas para *eppendorfs*. Por fim as amostras foram armazenadas a -20 °C. No momento da análise, antes da secagem a vácuo, foi adicionado ácido benzoico (3,05 µL do padrão 0,01 µg/µL, correspondendo no final a 50 pmol no volume de injeção) como padrão interno. Após a secagem a vácuo, as amostras foram ressuspensas em 30 µL de água ultrapura e centrifugadas por 5 min a 16.000 *g*. O volume de 12 µL foi injetado no sistema de HPLC acoplado a um espectrômetro de massas com analisador do tipo quadupolo-tempo-de-vôo e ionização por *electrospray* (HPLC-ESI-QTOF). Uma amostra de controle de qualidade (QC) foi preparada contendo uma mistura de 30 µL de todas as amostras (controle e teste). Essa amostra foi injetada no início, a cada 6 amostras e ao final das análises para assegurar a qualidade das análises. As análises foram feitas em colaboração com a doutoranda Andréa Tedesco Faccio do laboratório da Profa. Dra. Marina Franco Maggi Tavares do Instituto de Química da USP (IQ-USP) em conjunto com o laboratório do Professor Massuo Jorge Kato do Instituto de Quimica da USP (IQ-USP). A seguinte condição cromatográfica foi otimizada para separação dos analitos: coluna Luna Omega PS C18 (150 x 2.1 mm i.d., 5.0 µm, 100A, Phenomenex) com uma pré-coluna C18 4,0 x 3,0 mm (Phenomenex, Torrance, CA) eluída em gradiente por uma solução constituída de 0,1% de ácido fórmico em água (Solução A) e 40 % de acetonitrila em tampão acetato de amônio 10 mM (Solução B), a 30 ºC (0 – 4 min, 2 – 60% de B, 450 µL/min; 4 – 4,5 min, 60 – 100% de B, 450 – 600 µL/min; 4,5 – 5 min, 100% de B, 600 µL/min; 5 – 5,5 min, 100 – 2% de B, 600 µL/min; 5,5 – 6 min, 2 – 40% de B, 600 µL/min; 6 – 6,5 min, 40 – 2% de B, 600 µL/min; 6,5 – 14 min, 2% de B, 600 µL/min; 14 – 15 min, 2% de B, 600 - 450 µL/min). Os dados foram tratados utilizando-se o programa de processamento de dados de espectrometria de massas livre R pelo pacote XCMS (SMITH et al., 2006) como análise global dos metabólitos detectados não direcionada.

3.2.19 Análise dos isótopos de intermediários metabólicos por HPLC-ESI-MS/MS triplo-quadrupolo

O preparo das amostras foi realizado como descrito por (RAHMAN et al., 2014), com algumas modificações. Após as células BEAS-2B serem expostas a [$^{13}C_4$]fumarato (5 mM de [$^{13}C_4$]fumarato diluído em PBS, pH 8,2, e incubado a 40 ºC por 30 min sob agitação de 100 rpm) por 3, 24, 48, 72, 96 e 120 h, o meio de cultura foi removido e a camada celular foi cuidadosamente lavada com PBS. Subsequentemente, as células foram ressuspensas em 100 µL de uma solução de acetonitrila em água na proporção de 9:1 (v:v) para a completa inibição do metabolismo celular. As amostras foram armazenadas a -80 °C. Na sequência, foram adicionados 385 µL de uma solução de solvente de extração (40% acetonitrila, 40% metanol e 20% água). Após homogeneização e centrifugação (20.000 *g*, 10 min), alíquotas de 450 µL foram transferidas para *eppendorfs*. Por fim as amostras foram armazenadas a -20 °C. No momento da análise, antes da secagem a vácuo, foi dicionado ácido benzóico (3,05 µL do padrão 0,01 µg/µL, correspondendo no final a 50 pmol no volume de injeção) como padrão interno. Após a secagem a vácuo, as amostras foram ressuspensas em 30 µL de água ultrapura e centrifugadas por 5 min a 16.000 *g*. O volume de 6 µL foi injetado no sistema HPLC-ESI-MS/MS. As proteínas das amostras foram quantificadas e os resultados foram expressos em pmol/µg de proteína. Uma amostra de QC foi preparada contendo uma mistura de 30 µL de todas as amostras (controle e teste). Essa amostra foi injetada no início, a cada 10 amostras e ao final das análises para assegurar a qualidade das análises. As análises foram conduzidas com ionização por *electrospray* em modo negativo (ESI^-, $[M–H]^-$), com os seguintes parâmetros otimizados: CUR, 18 psi; GS1, 40 psi; GS2, 45 psi; CAD, medium; TEM, 700 ºC; EP, -10 V e IS, -4500 V. As fragmentações e energias utilizadas no MRM estão apresentadas na **Tabela 5**. A razão entre as áreas (metabólitos/ácido benzóico) foi utilizada para quantificação. A seguinte condição cromatográfica foi otimizada para separação dos analitos: coluna Luna Omega PS C18 (150 x 2.1 mm i.d., 5.0 µm, 100A, Phenomenex) com uma pré-coluna C18 4,0 x 3,0 mm (Phenomenex, Torrance, CA) eluída em gradiente por uma solução constituída de 0,1% de ácido fórmico em água (Solução A) e 40 % de acetonitrila em tampão acetato de amônio 10 mM (Solução B), a 30 ºC (0 – 4 min, 2 – 60% de B, 450 µL/min; 4 – 4,5 min, 60 – 100% de B, 450 – 600 µL/min; 4,5 – 5 min, 100% de B, 600 µL/min; 5 – 5,5 min, 100 – 2% de B, 600 µL/min; 5,5 – 6 min, 2 – 40% de B, 600 µL/min; 6 – 6,5 min, 40 – 2% de B, 600 µL/min; 6,5 – 14 min, 2% de B, 600 µL/min; 14 – 15 min, 2% de B, 600 - 450 µL/min). A fração cromatográfica compreendida entre 0,5 e 8,0 min foi direcionada para o espectrômetro de massas.

Tabela 5. Fragmentações e energias utilizadas para quantificação dos isótopos de intermediários metabólicos em células BEAS-2B expostas a [$^{13}C_4$]fumarato (DP: potencial de dissociação; CE: energia de colisão; CXP: potencial de saída da célula).

Analito	Q1	Q3	Dwell Time (msec)	DP (V)	CE (V)	CXP (V)
Fumarato 1	114,896	70,933	150	-35	-12	-1
[$^{13}C_4$]**Fumarato 1**	118,900	73,933	150	-35	-12	-1
Succinato 1	116,900	72,800	50	-30	-18	-11
[$^{13}C_4$]**Succinato 1**	120,900	75,800	50	-30	-18	-11
Malato 1	132,839	114,700	200	-45	-16	-19
[$^{13}C_4$]**Malato 1**	136,839	118,700	200	-45	-16	-19
Citrato 2	190,900	86,900	200	-35	-26	-3
[$^{13}C_4$]**Citrato 2**	194,900	86,900	200	-35	-26	-3
Aspartato 1	131,900	87,700	50	-45	-20	-5
[$^{13}C_4$]**Aspartato 1**	135,900	90,700	50	-45	-20	-5
Glutamato 1	145,900	101,900	50	-50	-18	-5
[$^{13}C_3$]**Glutamato 1**	148,845	130,700	50	-50	-18	-7
Argininosuccinato 1	289,000	270,700	50	-60	-16	-5
[$^{13}C_4$]**Argininosuccinato 1**	293,000	274,700	50	-60	-16	-5
Ácido Benzóico (PI)	120,900	76,900	150	-60	-20	-1

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Citotoxidade do fumarato

Células BEAS-2B, negativas para *Mycoplasma sp* (**Figura 4A**), foram expostas ao fumarato nas concentrações de 0,1 mM, 1 mM, 5 mM e 10 mM ao longo de 144 horas (a morfologia das células ao longo da exposição está aprentada na **Figura 4B**), para avaliação da citotoxicidade (ensaios do cristal violeta e MTT) (**Figuras 5** e **6**). O ensaio de redução de MTT é um ensaio de viabilidade celular, no qual, basicamente, células viáveis com metabolismo ativo convertem o reagente MTT em um produto de coloração, enquanto células mortas não são capazes de realizar essa conversão. Esse mecanismo envolve atividade de enzimas mitocondriais, e assim o ensaio pode ser uma forma de mensurar a atividade mitocondrial. A análise de *Population Doubling Time* (PDT) foi feita para avaliar o tempo que as células levam para se duplicar ao longo da exposição (**Figura 7**). Não houve diferença no comportamento das células ao longo do tratamento. Uma vez que todas as concentrações se mostraram não citotóxicas (**Figuras 5** e **6**), foram selecionadas as concentrações de 1 mM, 5 mM e 10 mM para as incubações subsequentes.

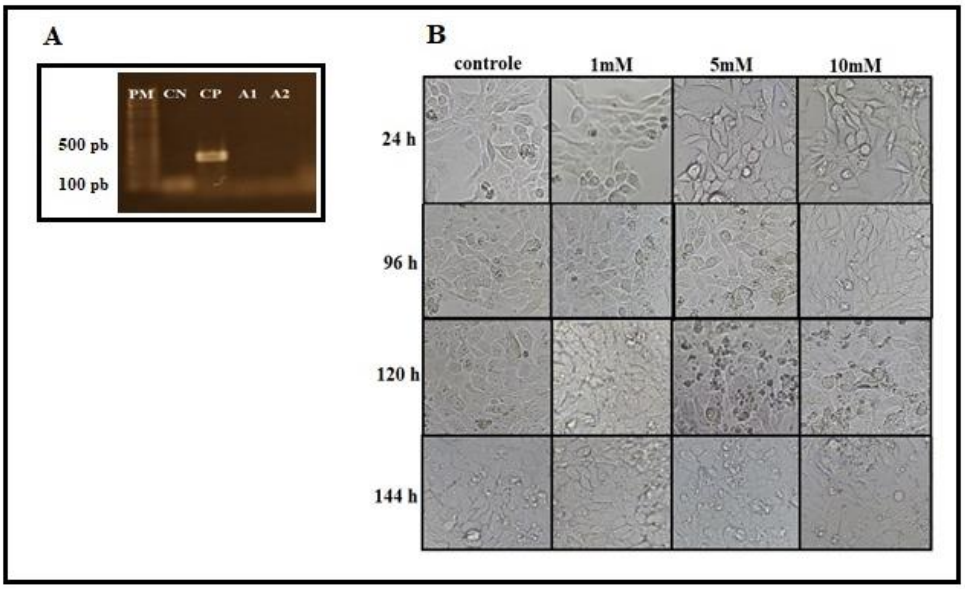

Figura 4 – A. Eletroforese em gel de agarose 3%. PCR para teste de *Mycoplasma sp* no meio de cultura. PM = padrão de peso molecular com tamanho de 1000 pares de base (pb); CN = controle negativo; CP = controle positivo; amostras A1 e A2. **B.** Imagens de microscopia para visualização da morfologia celular após suplementação do meio de cultura de células BEAS-2B com fumarato (1, 5 10 mM) por 144 horas.

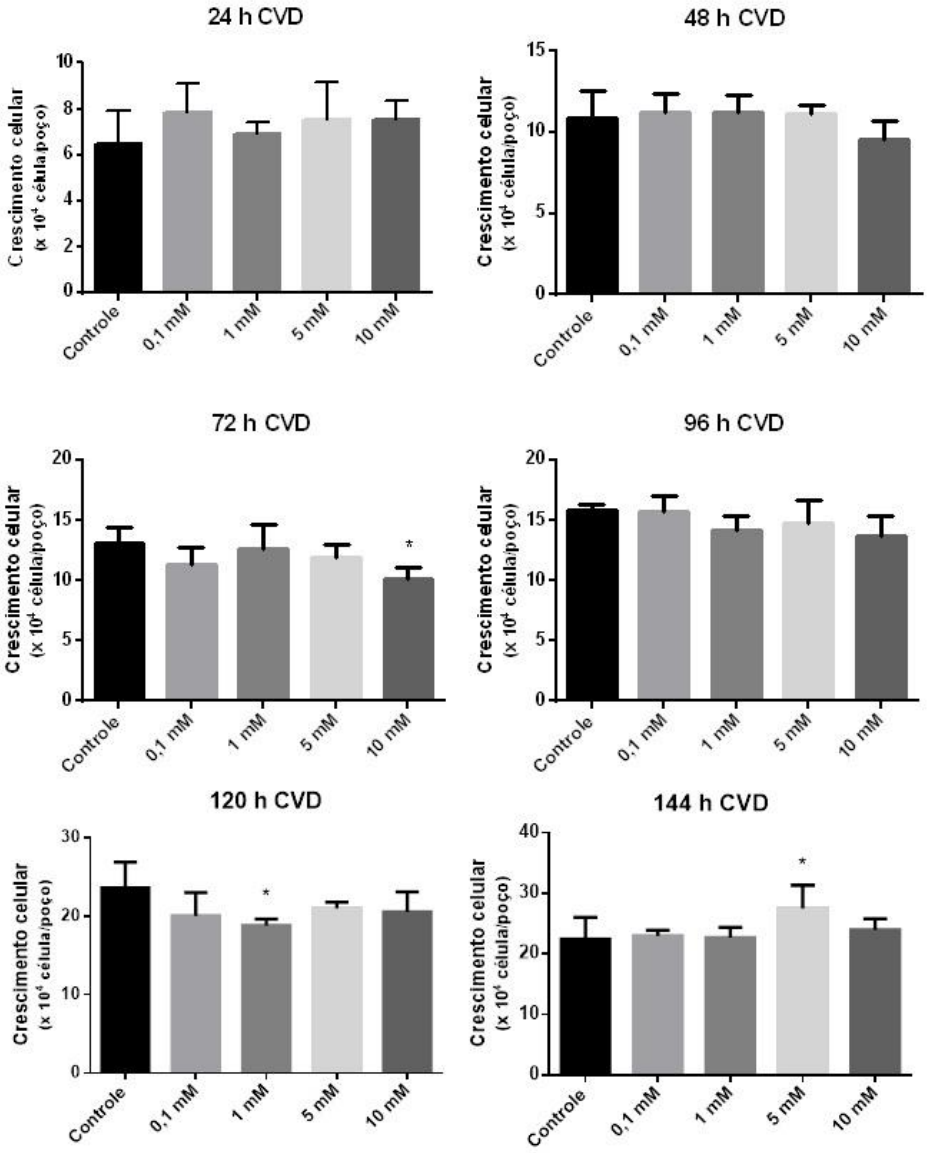

Figura 5 – Crescimento das células BEAS-2B expostas a fumarato (0,1, 1, 5 e 10 mM). As análises foram feitas utilizando o método do CVD conforme descrito em Material e Métodos. Asteriscos indicam a significância das diferenças entre o grupo exposto ao fumarato e o grupo controle em cada tempo, ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, * $p < 0,05$; N = 4 ou 5.

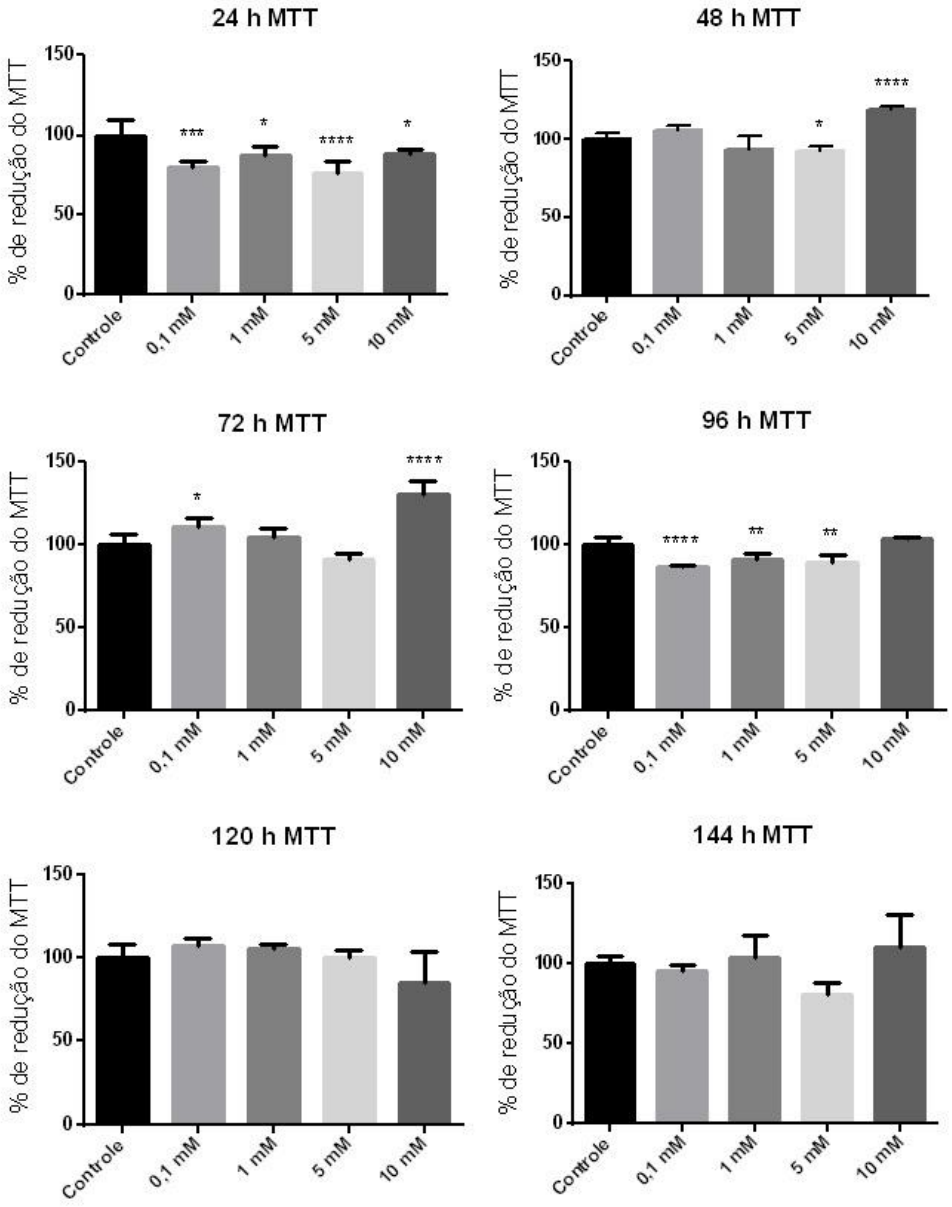

Figura 6 – Atividade mitocondrial de células BEAS-2B expostas a diferentes concentrações de fumarato. A análise da atividade da cadeia respiratória mitocondrial utilizando o ensaio do MTT foi realizada conforme descrito em Material e Métodos. Asteriscos indicam a significância das diferenças entre o grupo exposto ao fumarato e o grupo controle em cada tempo, ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, *$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$, ****$p < 0.0001$; N = 4 ou 5.

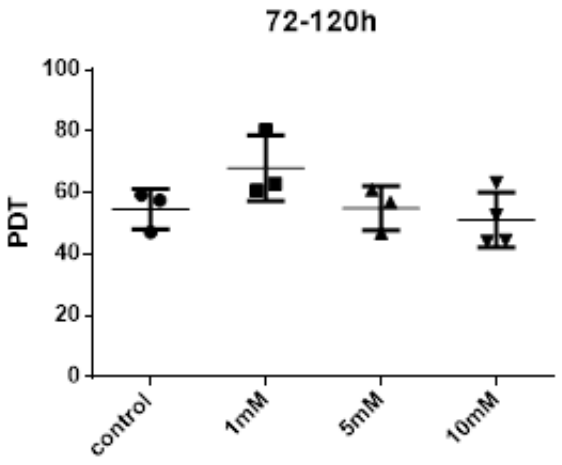

Figura 7 – Tempo de duplicação da população de células (PDT, média ± desvio padrão) calculado para o período de crescimento exponencial (72 a 120 h).

Um estudo realizado por Forster e colaboradores (2013) foi feito utilizando a linhagem de mastócitos humanos (HMC-1) incubada com diferentes concentrações de dimetilfumarato (DMF), tendo sido verificada a indução de apoptose depois de 24 h e 48 h. A exposição ao DMF (25 µg/mL) aumentou significantemente a expressão de proteínas pró-apoptóticas, demonstrando o envolvimento da via apoptótica mitocondrial na execução de morte celular em resposta ao DMF (FÖRSTER et al., 2013). DMF é, no entanto, um derivado do fumarato que atravessa facilmente a membrana plasmática (ZHENG et al., 2015). Ésteres de fumarato, como dimetilfumarato, têm apresentado propriedades anti-tumorigênicas (KALUZKI et al., 2016).

Em outro estudo foi investigada a viabilidade de uma linhagem de célula endotelial vascular umbilical humana, avaliada pela contagem de células em azul de tripan, depois de 24 h de incubação com fumarato ou succinato (0,01 ou 10 nmol/mL). Não foi observado efeito de succinato e fumarato na viabilidade celular (GARRIGUE et al., 2017). Os dados que obtivemos estão de acordo com esse estudo.

Na sequência, as células foram expostas a fumarato nas concentrações de 1, 5 e 10 mM para as análises do ciclo celular em 24, 72, 96 e 144 h (**Figura 8**).

Foi observada diminuição da população de células na fase G0/G1 após exposição a 5 e 10 mM de fumarato por 96 e 144 h. Pequenas alterações nas porcentagens de células nas fases S e G2/M (aumento na fase S, aumento ou diminuição na fase G2/M) foram observadas nas

exposições a 1 e 5 mM de fumarato por 24, 72 e 96 horas. Essas alterações demonstram paradas no ciclo, que podem ocorrer em decorrência de danos sofridos pelas células e a necessidade de reparo. Os dados estão de acordo com a observação da baixa citotoxicidade do fumarato.

A maioria das células somáticas, quando quiescentes, ficam na fase G0 do ciclo celular. Em seguida ao estímulo mitogênico, as células entram na fase G1, onde se preparam para iniciar a replicação do DNA. Posteriormente, entram na fase S, na qual duplicam o DNA, passam para a fase G2 e a mitose, na qual o conteúdo celular é dividido em duas células-filhas (KAPLON; VAN DAM; PEEPER, 2015). O desenvolvimento do câncer envolve uma desregulação do ciclo celular (ZHAO et al., 2018). O controle do ciclo celular está intimamente relacionado com a regulação de vias metabólicas para permitir a sobrevivência e a proliferação das células (KAPLON; VAN DAM; PEEPER, 2015). Hipóxia ou fatores transcricionais induzidos por hipóxia podem alterar a progressão do ciclo celular e provocar parada em G1/S. Em um estudo de silenciamento de prolil hidroxilase (PHD) foi observado aumento da população de células na fase G1 quando submetidas à hipóxia crônica, sugerindo o envolvimento de HIF-1α na regulação do ciclo celular (JEONG et al., 2018).

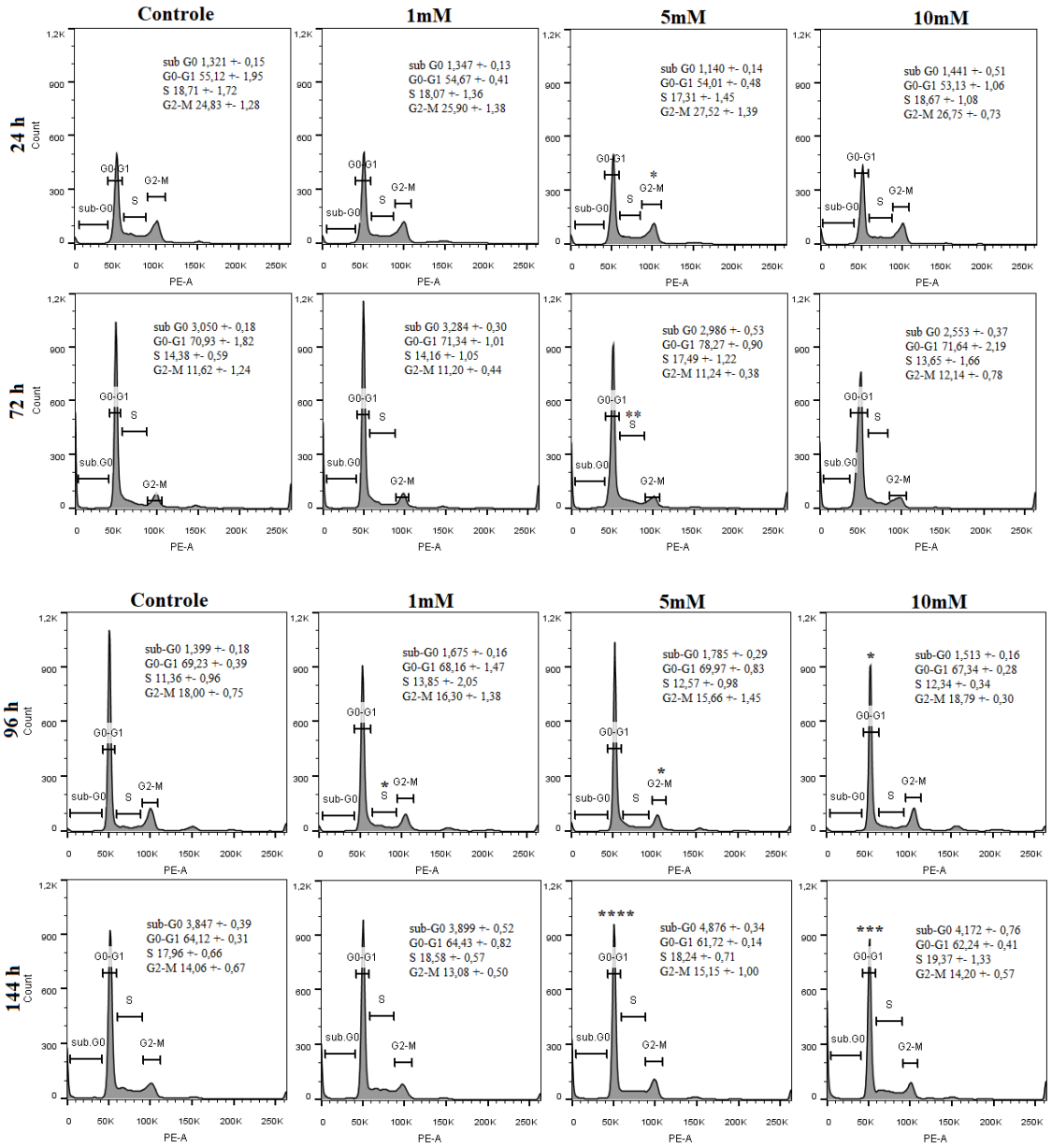

Figura 8 – Análise do ciclo de células BEAS-2B expostas a fumarato (1, 5 e 10 mM) por 24, 72, 96 e 144 h (N=4). As fases do ciclo celular (subG0, G0/G1, S e G2/M) e as porcentagens de células em cada fase estão apresentadas. *$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ em relação ao controle, ANOVA com teste de comparações múltiplas de Dunnett.

4.2 Análise da transformação de células BEAS-2B expostas a fumarato

É bem estabelecido na literatura que a capacidade de crescimento independente de ancoragem de células transformadas em um meio semissólido reflete sua tumorigenicidade *in vivo* (DING et al., 2009). Somente as células epiteliais transformadas crescem independentemente da ancoragem. Assim, com o intuito de observarmos se fumarato induz a transformação das células BEAS-2B, foi feito o ensaio de crescimento das células em meio semissólido (*soft agar*) após o período de exposição ao fumarato. Observou-se a formação de colônias em *soft agar* após o período de sete dias (168 h) de exposição. As colônias aparecem mais agrupadas nos grupos expostos ao fumarato em comparação ao controle (**Figuras 9A**). Os dados apresentados na **Figura 9B** são representativos de 2 experimentos independentes realizados em triplicata e quintuplicata.

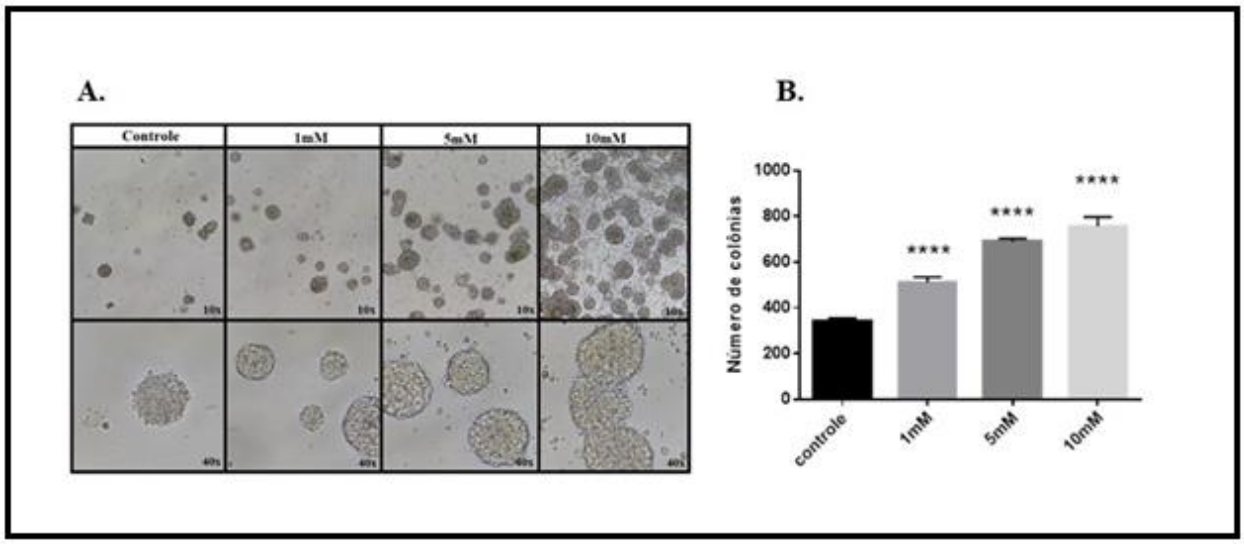

Figura 9 – A. Imagens de microscopia para visualização das colônias crescidas no *soft agar*. **B.** Contagem de colônias em meio semissólido *soft-agar* após 168 h de exposição das células BEAS-2B a diferentes concentrações de fumarato, e do grupo controle (N = 5). Asteriscos indicam a significância das diferenças entre o grupo exposto ao fumarato e o grupo controle, ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, *$p < 0.05$, ****$p < 0.0001$.

Após a observação microscópica do agrupamento das colônias, resolveu-se analisar a capacidade de invasão em câmara de Boyden (*transwell*). Colônias retiradas do *soft agar* (provenientes das incubações prévias dos grupos controle, 1 mM, 5 mM e 10 mM de fumarato) foram cultivadas (**Figura 10A**) e, após 90 dias em cultura, as células foram submetidas ao ensaio

de invasão em câmara de Boyden (*transwell*) conforme o desenho experimental apresentado na **Figura 10B**. Foi verificado que as células das colônias decorrentes das exposições ao fumarato apresentaram um aumento significante de invasão em comparação com o grupo controle (**Figura 10C**). Além disso, as células expostas a 5 mM de fumarato apresentaram, após crescimento em *soft-agar* e 90 dias em cultura, tempo de duplicação menor do que o controle, enquanto as expostas a 10 mM de fumarato apresentaram tempo de duplicação maior do que o controle (**Figura 10D**). Observou-se também diminuição do tempo da divisão celular em comparação com o PDT das células anteriores ao *soft-agar* (**Figura 10D**, comparar com **Figura 7**). Os dados mostram a persistência dos efeitos da exposição ao fumarato após um longo período de não exposição (15 dias no soft-agar + 90 dias em cultura).

A metástase é uma das peculiaridades do câncer que marca o início da disseminação tumoral, sendo observada a migração, invasão e sobrevivência do tumor em tecidos distantes do tecido de origem. A desregulação da atividade de fumarato hidratase (FH) e o acúmulo de fumarato tem papel na indução da transição epitélio mesenquimal (EMT). Em outro estudo foram comparadas células UOK262 deficientes em FH com células UOK262 com a FH reconstituída e foi observado aumento da migração das células deficientes em FH em comparação à linhagem de células com a FH reconstituída. A desregulação da atividade da FH com indução de EMT pode ocorrer em outros tipos de tumor, incluindo neuroblastoma, câncer colorretal e câncer de pulmão (SCIACOVELLI et al., 2017).

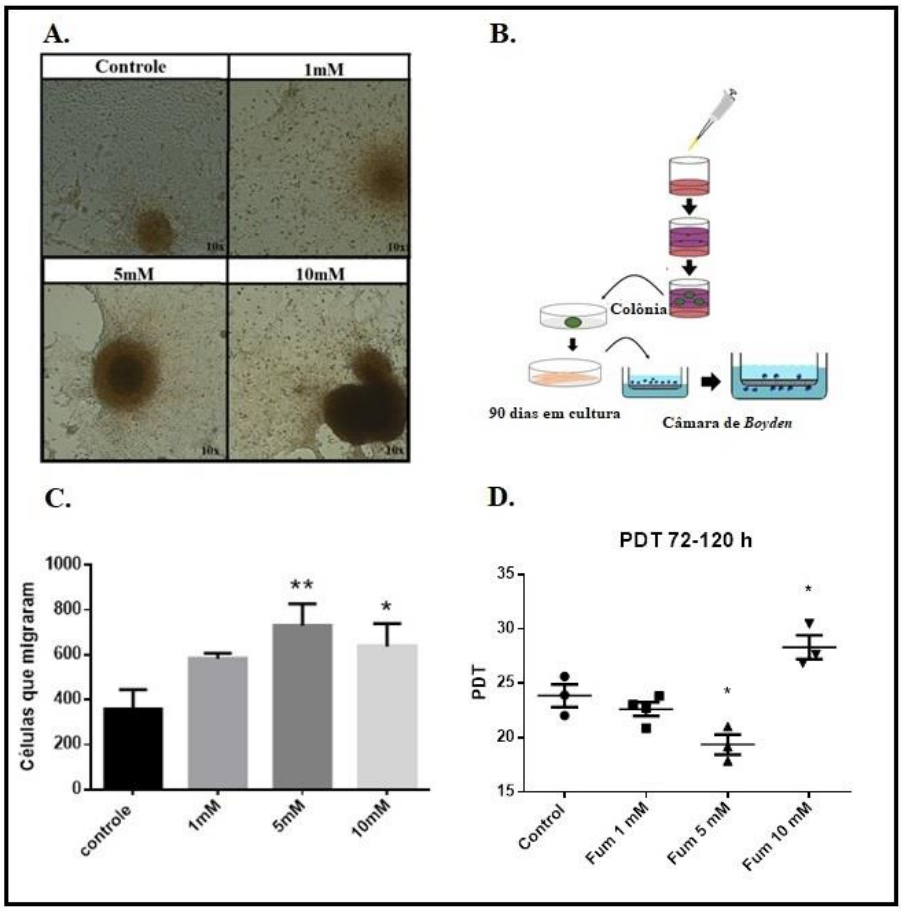

Figura 10 – A. Colônias removidas do *soft-agar* e que foram, na sequência, mantidas por 90 dias em cultura, com repiques realizados ao atingirem a confluência. **B.** Esquema do desenho experimental para os ensaios de transformação e invasão de células BEAS-2B. Colônias crescidas no meio semissólido *soft-agar* foram coletadas e cultivadas separadamente em poços para cada grupo de exposição prévia (controle, 1 mM, 5 mM e 10 mM). Após a aderência das colônias nos poços, células crescidas ao redor da colônia foram cultivadas durante 90 dias com trocas do meio de cultura a cada 72 horas e tripsinização ao atingirem 80% de confluência. Para o ensaio de transwell, essas células foram tripsinizadas e plaqueadas para a câmara de Boyden. **C.** Análise da invasão em câmara de Boyden (*transwell*) das células das colônias após 90 dias em cultura. **D.** *Population Doubling Time* (PDT) das células obtidas a partir das colônias, após 90 dias em cultura. Asteriscos indicam a significância das diferenças entre o grupo exposto ao fumarato e o grupo controle, ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, *$p < 0,05$, **$p < 0,01$; N = 3 ou 4.

4.3 Efeito do fumarato em marcas epigenéticas

O acúmulo de fumarato induz a inativação das enzimas TETs em células deficientes em FH, o que pode levar à hipermetilação de ilhas CpG (SCIACOVELLI; FREZZA, 2016; FUHLER; EPPINGA; PEPPELENBOSCH, 2017). Entretanto, dados sobre os níveis de 5-hmC em estudos com células deficientes em FH são controversos. Por exemplo, em um estudo com células deficientes em FH não foi encontrada diferença de níveis de 5-hmC (GUITART et al., 2017), enquanto que os níveis de 5-hmC se mostraram aumentados em células UOK262 (SCIACOVELLI et al., 2017). Por outro lado, foi verificado que o acúmulo de fumarato em células mutadas para fumarato hidratase leva à inibição da hidroxilação de 5-mC no DNA (XIAO et al., 2012).

Assim, quantificamos aqui os níveis globais de 5-mC e 5-hmC no DNA das células BEAS-2B expostas ao fumarato. Os níveis de 5-mC se mostraram inalterados no DNA das células expostas por 168 h às diferentes concentrações de fumarato, assim como no DNA extraído das células que cresceram no *soft-agar*. Entretanto, como esperado em decorrência da inibição de enzimas TET, houve redução dos níveis de 5-hmC no DNA das células incubadas com fumarato em comparação com o controle. Essa alteração foi verificada imediatamente após o período de 168 h de exposição (**Figura 11A**), 22 dias após o fim do período de exposição (**Figura 11B**), e nas células crescidas no *soft-agar* (**Figura 11C**), indicando persistência da alteração após o fim da exposição ao fumarato.

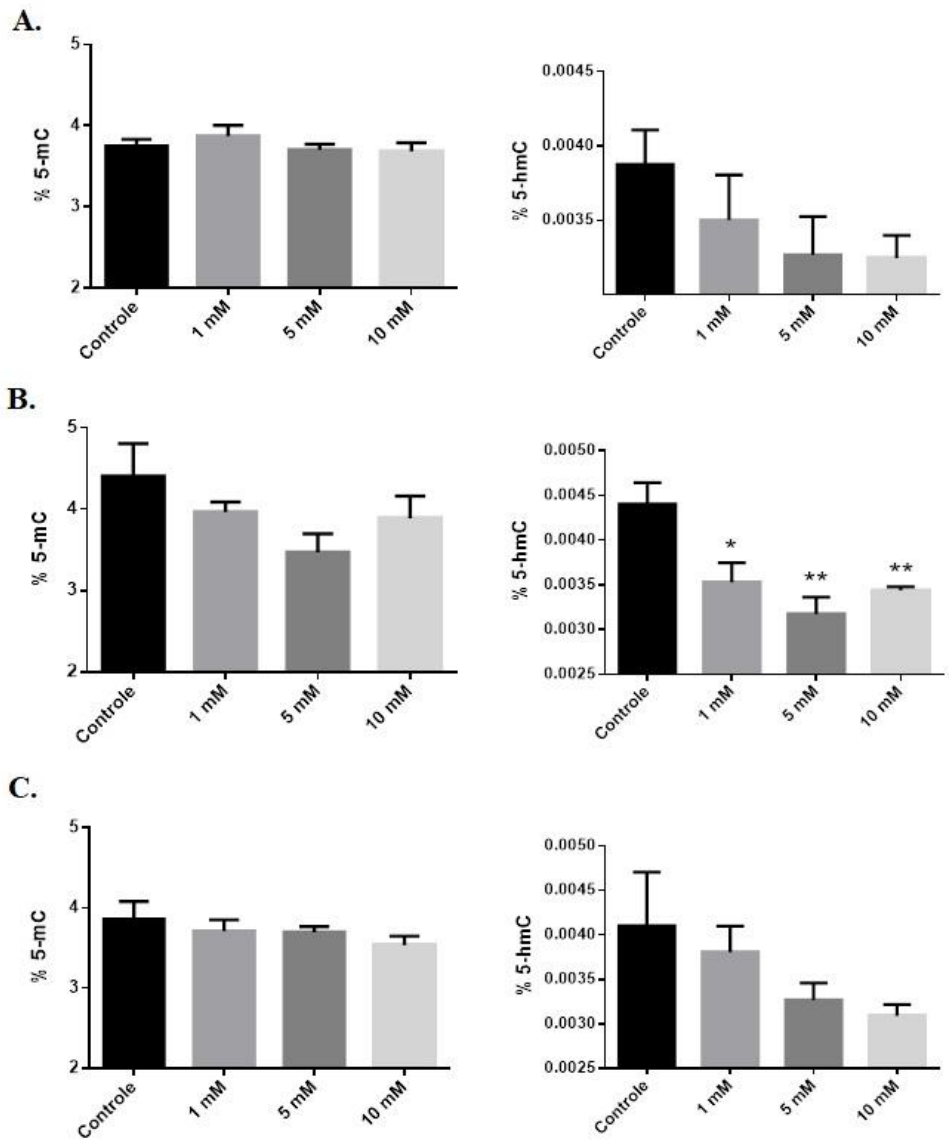

Figura 11 – A. Quantificação de 5-mC e 5-hmC no DNA das células BEAS-2B após 168 h de exposição a diferentes concentrações de fumarato, e do grupo controle (N = 3 a 5). Os dados foram obtidos como descrito em Material e Métodos. Sem diferenças estatísticas, ANOVA com teste de comparações múltiplas de Dunnett. **B.** Quantificação de 5-mC e 5-hmC no DNA das células BEAS-2B que permaneceram em cultura por 22 dias após 168 h de exposição a diferentes concentrações de fumarato, e do grupo controle (N = 3 a 5). Os dados foram obtidos como descrito em Material e Métodos. *$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ANOVA com teste de comparações múltiplas de Dunnett. **C.** Quantificação de 5-mC e 5-hmC no DNA das células BEAS-2B que cresceram no *soft-agar* após 168 h de exposição a diferentes concentrações de fumarato, e do grupo controle (N = 3 a 5). Os dados foram obtidos como descrito em Material e Métodos. Sem diferenças estatísticas, ANOVA com teste de comparações múltiplas de Dunnett.

4.4 Efeito do fumarato no estresse redox celular

Fumarato é um composto carbonílico α,β-insaturado que pode modificar nucleófilos via adição de Michael, sendo, portanto, reativo. A reação melhor descrita do fumarato com um nucleófilo é a sua ligação a resíduos de cisteína, conhecida como succinação. Assim, glutationa (GSH) é um alvo importante para succinação, sendo o produto conhecido como GSF ou *succinic*-GSH, resultante da adição do carbono β do fumarato à sulfidrila da cisteína. Altos níveis de fumarato podem, portanto, favorecer a ocorrência de estresse redox por impedir que GSH exerça sua ação antioxidante. Adicionalmente, a restauração de GSH a partir de GSF consome NADPH, o que também diminui a capacidade antioxidante da célula. Resíduos de cisteína em proteínas podem ser também succinados em tumores que apresentam altos níveis de fumarato. Uma das proteínas que pode sofrer tal succinação é a proteína KEAP1, que mantém o *fator nuclear eritróide*2 relacionado ao fator 2 (fator de transcrição Nrf2) no citoplasma. A succinação de KEAP1 permite a liberação e translocação de Nrf2 para o núcleo e o início da transcrição de genes para melhorar a capacidade antioxidante da célula e proteger contra dano excessivo. Esse aumento da capacidade antioxidante pode, por sua vez, aumentar a tolerância de células transformadas aos metabólitos reativos gerados na reprogramação metabólica do processo carcinogênico e, assim, favorecer a promoção e progressão tumorais (SULLIVAN; GUI; VAN DER HEIDEN, 2016).

Assim, duas análises foram realizadas a fim de entender se fumarato nas concentrações utilizadas induz estresse redox nas células BEAS-2B: a quantificação da geração de ROS intracelular e a quantificação do malonaldeído (MDA), um produto da peroxidação lipídica, no meio de crescimento das células.

A quantificação de espécies reativas de oxigênio (ROS) intracelular foi realizada após exposição das células a 1, 5 e 10 mM de fumarato por 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h. Segundo essa análise, observou-se diminuição da geração de ROS nas células expostas a fumarato (**Figura 12**).

Entretanto, ao verificar os níveis de MDA no meio de cultura, também após exposição das células a 1, 5 e 10 mM de fumarato por 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h, observou-se aumento do dano oxidativo a partir de 72 h de exposição (**Figura 13**).

Uma vez que o dano oxidativo resulta do desbalanço entre a geração de ROS e as defesas antioxidantes a favor dos primeiros, os dados indicam que apesar da menor geração de ROS na

presença de fumarato, o sistema antioxidante das células pode estar comprometido, como explicado acima, o que resulta no dano observado. A quantificação de MDA nos permite a visualização do dano gerado ao longo das 24 h anteriores à coleta do meio de cultura. A análise da geração de ROS utilizando DCFH, por sua vez, só nos permite verificar a geração de ROS no período em que as células se encontram na presença de DCFH, que foi de 1 h. Sendo assim, a quantificação de MDA nos fornece informação mais completa sobre o estado redox das células.

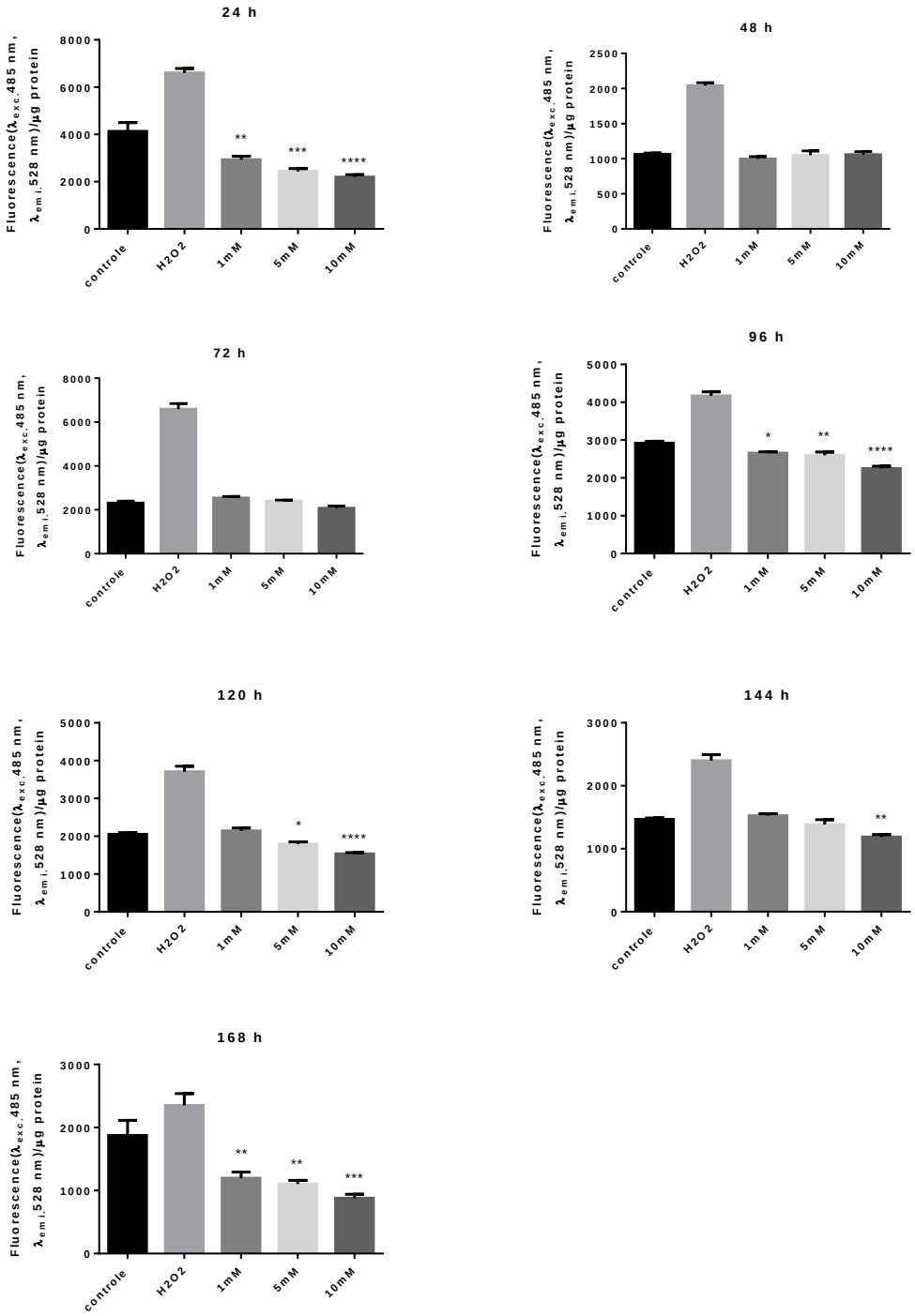

Figura 12 – Análise da geração de ROS intracelular em células BEAS-2B expostas por 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a fumarato (1, 5 e 10 mM), grupo controle, e grupo controle positivo com peróxido de hidrogênio (H_2O_2), N = 5. Média ± erro padrão, *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001 em relação ao controle.

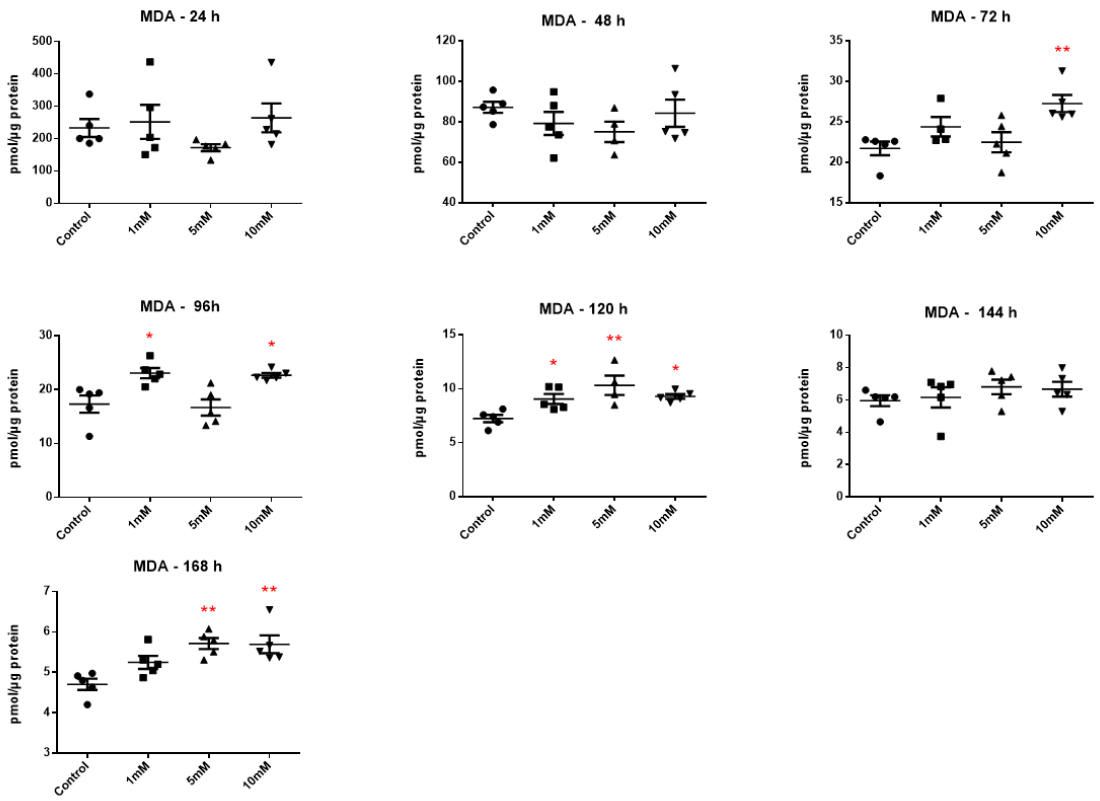

Figura 13 – Níveis do produto MDA-DNPH no meio de cultura ao longo de 168 h de exposição das células BEAS-2B a 1, 5 e 10 mM de fumarato e no grupo controle, N = 4 ou 5, média ± erro padrão. Asteriscos indicam a significância das diferenças entre o grupo exposto ao fumarato e o grupo controle em cada tempo, ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, *p < 0.05, **p < 0.01, ***P < 0,001.

4.5 Efeito do fumarato em vias metabólicas de células BEAS-2B

É bem descrito na literatura que a deficiência de FH leva à diminuição da respiração mitocondrial (FREZZA et al., 2011; TYRAKIS et al., 2017). Foi verificado que a falta da enzima fumarato hidratase diminui o consumo de oxigênio na cadeia respiratória e que altas concentrações intracelulares de fumarato bloqueiam o acesso do succinato ao sítio ativo da succinato desidrogenase (TYRAKIS et al., 2017). Sabe-se que fumarato tem afinidade pelo sítio de ligação do succinato à succinato desidrogenase (SDHA) (FREZZA et al., 2011). O fenótipo metabólico de células deficientes em FH pode favorecer a resistência das células a condições não favoráveis para a função mitocondrial, incluindo hipóxia, sendo uma alteração que pode

contribuir para a progressão tumoral (TYRAKIS et al., 2017). Entretanto, não há relatos sobre efeitos de altas concentrações de fumarato na modulação do metabolismo de células não deficientes em FH.

Um primeiro passo para a análise da modulação metabólica induzida pelo fumarato foi a avaliação da taxa de consumo de glicose pelas células expostas por 24, 48, 96 e 144 h a fumarato (1 mM, 5 mM e 10 mM). Ao contrário do esperado considerando-se os estudos com células deficientes em FH, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos (**Figura 14**).

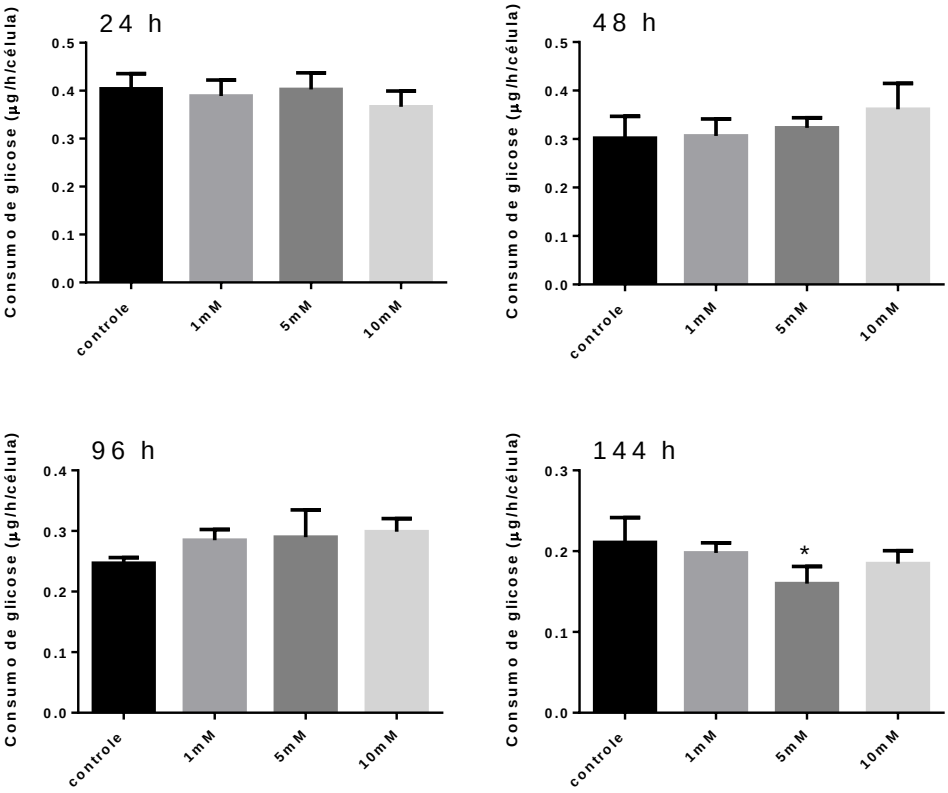

Figura 14 – Análise da taxa de consumo de glicose de células BEAS-2B após 24, 48, 96 e144 horas de incubação com diferentes concentrações de fumarato e do grupo controle, N=4. Asteriscos indicam a significância das diferenças entre o grupo exposto ao fumarato e o grupo controle em cada tempo, ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, *$p < 0.05$.

Procurando entender se a exposição das células ao fumarato poderia levar a alterações dos níveis intracelulares de metabólitos resultantes das reações do fumarato e se essas alterações

teriam efeito no balanço energético celular e em níveis de alguns nucleotídeos, nucleosídeos e aminoácidos relacionados a processos de transformação celular, quantificamos fumarato, arginina, argininosuccinato, aspartato, asparagina, glutamina, glutamato, malato, succinato, citrato, lactato, 2-L-hidroxiglutarato, NAD^+, $NADP^+$, adenosina, AMP, ADP e ATP nas células expostas a 1, 5 e 10 mM de fumarato por 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h (**Figuras 15 a 36**).

Na **Figura 15** é apresentada uma visão geral da modulação dos níveis médios das moléculas quantificadas. O detalhamento dos níveis com as análises estatísticas são apresentados nas **Figuras 16 a 36**.

Verificamos aumento das concentrações intracelulares de fumarato principalmente nas células expostas a 5 e 10 mM, sendo percebido algum aumento (sem diferença estatística) nas células expostas a 1 mM em períodos maiores de exposição (120 e 168 h), como apresentado na **Figura 16**. Essa alteração nos indica que as células absorvem o fumarato presente no meio de cultura.

De acordo com a **Figura 3** (Introdução), fumarato no citoplasma pode reagir com arginina e gerar argininosuccinato pela ação reversa da argininosuccinato liase (ASL). Os níveis de arginina e argininosuccinato são apresentados nas **Figuras 17 e 18**. Observou-se aumento dos níveis de argininosuccinato principalmente nas células expostas às concentrações de 5 e 10 mM de fumarato, mas algum aumento não significativo foi também observado nas células expostas a 1 mM de fumarato a partir de 48 h (**Figura 18**). Esperava-se que ao reagir com fumarato, os níveis intracelulares de arginina diminuíssem. Ao contrário, observamos aumento principalmente nas células expostas a 10 mM de fumarato.

Estudos com subtipos de leiomioma demonstraram que a deficiência de fumarato hidratase (FH) leva a aumento significativo de argininosuccinato, que é utilizado como biomarcador para tumores com deficiência na atividade da enzima FH (HEINONEN et al., 2017).

Outras moléculas que podem ter seus níveis alterados em virtude da presença de excesso de fumarato no citoplasma são aspartato e asparagina (**Figura 3**). Os níveis de aspartato são apresentados na **Figura 19**. Observou-se diminuição dos níveis de aspartato para as diferentes concentrações de fumarato em 24 e 48 h, seguida por normalização e pequenos aumentos não estatisticamente diferentes do controle. No caso da asparagina, a única alteração significativa em relação ao controle foi seu aumento após 24 h de exposição a 10 mM de fumarato (**Figura 20**). A geração de asparagina a partir de aspartato foi verificada como importante para prevenção da

apoptose em células de câncer (SULLIVAN; GUI; VAN DER HEIDEN, 2016). É possível que a exposição ao fumarato tenha algum efeito sobre a modulação das fontes intracelulares de aspartato, de modo que o nível observado não seja diferente do controle. A melhor compreensão dessa modulação será possível ao se analisar os isótopos das moléculas resultantes da exposição a [$^{13}C_4$]fumarato mais adiante.

Arginina, asparagina e argininosuccinato são produtos formados a partir do aspartato no citoplasma (**Figura 3**). Assim, o aspartato gerado pode ser consumido em uma taxa maior. A síntese de aspartato pode depender do fluxo de glutamina pelo ciclo de Krebs (**Figura 37**) e da transaminação de glutamato na matriz mitocondrial (**Figura 38**), e tem papel fundamental na síntese de purinas e pirimidinas (ALTMAN; STINE; DANG, 2016).

Observa-se nas **Figuras 21 e 22** que a exposição ao fumarato leva ao aumento dos níveis de glutamina (24 – 96 h) e diminuição dos níveis de glutamato nas células. A razão glutamina/glutamato encontra-se aumentada em diferentes períodos de exposição das células às diferentes concentrações de fumarato. É possível que haja inibição da conversão de glutamina para glutamato pela glutaminase (GLS) e consumo de glutamato gerando aspartato na matriz mitocondrial, que pode ser transportado para o espaço intermembranas para completar o *shuttle* malato-aspartato ou gerar outros aminoácidos (asparagina, argininosuccinato, arginina) e nucleotídeos no citosol (**Figuras 37 e 38**). A diminuição do nível de glutamato pode diminuir a geração de aspartato por essa via.

Glutamina disponibiliza carbono e nitrogênio para muitas reações biossintéticas, como síntese de lipídeos, aminoácidos e nucleotídeos. Glutamato participa na biossíntese de prolina, aspartato, alanina e serina, disponíveis para a síntese de cisteína, glicina, asparagina e arginina. Glutamato é um dos três aminoácidos que constituem a glutationa. Esses aminoácidos desempenham um papel importante em muitos aspectos do metabolismo tumoral (**Figuras 39 e 40**) (CHOI; COLOFF, 2019).

Fumarato, no ciclo de Krebs, é convertido a malato pela fumarato hidratase. Observou-se grande aumento dos níveis de malato nas células expostas a 5 e 10 mM de fumarato ao longo do tempo (**Figura 24**). Essa observação nos indica que o fumarato absorvido pelas células chega às mitocôndrias e entra no ciclo do ácido tricarboxílico, o que pode favorecer a geração de ATP por essas células.

Além de ser convertido para malato no ciclo de Krebs, há estudos mostrando que, em condição de hipóxia e falta de nutrientes, fumarato pode ser convertido para succinato pela atividade reversa da succinato desidrogenase (FINDER; HARDIN, 1999; SAKAI et al., 2012). Essa redução de fumarato para succinato pela atividade fumarato redutase do complexo II da cadeia de transporte de elétrons permite a respiração celular (geração de ATP) sob baixa disponibilidade de O_2 (FINDER; HARDIN, 1999; SRIDHARAN et al., 2008; SAKAI et al., 2012). A respiração celular utilizando fumarato como aceptor final de elétrons da cadeia respiratória tem se mostrado presente em células de câncer (SAKAI et al., 2012).

Os níveis de succinato são apresentados na **Figura 25**. Observa-se um discreto aumento nas células expostas a fumarato em diferentes períodos, havendo diferença estatística do grupo exposto por 96 h a 10 mM de fumarato em relação ao controle. A conclusão sobre se fumarato é reduzido diretamente para succinato pela ação reversa da succinato desidrogenase será apresentada mais adiante com as análises dos produtos resultantes da exposição das células a [$^{13}C_4$]fumarato.

Na sequência de reações no ciclo de Krebs, a partir do malato, temos a geração de oxaloacetato e citrato. Foi possível observar aumento dos níveis de citrato nas células expostas a 10 mM de fumarato ao longo do tempo (**Figura 26**). Citrato é necessário para a síntese de ácidos graxos e seu aumento pode favorecer reações anabólicas importantes para a tumorigênese.

Lactato apareceu aumentado somente na exposição a 5 mM de fumarato por 72 h e diminuído na exposição a 10 mM de fumarato por 96 h (**Figura 27**). A não alteração dos níveis de lactato está de acordo com a não alteração da taxa de consumo de glicose nas células expostas a fumarato (**Figura 14**). A entrada do fumarato exógeno no ciclo de Krebs deve diminuir a necessidade de utilização de glicose para obtenção de energia. Assim, as células na presença de fumarato ao longo de 7 dias não apresentaram o efeito Warburg.

O oncometabólito 2-L-hidroxiglutarato foi detectado em níveis aumentados nas células expostas a fumarato por 48 e 96 h (**Figura 28**). Sabe-se que mutações na enzima isocitrato desidrogenase produzem 2-D-hidroxiglutarato que inibe a diferenciação celular. Já a limitação de oxigênio leva ao acúmulo de 2-L-hidroxiglutarato, que pode facilitar a adaptação fisiológica à hipóxia em células do câncer ou normais (INTLEKOFER et al., 2017).

Diminuição dos níveis de NAD^+ e $NADP^+$ foi observada em alguns períodos de exposição a fumarato (**Figuras 29 e 30**).

O conteúdo de NAD^+ tem sido inversamente correlacionado com o fenótipo maligno (POLJSAK, 2016). Dados de diferentes estudos experimentais mostram que estratégias para aumentar os níveis de NAD^+, tais como super expressão de nicotinamida mononucleotídeo adenililtransferase (NMNAT) ou suplementação com nicotinamida (NAM), nicotinamida ribosídeo (NR) ou ácido nicotínico (NA), inibem o crescimento tumoral ou metástase (RAJMAN; CHWALEK; SINCLAIR, 2018; GALBRAITH et al., 2019). A diminuição dos níveis de NAD^+ nas células expostas a fumarato pode levar a alterações de diversos processos celulares fundamentais regulados por enzimas (poli-ADP-ribose-polimerases, ADP-ribose transferases, sirtuínas, ADP-ribose cíclico sintetases) que utilizam NAD^+ como co-substrato (BELENKY; BOGAN; BRENNER, 2007) e favorecer, em conjunto com as demais alterações aqui apresentadas, a transformação celular.

Adenosina foi detectada em níveis aumentados nas células expostas a fumarato em diferentes períodos (**Figura 31**). Adenosina faz parte das estruturas de AMP, ADP, ATP, ácido ribonucleico (RNA), coenzimas como NAD e FAD, mensageiros secundários como cAMP, e é um metabólito de vias bioquímicas como a via de transmetilação (BOISON, 2013). Condições de estresse levam ao aumento dos níveis de adenosina por meio da quebra dos nucleotídeos de adenina. Adenosina, por sua vez, exerce *feedback* negativo sobre a demanda metabólica das células, resultando em restabelecimento da homeostase energética. O aumento dos níveis de adenosina pode ocorrer por desfosforilação de AMP via 5'-nucleotidase ou por quebra de *S*-adenosil-homocisteína (SAH) via SAH-hidrolase na via de transmetilação (DNA metiltransferases, por exemplo, transferem o grupo metila de *S*-adenosilmetionina para citosina no DNA, liberando SAH que é quebrada para adenosina e homocisteína via SAH-hidrolase). As principais vias de remoção da adenosina são a sua desaminação para inosina via adenosina deaminase (alto K_m) ou a sua fosforilação para AMP via adenosina quinase (ADK, baixo K_m). Foi verificado que pequenas alterações na atividade de ADK resultam em grandes alterações dos níveis de adenosina. ADK atua como sensor do estado energético e equilíbrio bioenergético da célula e como um gatilho determinando níveis de adenosina para ajustar a demanda metabólica à energia disponível. A suplementação de células com adenosina tem efeito citotóxico. Células de câncer de mama humano (MCF-7) expostas a adenosina sofreram apoptose por via intracelular, independente da ativação de receptores de adenosina. Foi sugerido que o efeito citotóxico seja dependente da fosforilação da adenosina para AMP (via ADK) seguida da ativação da via

apoptótica intrínseca/mitocondrial. Citotoxicidade da adenosina também foi verificada em células de câncer gástrico humano, com ativação da via apoptótica intrínseca pela ativação de proteína quinase ativada por AMP (AMPK) (BOISON, 2013). No caso das células BEAS-2B expostas a fumarato, o aumento dos níveis de adenosina não levou à citotoxicidade. Como a citotoxicidade da adenosina está relacionada à ativação de AMPK, que depende do aumento dos níveis de AMP, a explicação pode estar no fato de o aumento dos níveis de adenosina nas células expostas a fumarato não ser acompanhado pelo aumento dos níveis de AMP (**Figura 32**). Ao contrário, as células expostas a fumarato apresentaram diminuição dos níveis de AMP em diferentes períodos.

É interessante notar que o aumento dos níveis de adenosina desloca a reação da SAH-hidrolase para a síntese de SAH, que é um potente inibidor de metiltransferases, incluindo DNA metiltransferases (BOISON, 2013). Nas análises dos níveis totais de 5-mC e 5-hmC no DNA das células, verificamos que a diminuição dos níveis de 5-hmC não foi acompanhada de aumento dos níveis de 5-mC (**Figura 11**). É possível que além da inibição das enzimas TET por fumarato, tenhamos indiretamente a inibição de DNA metiltransferases pelas alterações metabólicas induzidas na presença de fumarato.

As alterações metabólicas na presença de fumarato descritas acima contribuíram para a manutenção do balanço energético das células, ou mesmo para um saldo positivo de energia. É possível observar nas **Figuras 35 e 36** que em alguns períodos as razões ATP/AMP e ATP/ADP se encontram aumentadas em relação ao controle. Essa modulação pode estar relacionada à entrada de fumarato no ciclo de Krebs, que pode favorecer maior atividade da cadeia respiratória mitocondrial e fosforilação oxidativa.

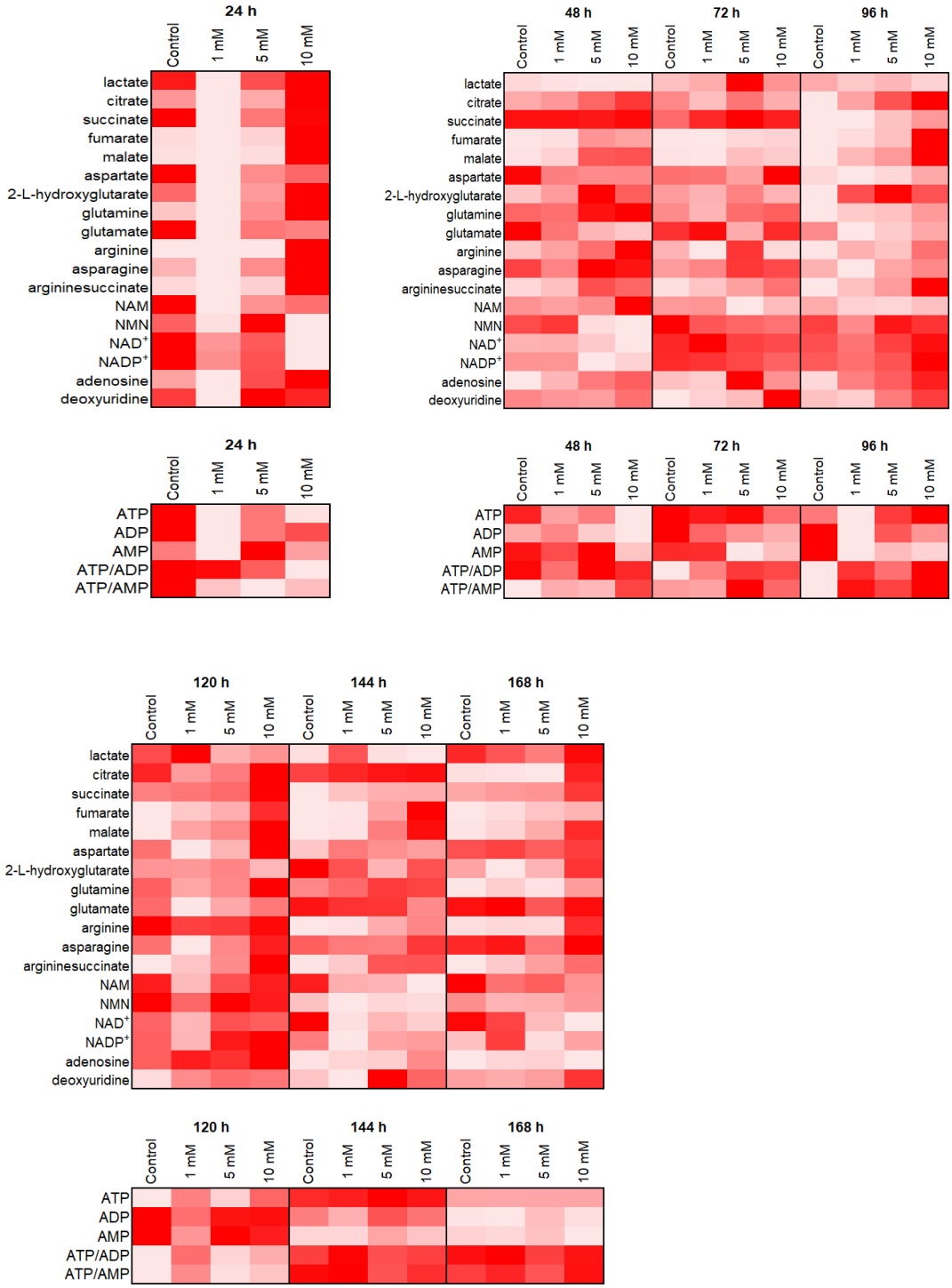

Figura 15 – Visão geral dos níveis das moléculas quantificadas nas células BEAS-2B expostas por 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a 1, 5 e 10 mM de fumarato e grupo controle. São apresentadas as médias ao longo do tempo. Os maiores níveis em cada linha são apresentados na cor vermelha intensa. É possível visualizar alterações ao longo do tempo para os períodos 48 – 96 h e 120 – 168 h.

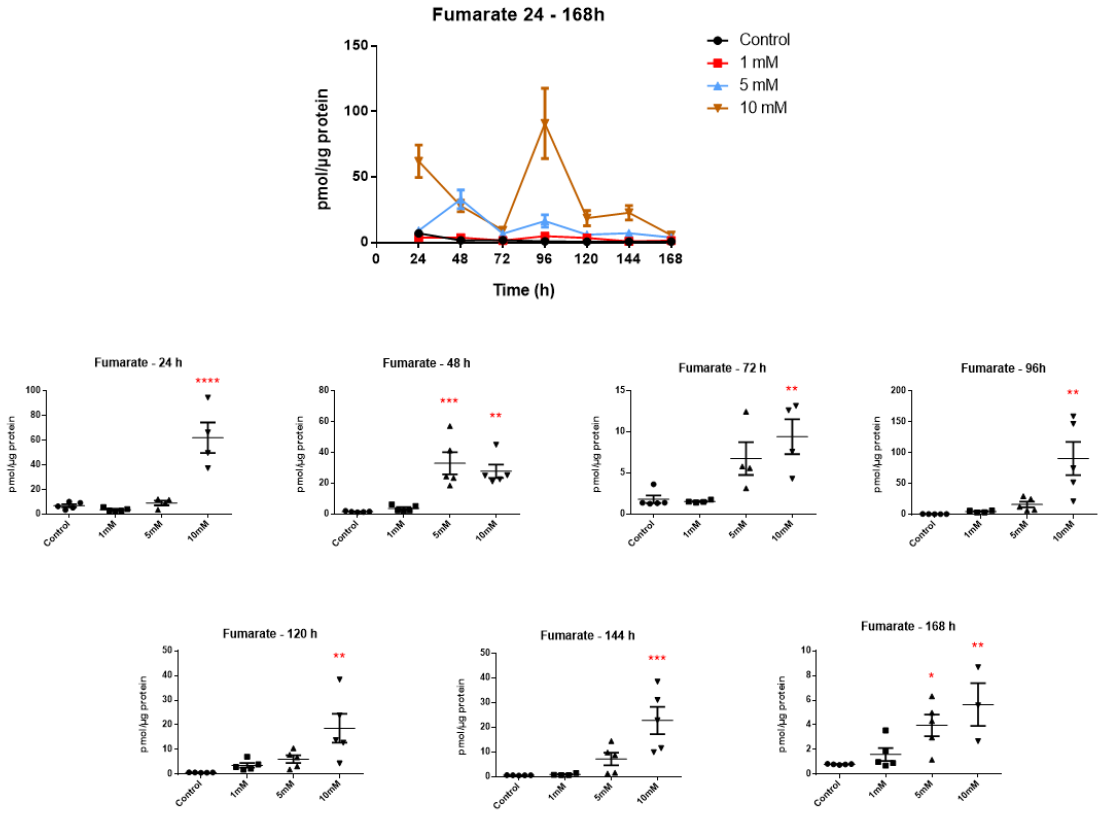

Figura 16 – Níveis de fumarato em células BEAS-2B expostas por 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a 1, 5 e 10 mM de fumarato e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período para visualização das alterações significativas. Média ± erro padrão, *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001 em relação ao controle.

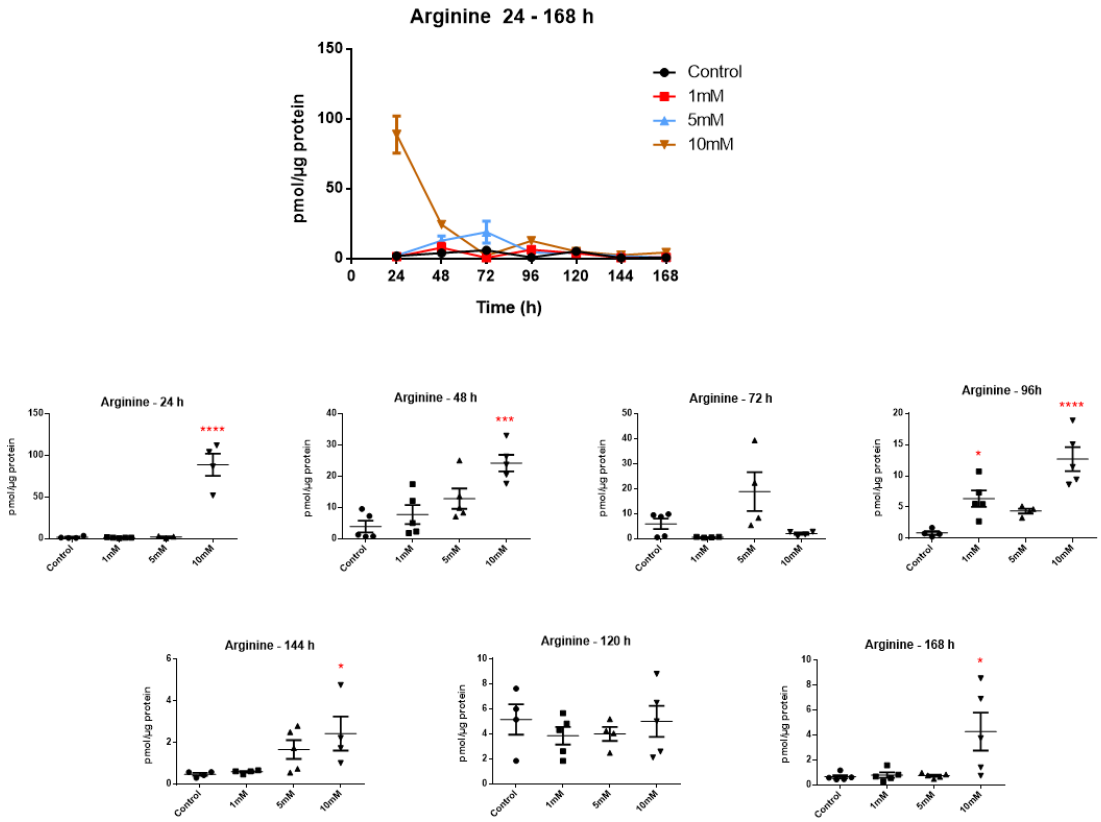

Figura 17 – Níveis de arginina em células BEAS-2B expostas por 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a 1, 5 e 10 mM de fumarato e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período para visualização das alterações significativas. Média ± erro padrão, *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001 em relação ao controle.

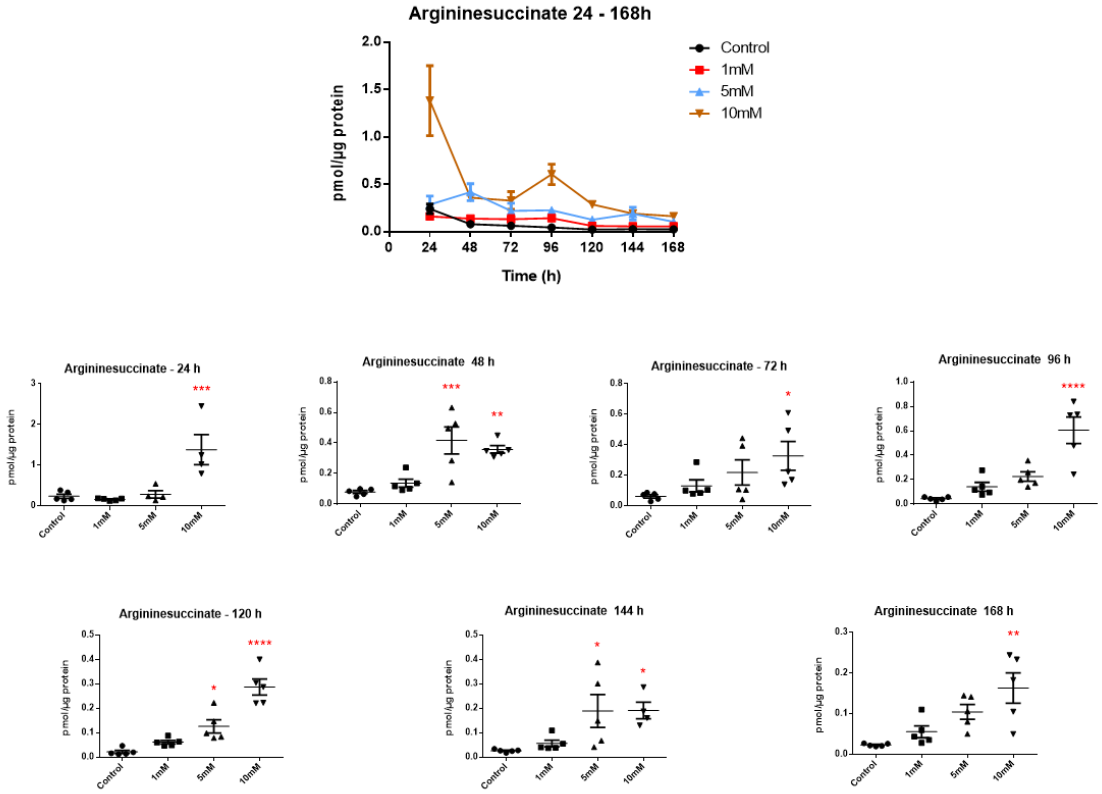

Figura 18 – Níveis de argininosuccinato em células BEAS-2B expostas por 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a 1, 5 e 10 mM de fumarato e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período para visualização das alterações significativas. Média ± erro padrão, *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001 em relação ao controle.

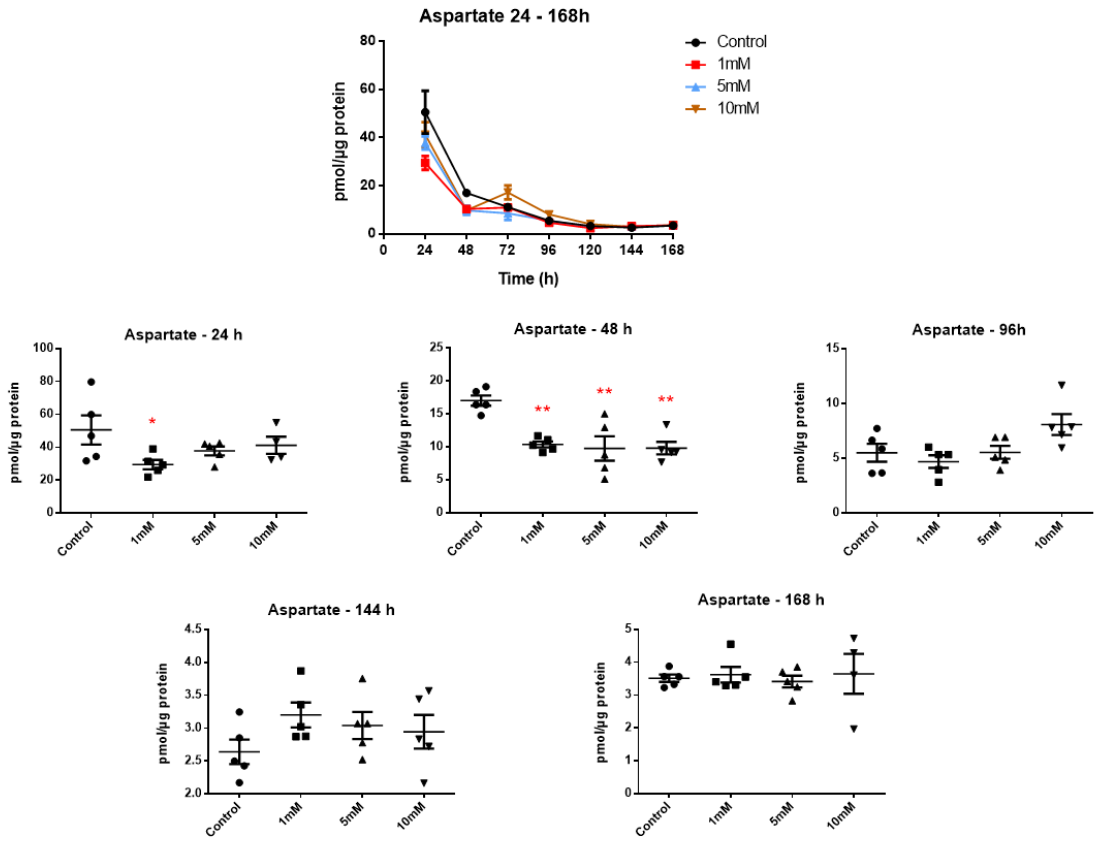

Figura 19 – Níveis de aspartato em células BEAS-2B expostas por 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a 1, 5 e 10 mM de fumarato e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período para visualização das alterações significativas. Média ± erro padrão, *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001 em relação ao controle.

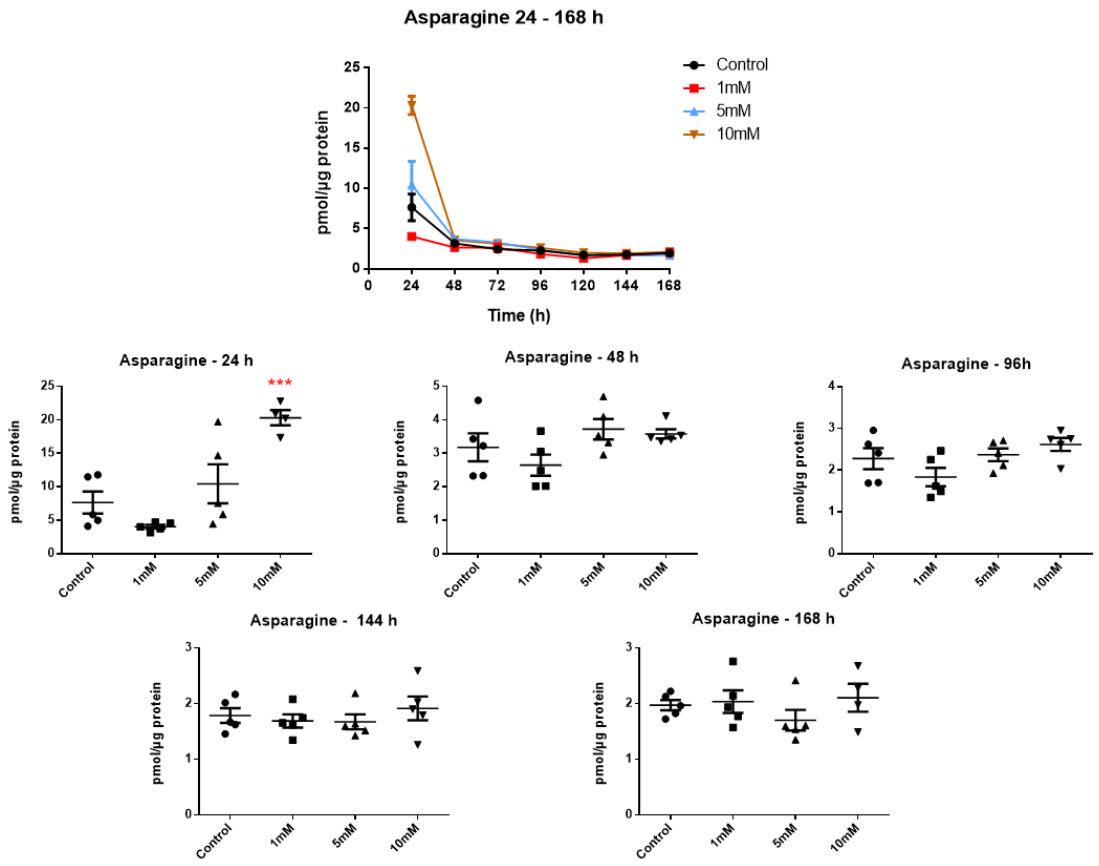

Figura 20 – Níveis de asparagina em células BEAS-2B expostas por 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a 1, 5 e 10 mM de fumarato e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período para visualização das alterações significativas. Média ± erro padrão, *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001 em relação ao controle.

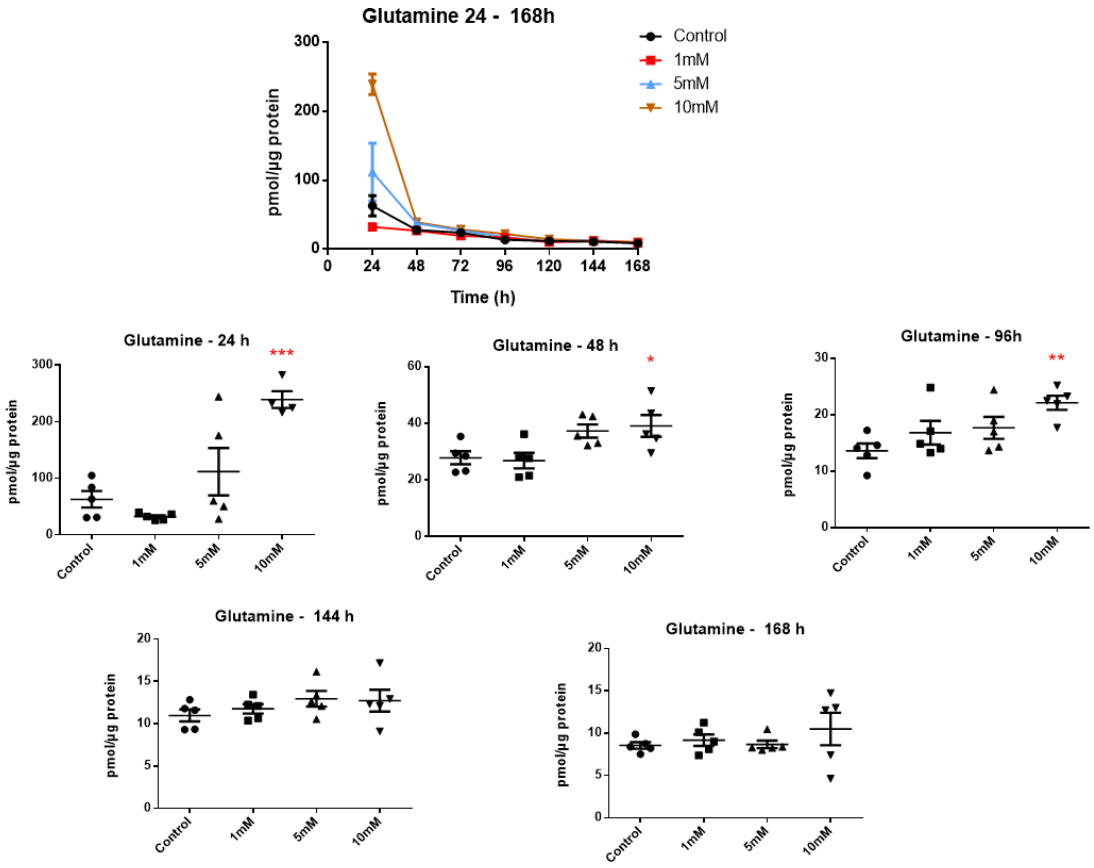

Figura 21 – Níveis de glutamina em células BEAS-2B expostas por 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a 1, 5 e 10 mM de fumarato e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período para visualização das alterações significativas. Média ± erro padrão, *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001 em relação ao controle.

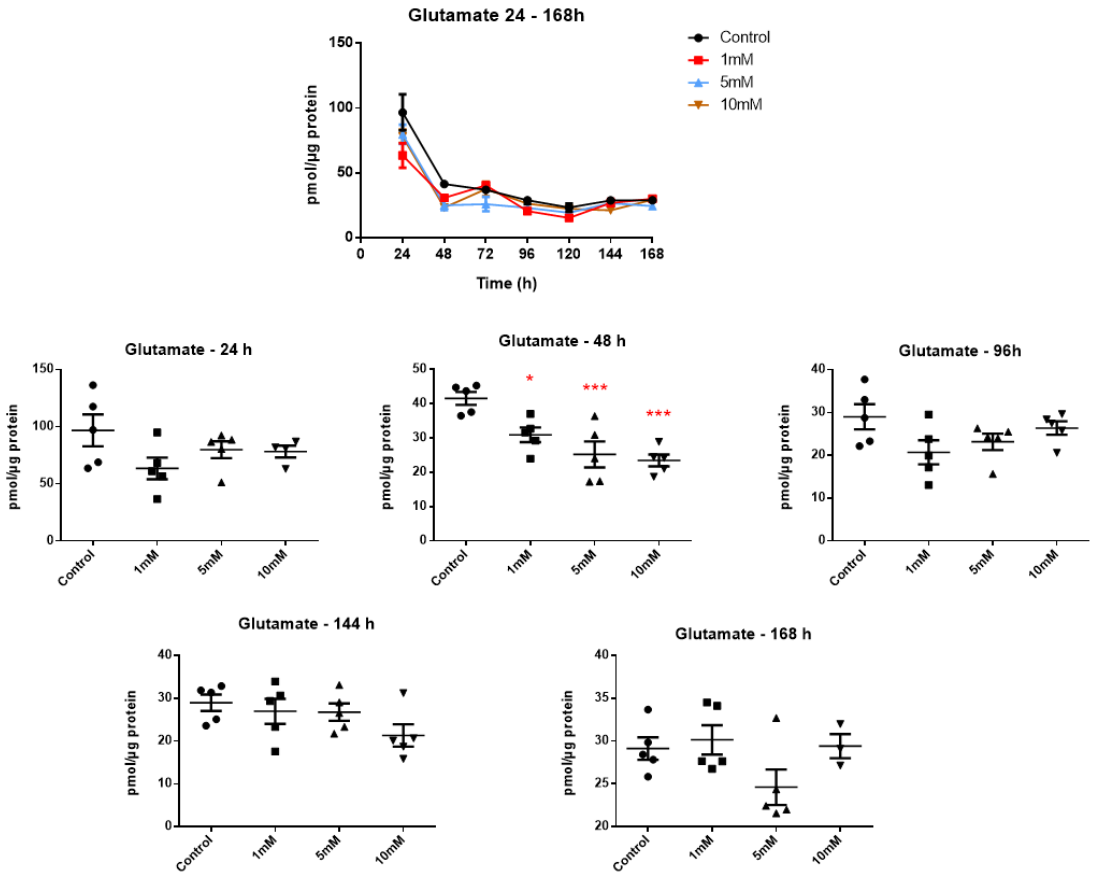

Figura 22 – Níveis de glutamato em células BEAS-2B expostas por 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a 1, 5 e 10 mM de fumarato e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período para visualização das alterações significativas. Média ± erro padrão, *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001 em relação ao controle.

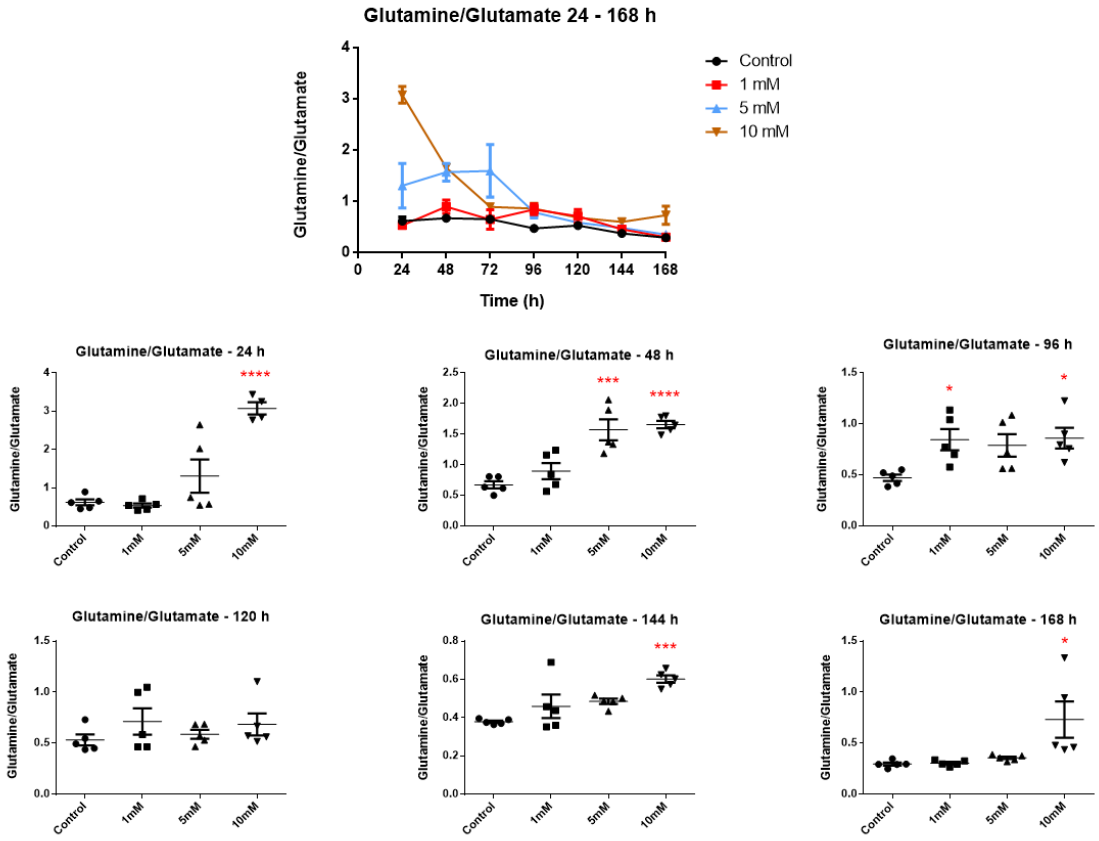

Figura 23 – Razão glutamina/glutamato em células BEAS-2B expostas por 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a 1, 5 e 10 mM de fumarato e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período para visualização das alterações significativas. Média ± erro padrão, *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001 em relação ao controle.

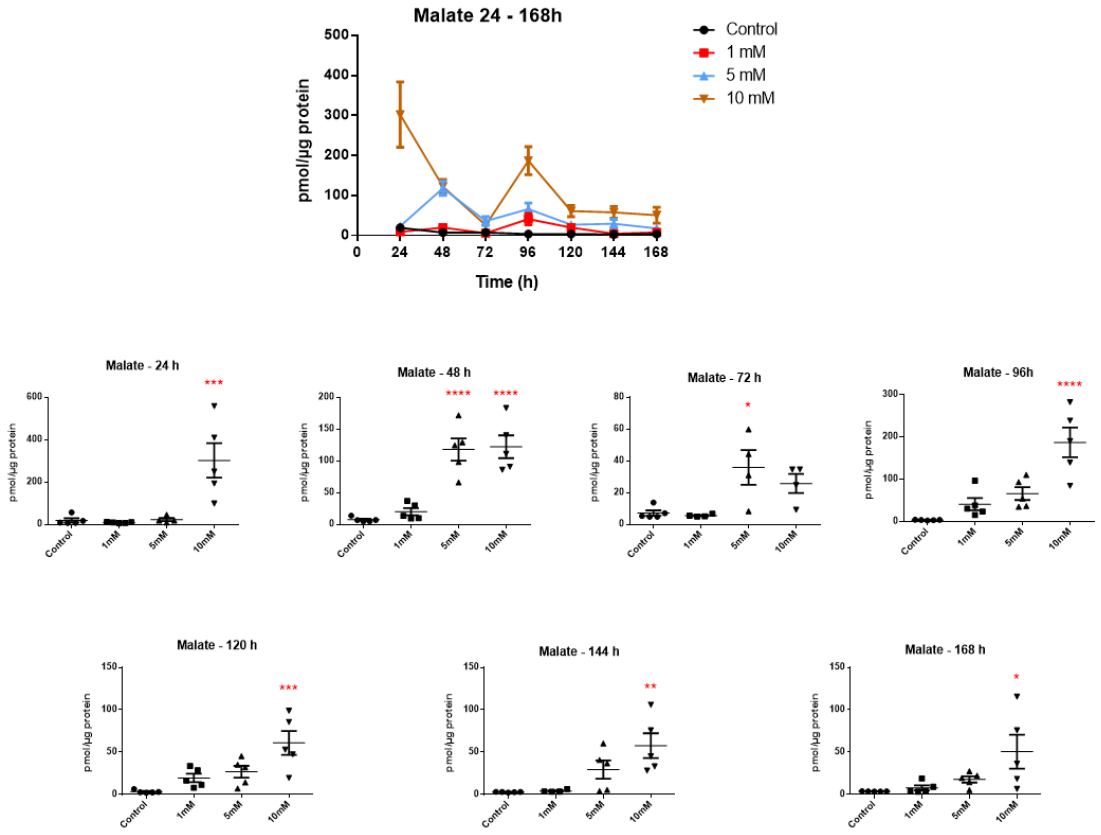

Figura 24 – Níveis de malato em células BEAS-2B expostas por 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a 1, 5 e 10 mM de fumarato e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período para visualização das alterações significativas. Média ± erro padrão, *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001 em relação ao controle.

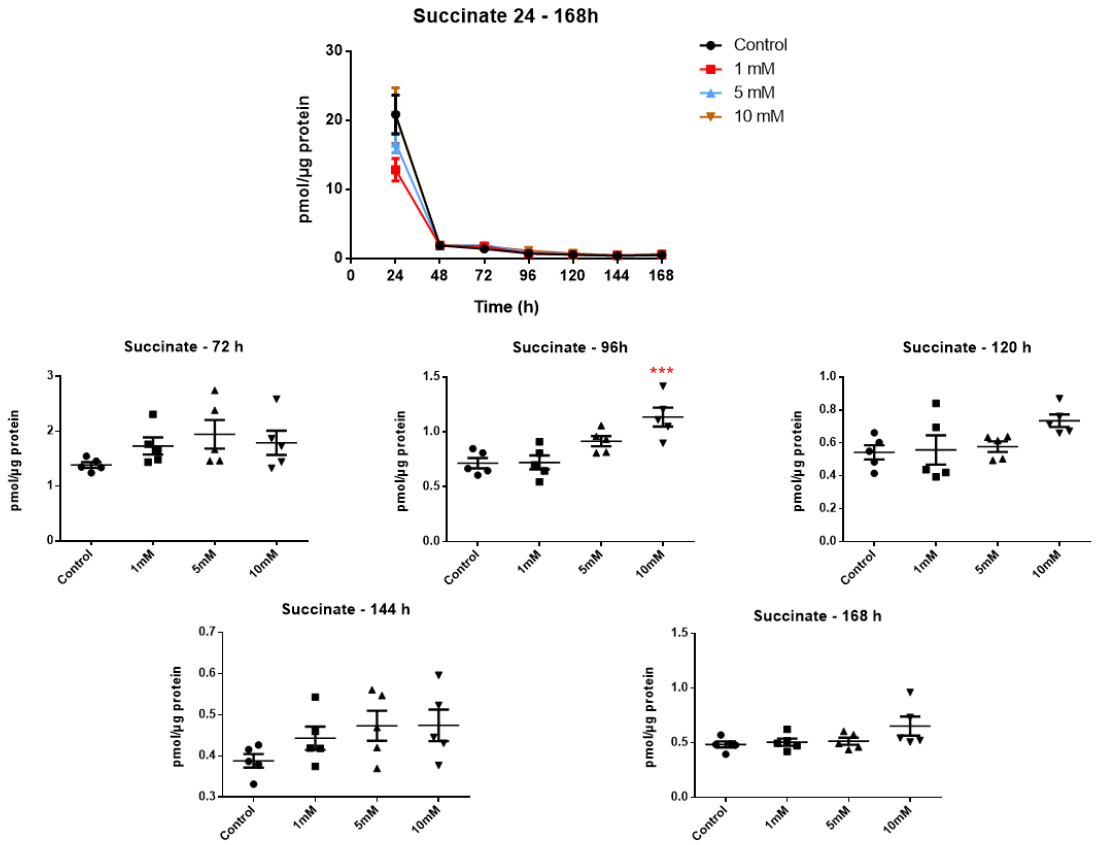

Figura 25 – Níveis de succinato em células BEAS-2B expostas por 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a 1, 5 e 10 mM de fumarato e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período para visualização das alterações significativas. Média ± erro padrão, *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001 em relação ao controle.

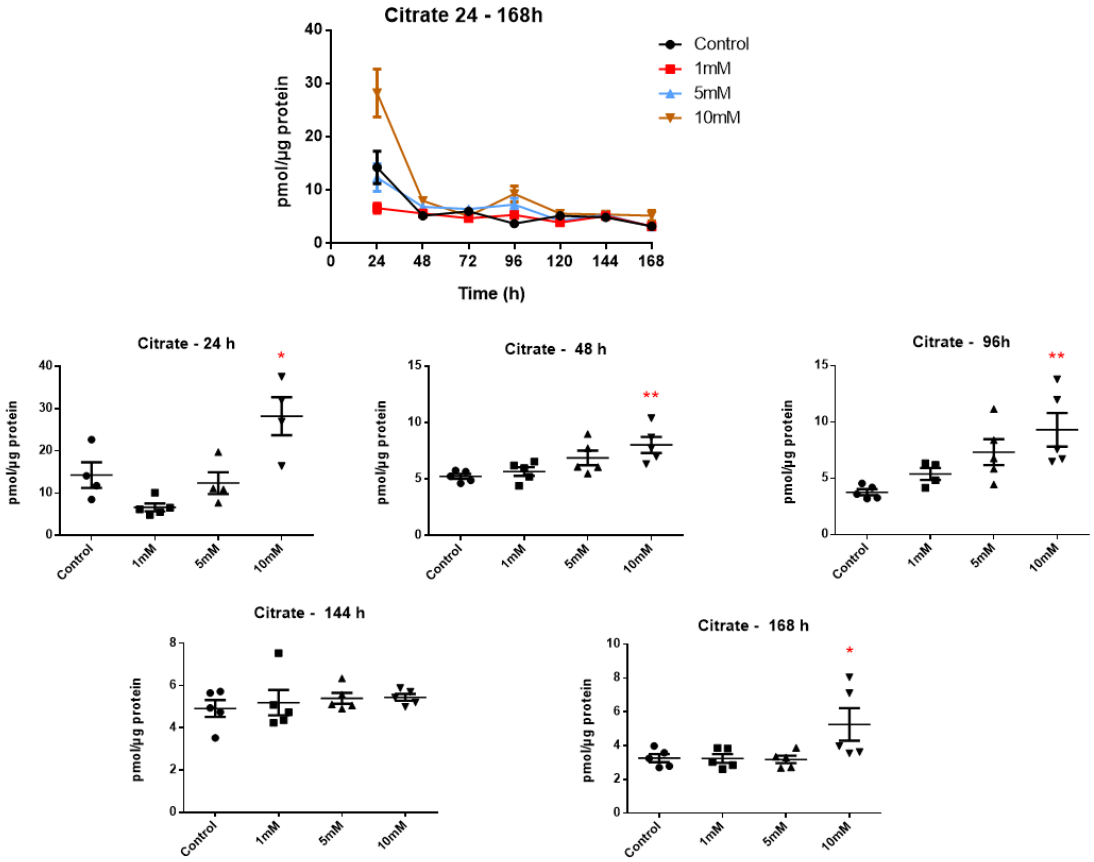

Figura 26 – Níveis de citrato em células BEAS-2B expostas por 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a 1, 5 e 10 mM de fumarato e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período para visualização das alterações significativas. Média ± erro padrão, *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001 em relação ao controle.

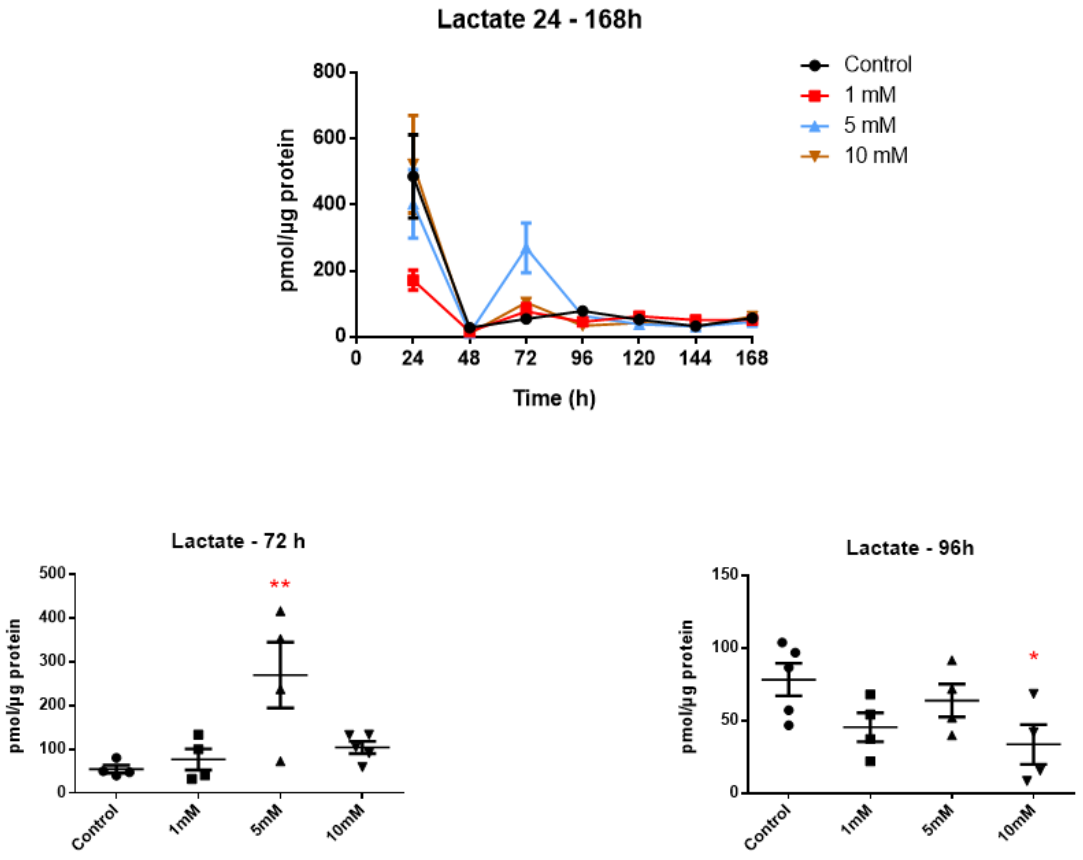

Figura 27 – Níveis de lactato em células BEAS-2B expostas por 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a 1, 5 e 10 mM de fumarato e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período para visualização das alterações significativas. Média ± erro padrão, *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001 em relação ao controle.

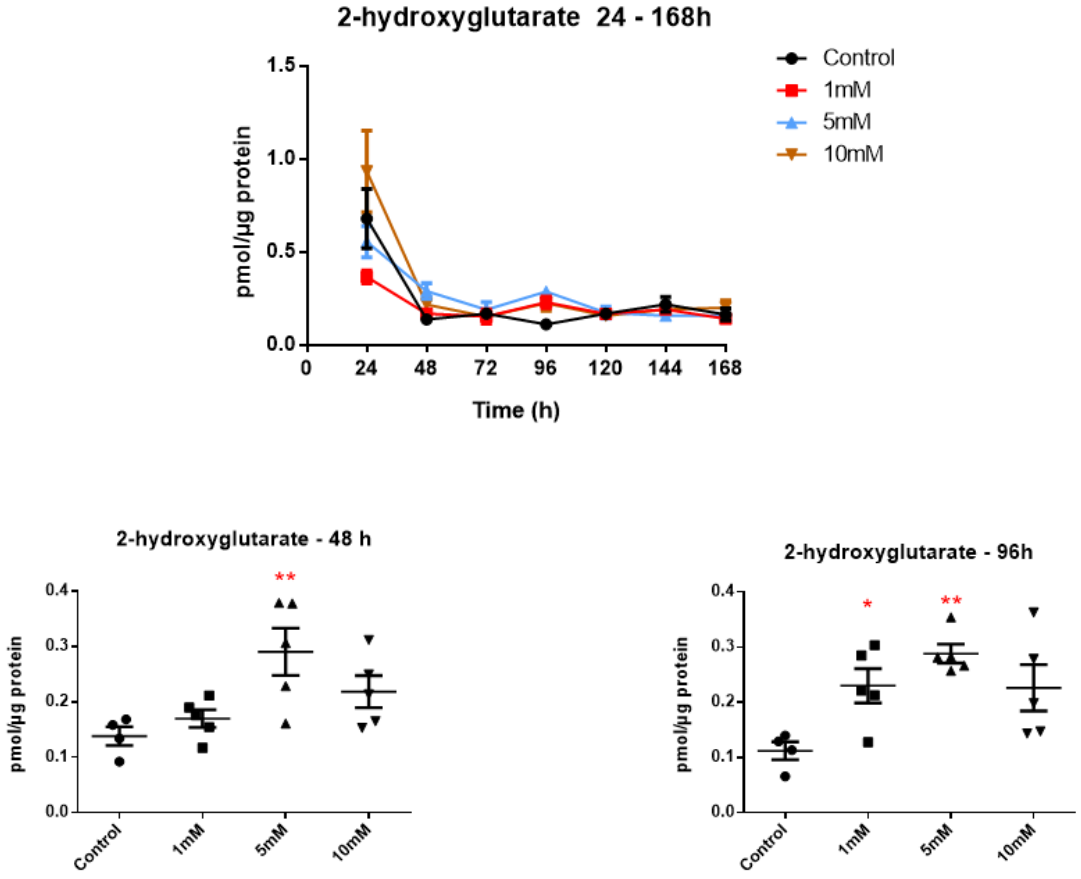

Figura 28 – Níveis de 2-L-hidroxiglutarato em células BEAS-2B expostas por 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a 1, 5 e 10 mM de fumarato e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período para visualização das alterações significativas. Média ± erro padrão, *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001 em relação ao controle.

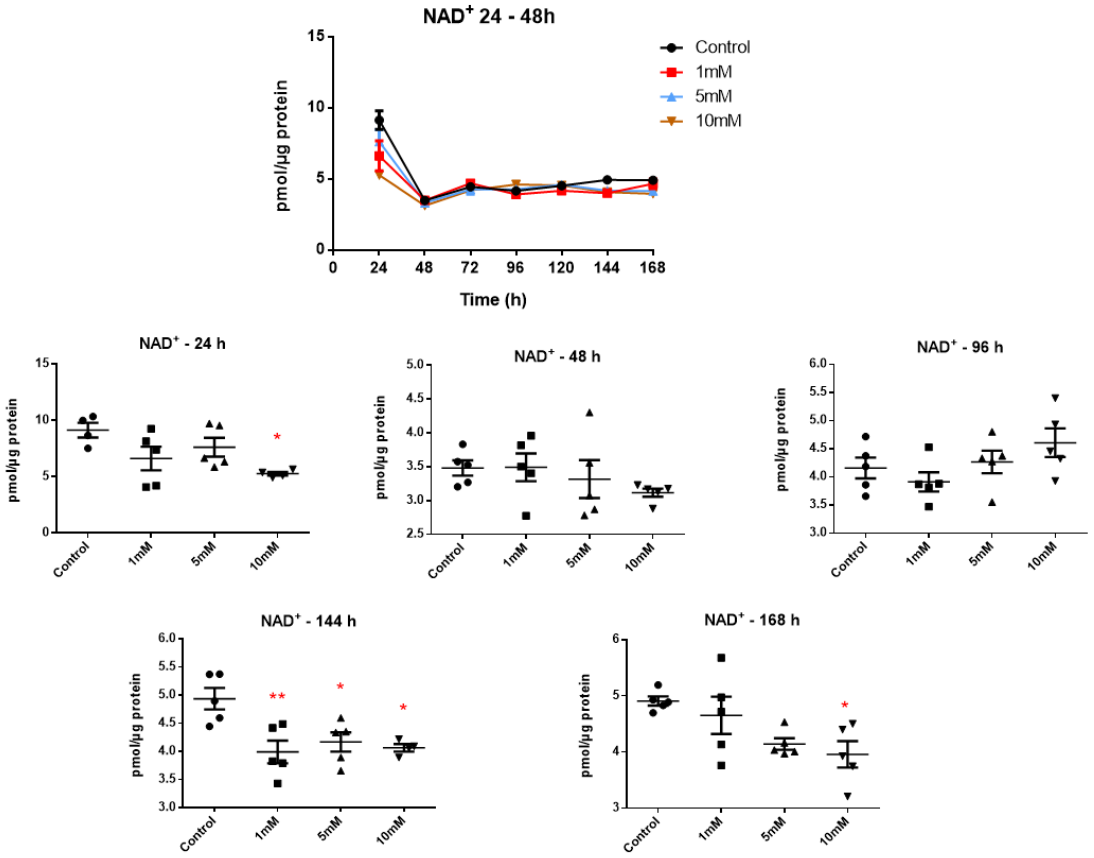

Figura 29 – Níveis de NAD^+ em células BEAS-2B expostas por 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a 1, 5 e 10 mM de fumarato e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período para visualização das alterações significativas. Média ± erro padrão, *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001 em relação ao controle.

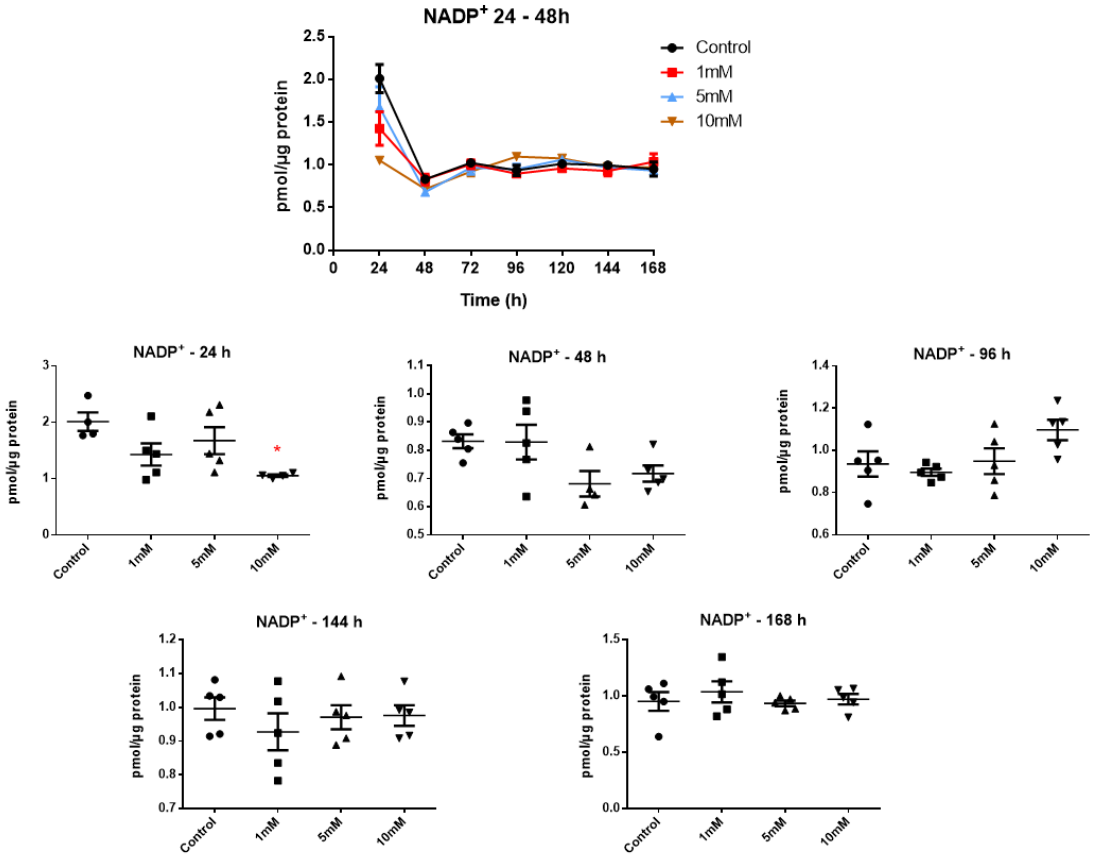

Figura 30 – Níveis de $NADP^+$ em células BEAS-2B expostas por 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a 1, 5 e 10 mM de fumarato e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período para visualização das alterações significativas. Média ± erro padrão, *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001 em relação ao controle.

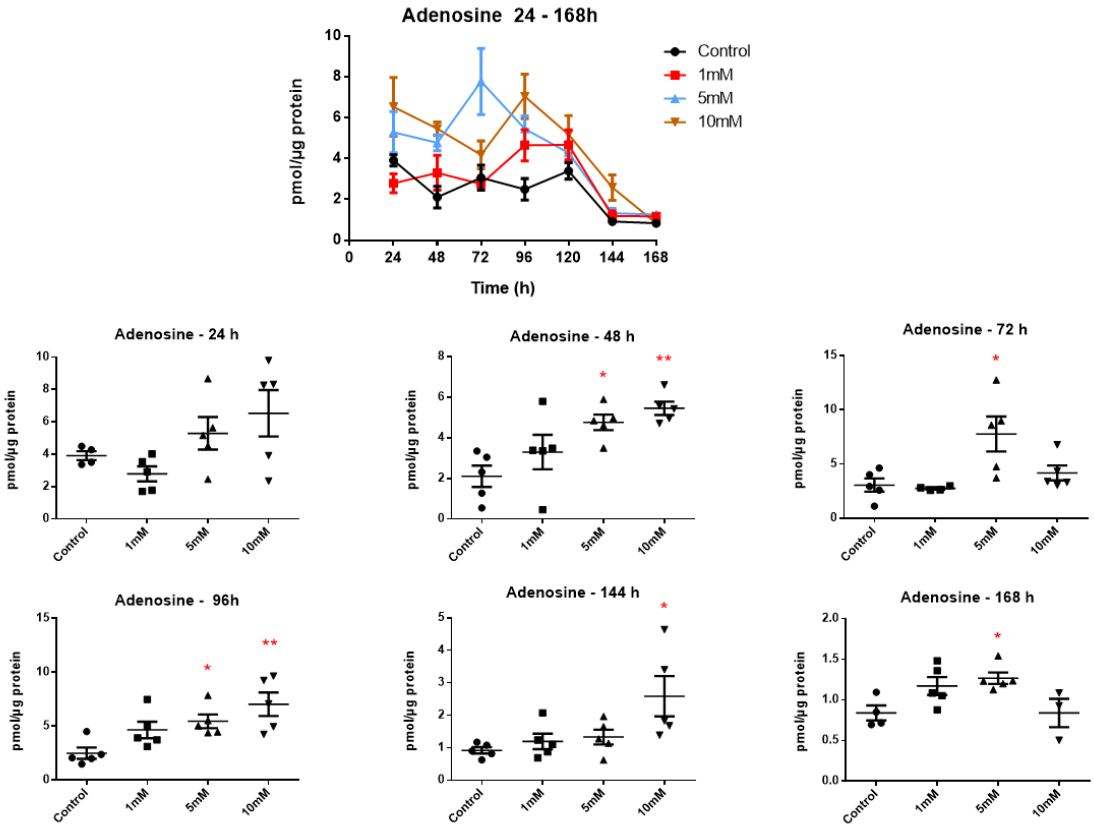

Figura 31 – Níveis de adenosina em células BEAS-2B expostas por 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a 1, 5 e 10 mM de fumarato e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período para visualização das alterações significativas. Média ± erro padrão, *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001 em relação ao controle.

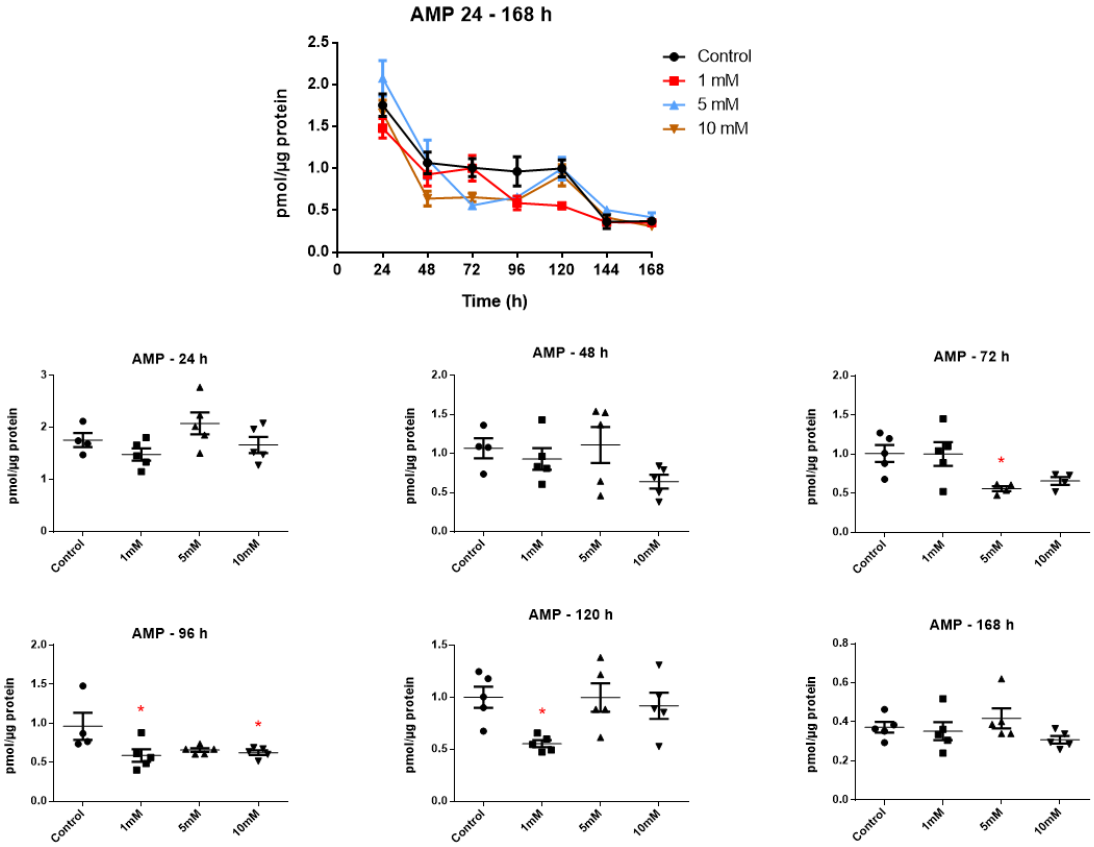

Figura 32 – Níveis de AMP em células BEAS-2B expostas por 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a 1, 5 e 10 mM de fumarato e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período para visualização das alterações significativas. Média ± erro padrão, *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001 em relação ao controle.

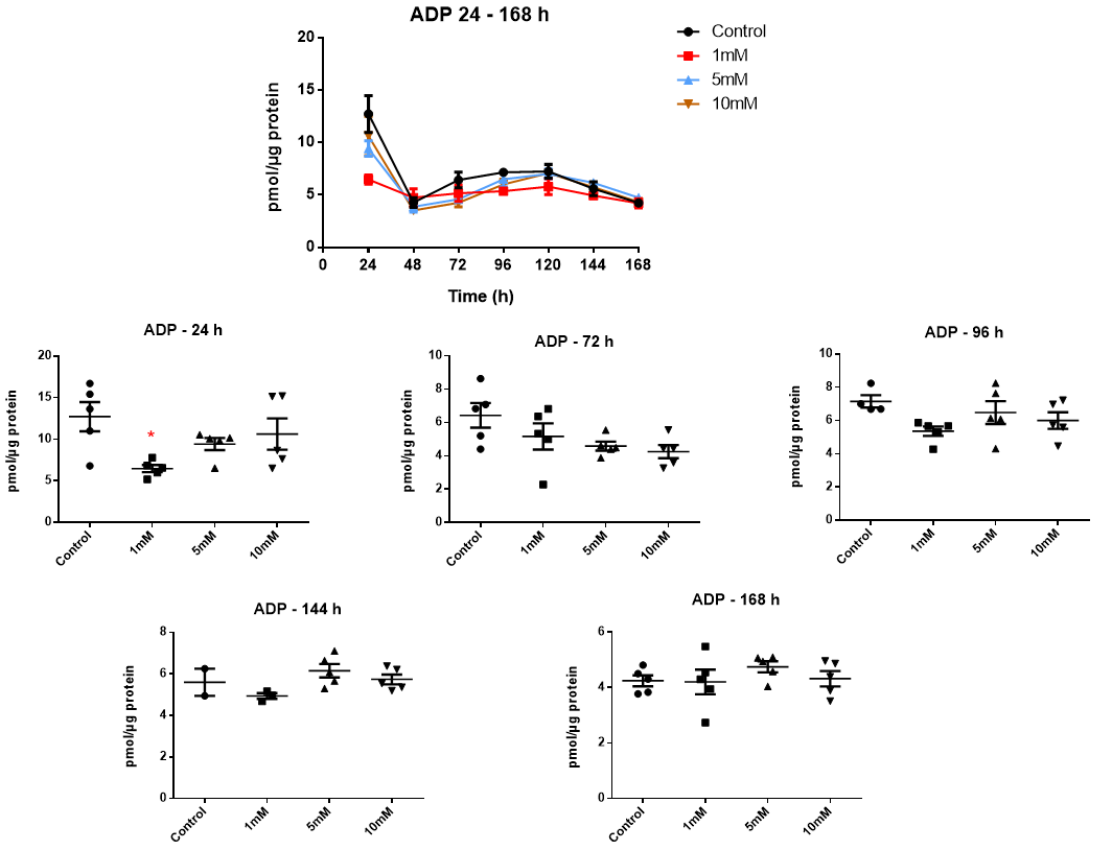

Figura 33 – Níveis de ADP em células BEAS-2B expostas por 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a 1, 5 e 10 mM de fumarato e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período para visualização das alterações significativas. Média ± erro padrão, *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001 em relação ao controle.

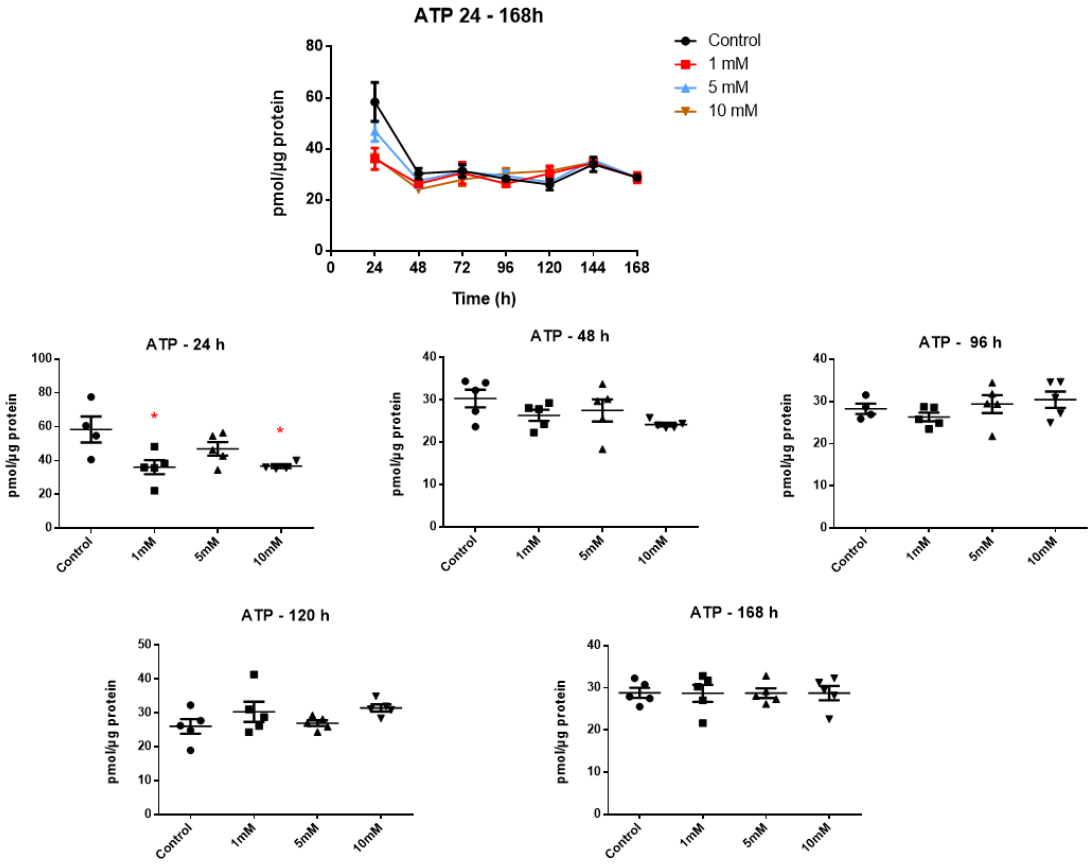

Figura 34 – Níveis de ATP em células BEAS-2B expostas por 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a 1, 5 e 10 mM de fumarato e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período para visualização das alterações significativas. Média ± erro padrão, *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001 em relação ao controle.

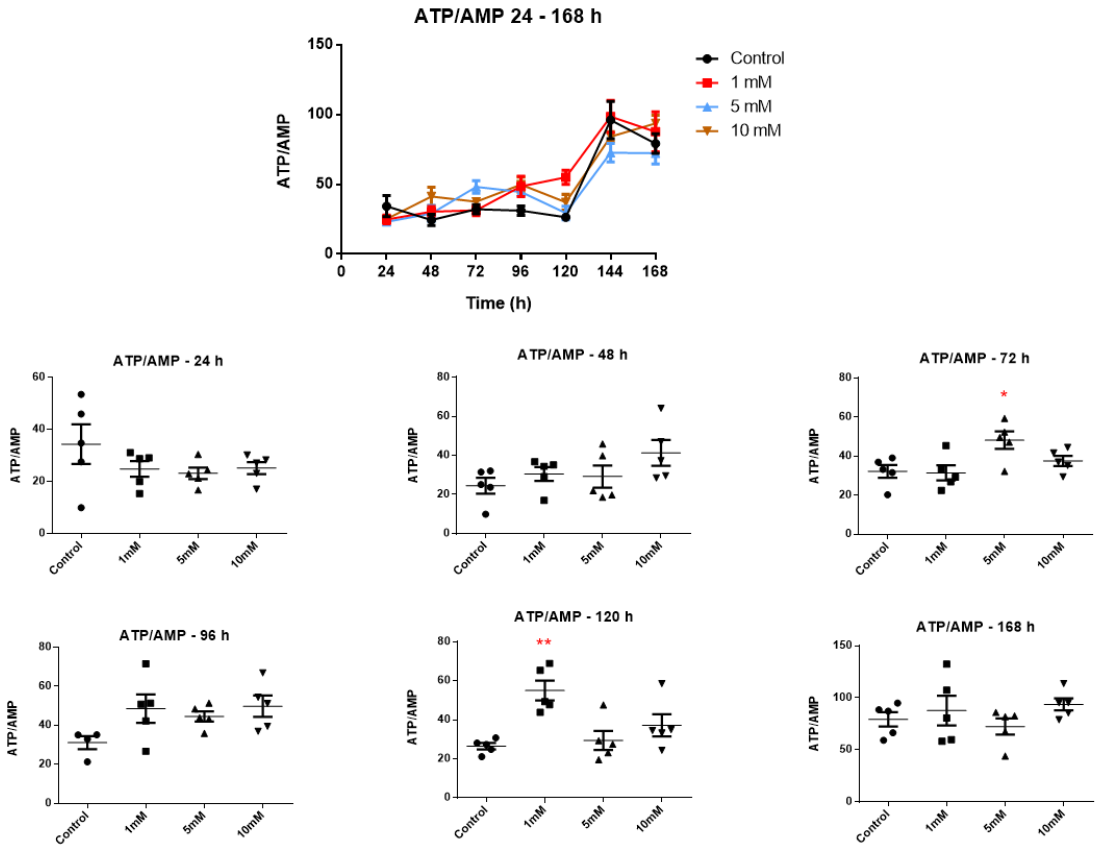

Figura 35 – Razão ATP/AMP em células BEAS-2B expostas por 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a 1, 5 e 10 mM de fumarato e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período para visualização das alterações significativas. Média ± erro padrão, *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001 em relação ao controle.

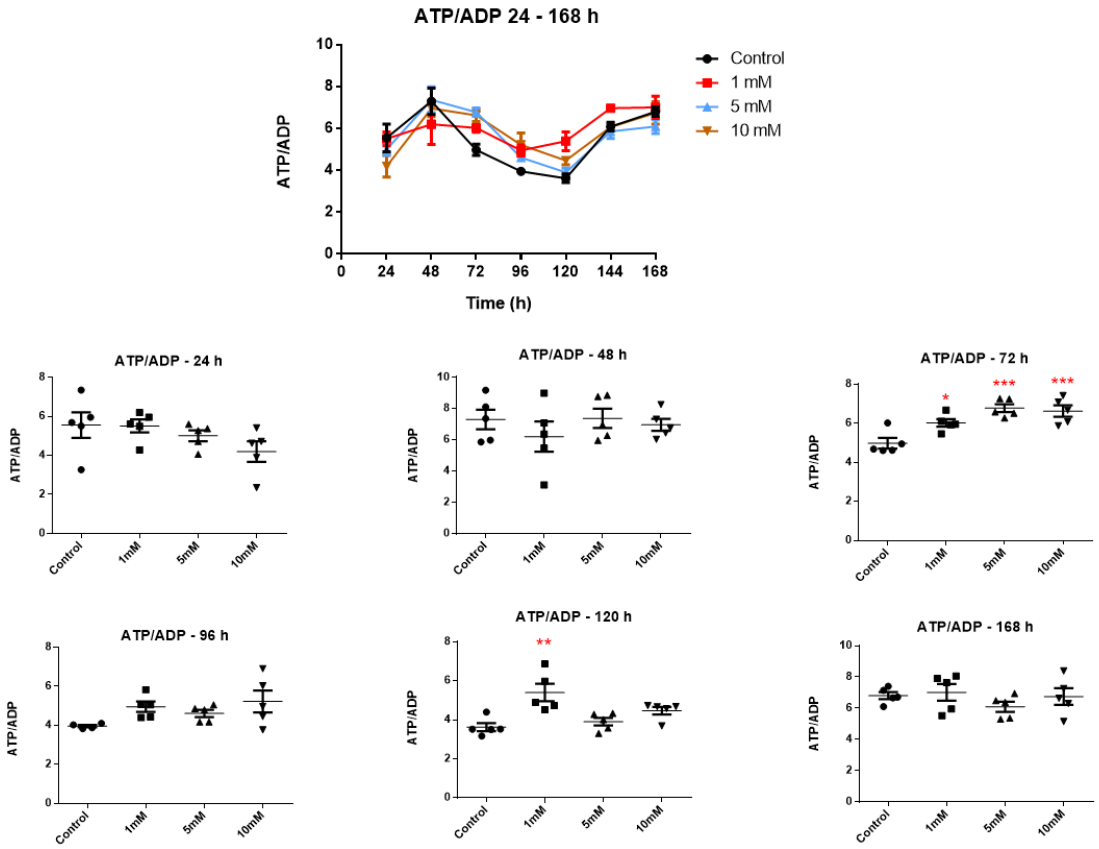

Figura 36 – Razão ATP/ADP em células BEAS-2B expostas por 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a 1, 5 e 10 mM de fumarato e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período para visualização das alterações significativas. Média ± erro padrão, *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001 em relação ao controle.

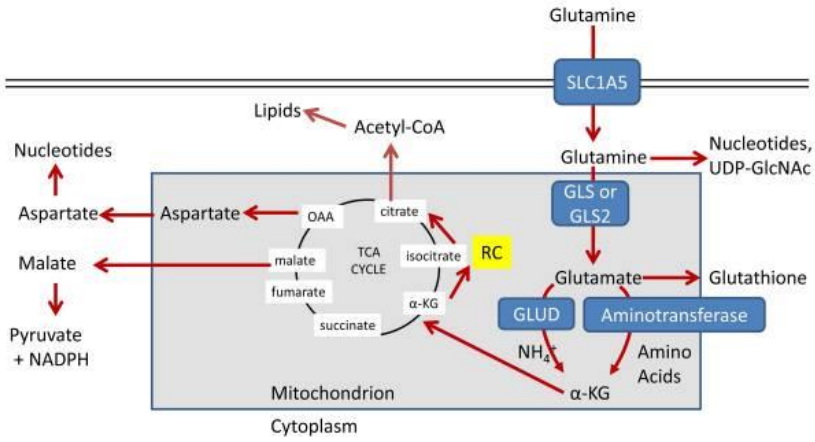

Figura 37 – Destinos metabólicos da glutamina (Figura retirada de Altman *et al.*, 2016) (ALTMAN; STINE; DANG, 2016).

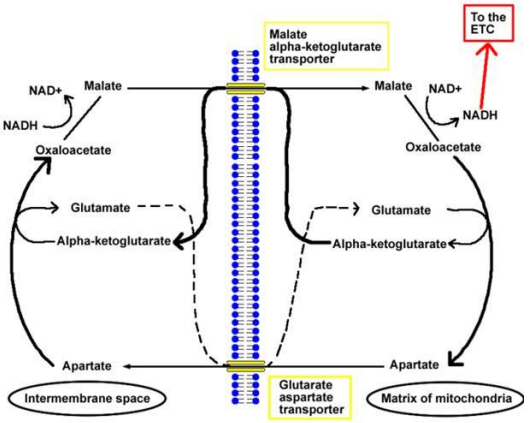

Figura 38 – *Shuttle* malato-aspartato (Figura retirada de French, 2015) (FRENCH, 2015),

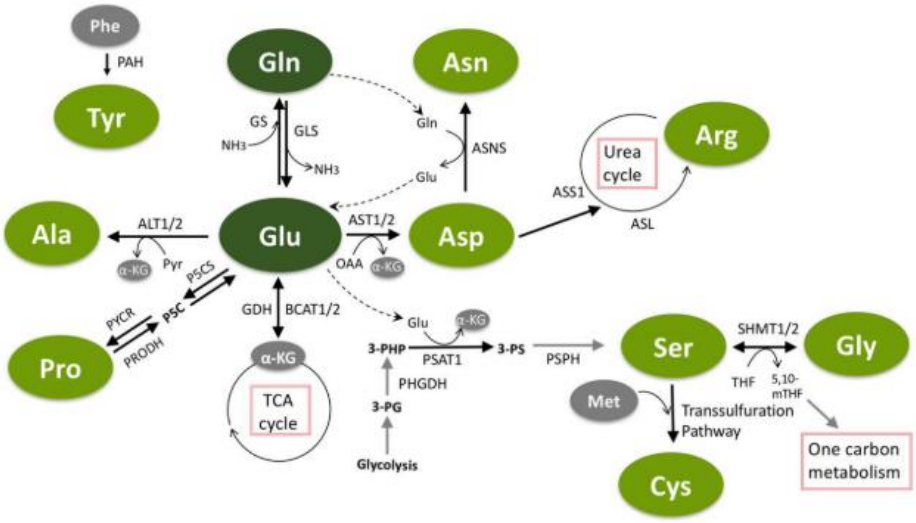

Figura 39 – Via interconectada do metabolismo dos aminoácidos não essenciais. Glutamina e glutamato têm papel central e podem ser usados para a síntese de outros aminoácidos não essenciais. Glutamato pode ser utilizado para gerar alanina, aspartato, serina e prolina. Aspartato gera asparagina e arginina. Abreviações: GLN = Glutamina; GLU = Glutamato; Phe = fenilalanina; Tyr = tirosina; Ala = alanina; Pro = prolina; Asp = aspartato; Asn = asparagina; Arg = arginina; Ser = Serina; Gly = Glicina; Met = metionina; Cys = cisteína; α-KG = α-cetoglutarato; ALT1/2 = alanina aminotransferase 1/2; AST1/2 = aspartato aminotransferase 1/2; ASNS = asparagina sintetase; GDH = glutamato desidrogenase; GLS = glutaminase; GS = glutamina sintetase; OAA = oxaloacetato; ASS1 = argininosuccinato sintetase; ASL = argininosuccinato liase; BCAT1/2 = branched-chain aminotransferase 1/2; PAH = fenilalanina hidroxilase; PHGDH = fosfoglicerato desidrogenase; PSAT1 = fosfoserina aminotransferase; PSPH = fosfoserina fosfatase; P5CS = pirrolina-5-carboxilase redutase; PRODH = prolina desidrogenase; Pyr = piruvato; 3-PG = 3-fosfoglicerato; 3-PHP = 3-fosfohidroxipiruvato; 3-PS = 3-fosfoserina; SHMT1/2 = serina hidroximetiltransferase-1/2; THF = tetrahidrofolato; 5,10-mTHF = 5,10 metilenotetrahidrofolato (CHOI; COLOFF, 2019).

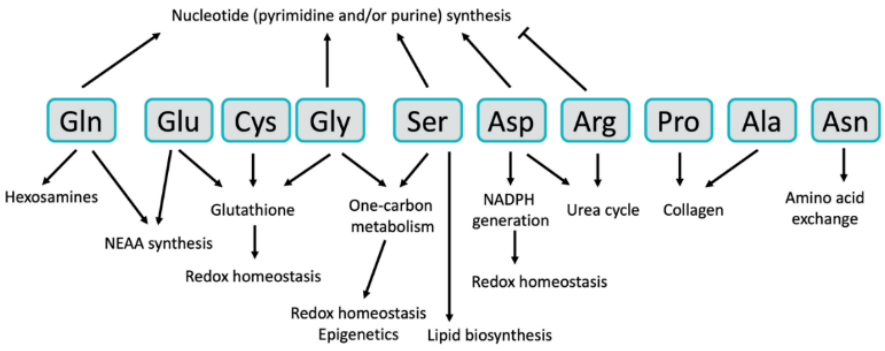

Figura 40 – Aminoácidos e processos celulares dos quais participam (CHOI; COLOFF, 2019).

A fim de confirmar que o fumarato extracelular é absorvido pelas células BEAS-2B e incorporado em vias metabólicas intracelulares, realizamos as exposições das células ao isótopo [$^{13}C_4$]fumarato e monitoramos a geração de isótopos de alguns metabólitos selecionados apresentados na **Tabela 5** de Material e Métodos. Os dados obtidos das análises por HPLC-ESI-MS/MS estão apresentados nas **Figuras 41 a 47**.

Foi possível confirmar que os níveis intracelulares aumentados de fumarato se devem à absorção pelas células do fumarato ([$^{13}C_4$]fumarato) adicionado ao meio de cultura. Os níveis endógenos de fumarato não sofreram alteração em relação ao controle (**Figura 41**).

O [$^{13}C_4$]fumarato absorvido pelas células entrou no ciclo de Krebs e foi convertido a [$^{13}C_4$]malato, também sem induzir alteração dos níveis endógenos de malato (**Figura 42**).

Foi possível observar a geração de [$^{13}C_4$]citrato a partir de 24 h de exposição a [$^{13}C_4$]fumarato, mas em níveis bem menores do que os níveis de citrato endógeno (**Figura 43**). Entretanto, nesse caso, foi detectada diminuição do nível de citrato endógeno em 96 h (diferença significativa em relação ao controle) e 120 h (diferença não significativa em relação ao controle). Essas observações nos indicam que o excesso de [$^{13}C_4$]malato gerado a partir de [$^{13}C_4$]fumarato pode ser desviado para a síntese de [$^{13}C_4$]aspartato no *shuttle* malato-aspartato (**Figura 38**) ou que [$^{13}C_4$]citrato seja rapidamente utilizado para a síntese de ácidos graxos, o que não monitoramos.

Os níveis de [$^{13}C_4$]aspartato aumentaram rapidamente nas células expostas a [$^{13}C_4$]fumarato (**Figura 44**), provavelmente via *shuttle* malato-aspartato, o que está de acordo com a observação acima. Assim como observado para o citrato, os níveis endógenos de aspartato

diminuíram nas células expostas a [$^{13}C_4$]fumarato (**Figura 44**). Como os níveis de [$^{13}C_4$]aspartato são ainda inferiores aos níveis de [$^{12}C_4$]aspartato (endógeno), alguma regulação ocorre no sentido de diminuir a síntese endógena de aspartato diante de uma fonte abundante exógena. Se os níveis de [$^{13}C_4$]aspartato fossem superiores aos níveis endógenos poderíamos dizer que a competição entre [$^{13}C_4$]malato e malato endógeno teria favorecido a geração de [$^{13}C_4$]aspartato em detrimento do aspartato endógeno. Essa modulação pode explicar o fato de não termos detectado aumento dos níveis totais de aspartato quando as células foram expostas ao fumarato não marcado (**Figura 19**).

Observamos a geração de [$^{13}C_4$]succinato nas células expostas a [$^{13}C_4$]fumarato, havendo também aumento dos níveis endógenos de succinato (**Figura 45**). A geração de [$^{13}C_4$]succinato nos indica que [$^{13}C_4$]fumarato foi reduzido pela atividade reversa da succinato desidrogenase (FINDER; HARDIN, 1999; SAKAI et al., 2012), como explicado anteriormente. O isótopo do succinato resultante das reações clássicas a partir da entrada de [$^{13}C_4$]fumarato no ciclo de Krebs seria [$^{13}C_2{}^{12}C_2$]succinato, tendo duas unidades de massa a menos que o [$^{13}C_4$]succinato. Infelizmente, não monitoramos a geração de [$^{13}C_2{}^{12}C_2$]succinato.

A geração de [$^{13}C_4$]argininosuccinato foi também detectada, acompanhada por diminuição dos níveis endógenos de argininosuccinato (**Figura 46**). [$^{13}C_4$]Argininosuccinato pode resultar tanto da reação de [$^{13}C_4$]aspartato com citrulina via argininosuccinato sintetase, como da reação de [$^{13}C_4$]fumarato com arginina via ação reversa da argininosuccinato liase (**Figura 3**, Introdução). Como a reação de fumarato com arginina levaria ao consumo de arginina e, ao contrário, verificamos na **Figura 17** o aumento dos seus níveis, o conjunto dos dados nos indica que a fonte mais provável de [$^{13}C_4$]argininosuccinato seja a atividade da argininosuccinato sintetase.

Adicionalmente detectamos a geração de [$^{13}C_3$]glutamato, como apresentado na **Figura 47**, embora não consigamos explicar a origem.

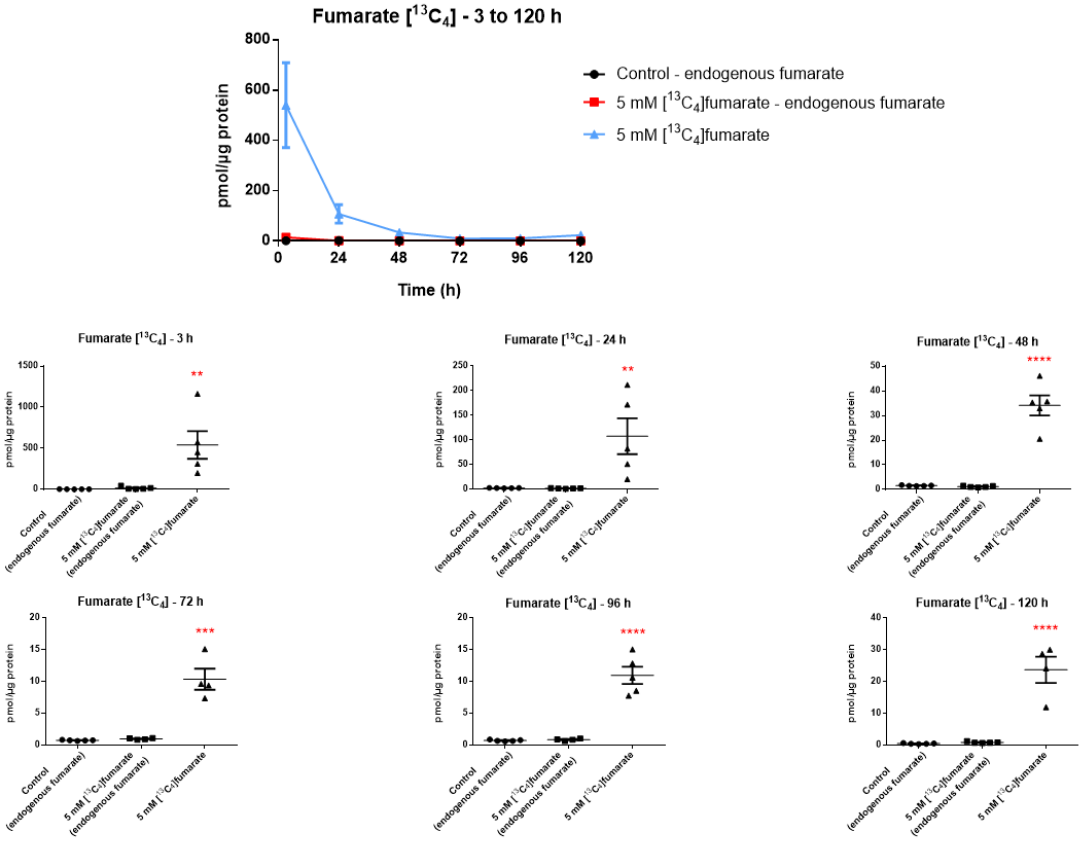

Figura 41 – Níveis de [$^{13}C_4$]fumarato e fumarato endógeno em células BEAS-2B expostas por 3, 24, 48, 72, 96 e 120 h a 5 mM de [$^{13}C_4$]fumarato e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período para visualização das alterações significativas. Média ± erro padrão, *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001 em relação ao controle.

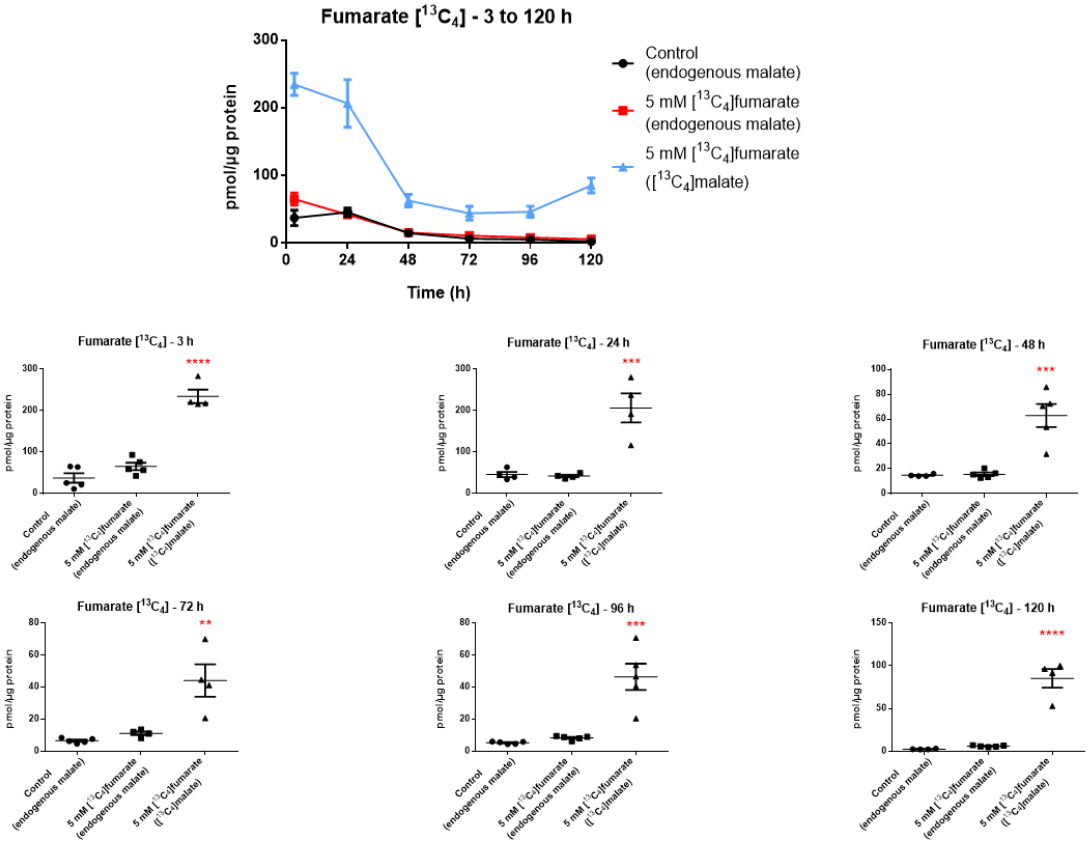

Figura 42 – Níveis de [$^{13}C_4$]malato e malato endógeno em células BEAS-2B expostas por 3, 24, 48, 72, 96 e 120 h a 5 mM de [$^{13}C_4$]fumarato e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período para visualização das alterações significativas. Média ± erro padrão, *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001 em relação ao controle.

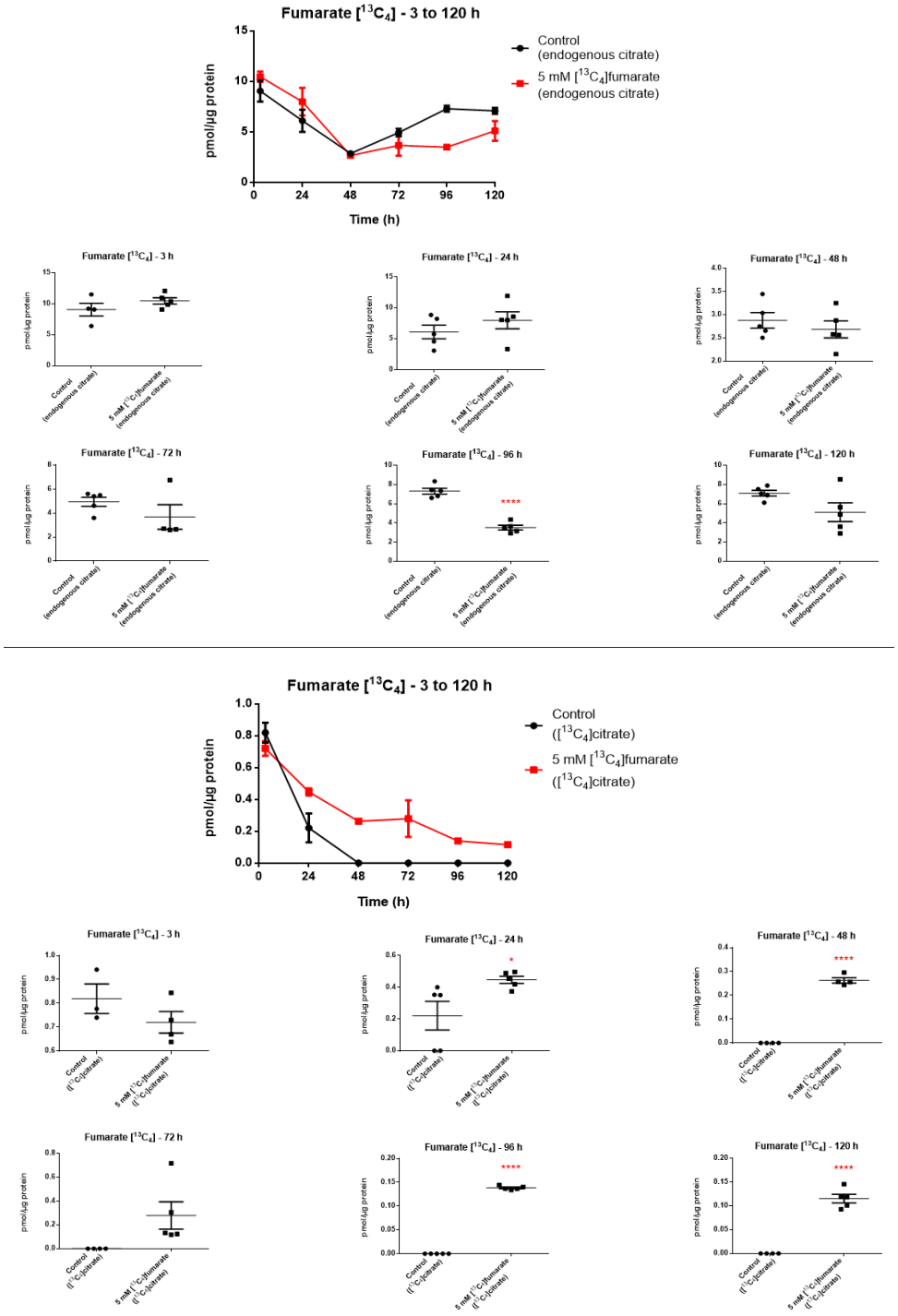

Figura 43 – Níveis de citrato endógeno (painel superior) e [$^{13}C_4$]citrato (painel inferior) em células BEAS-2B expostas por 3, 24, 48, 72, 96 e 120 h a 5 mM de [$^{13}C_4$]fumarato e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período para visualização das alterações significativas. Média ± erro padrão, teste t não pareado, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001 em relação ao controle.

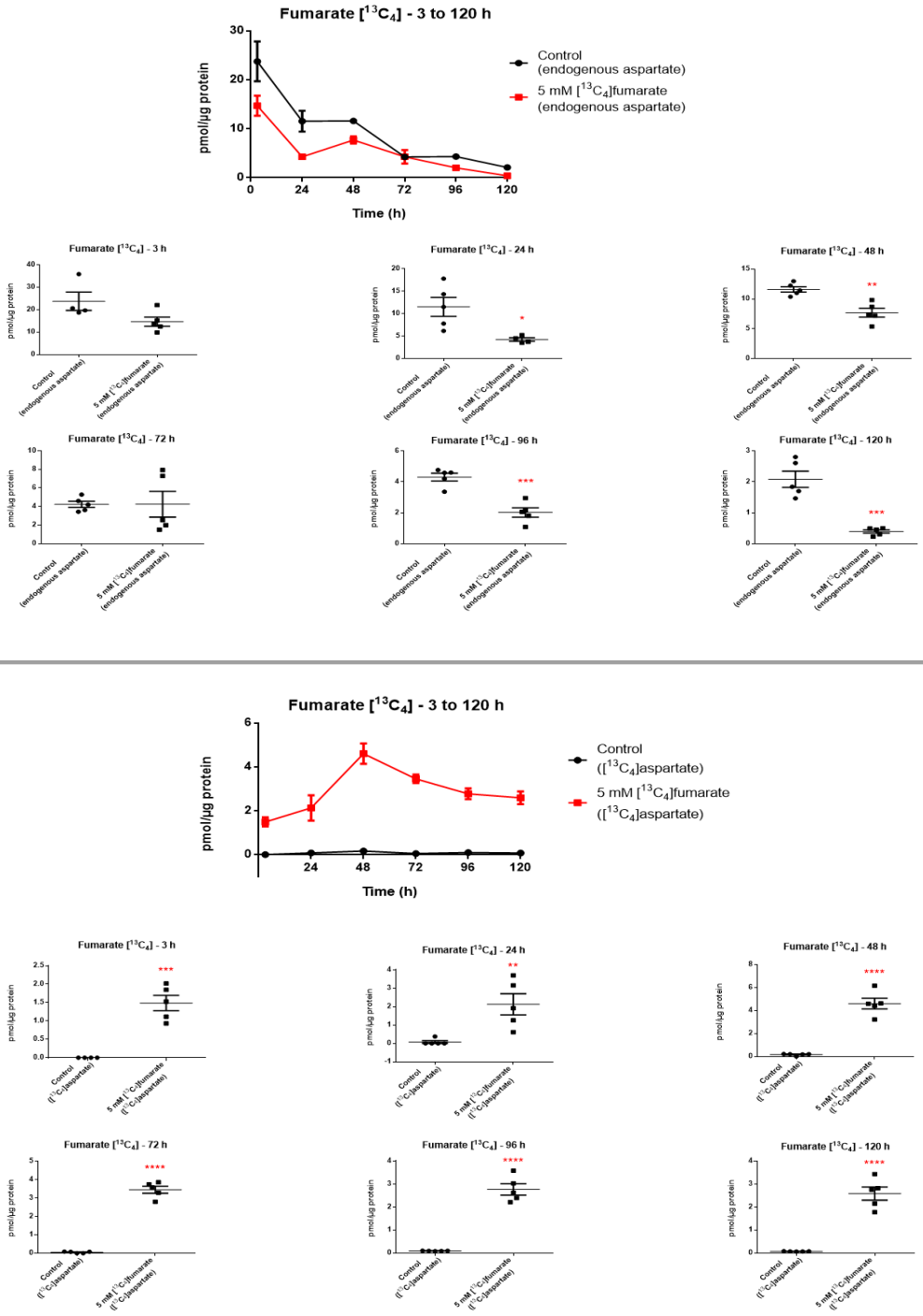

Figura 44 – Níveis de aspartato endógeno (painel superior) e [$^{13}C_4$]aspartato (painel inferior) em células BEAS-2B expostas por 3, 24, 48, 72, 96 e 120 h a 5 mM de [$^{13}C_4$]fumarato e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período para visualização das alterações significativas. Média ± erro padrão, teste t não pareado, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001 em relação ao controle.

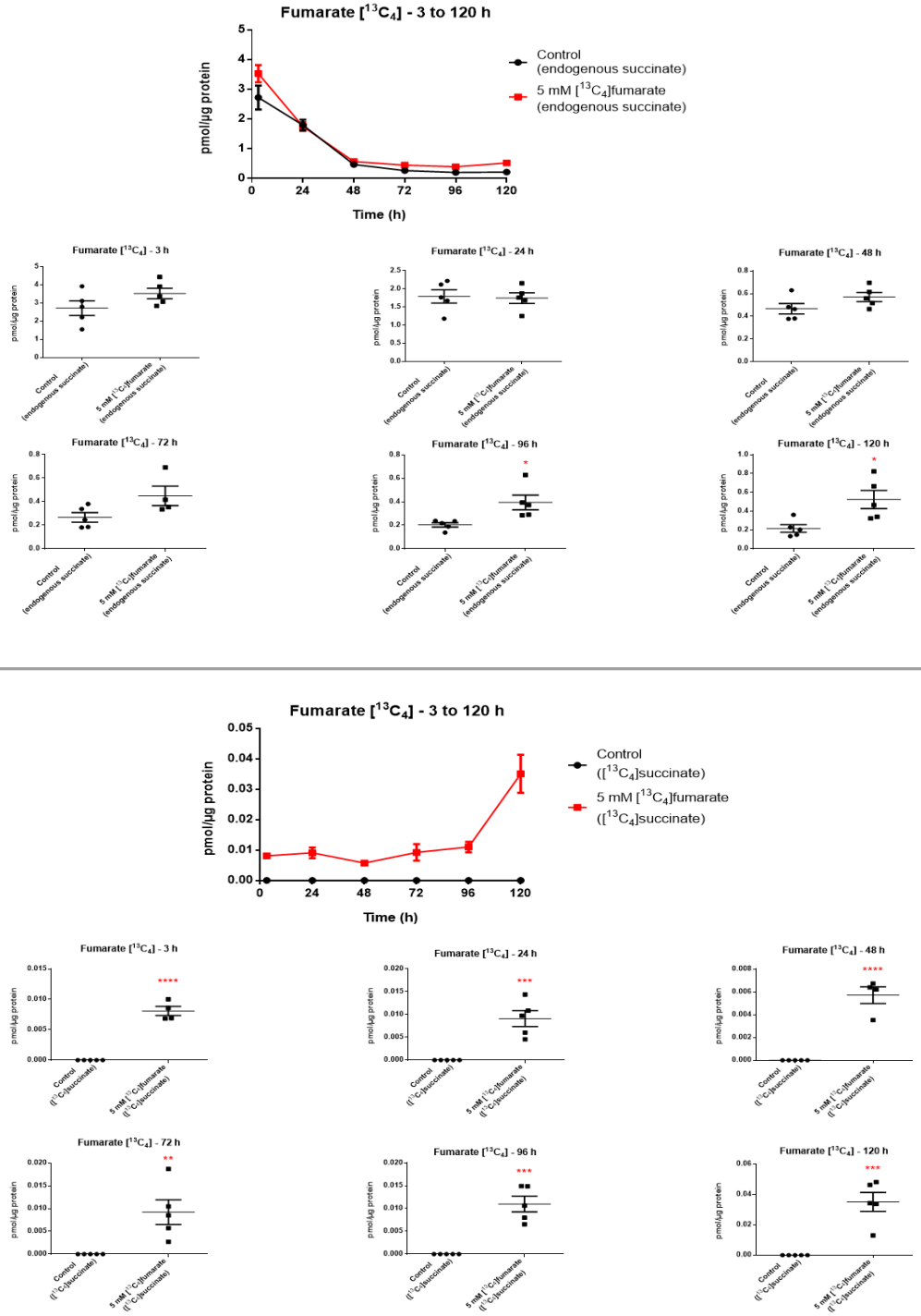

Figura 45 – Níveis de succinato endógeno (painel superior) e [$^{13}C_4$]succinato (painel inferior) em células BEAS-2B expostas por 3, 24, 48, 72, 96 e 120 h a 5 mM de [$^{13}C_4$]fumarato e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período para visualização das alterações significativas. Média ± erro padrão, teste t não pareado, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001 em relação ao controle.

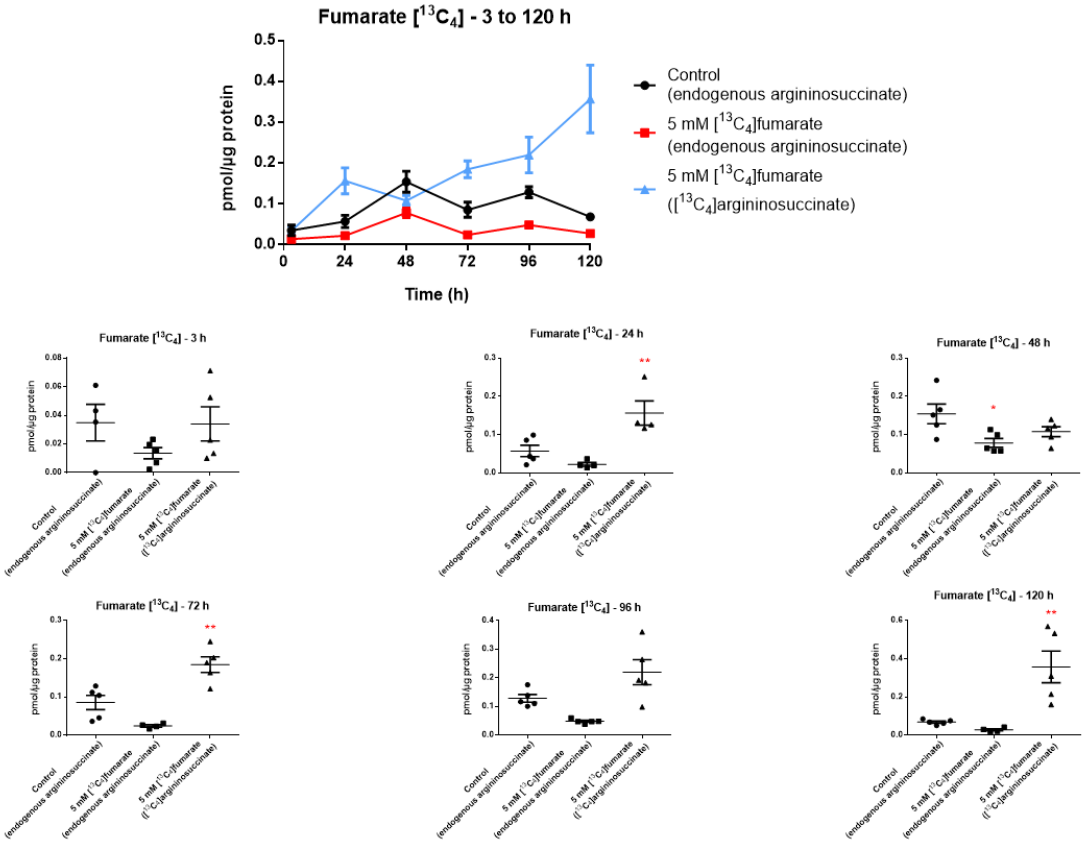

Figura 46 – Níveis de [$^{13}C_4$]argininosuccinato e argininosuccinato endógeno em células BEAS-2B expostas por 3, 24, 48, 72, 96 e 120 h a 5 mM de [$^{13}C_4$]fumarato e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período para visualização das alterações significativas. Média ± erro padrão, *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001 em relação ao controle.

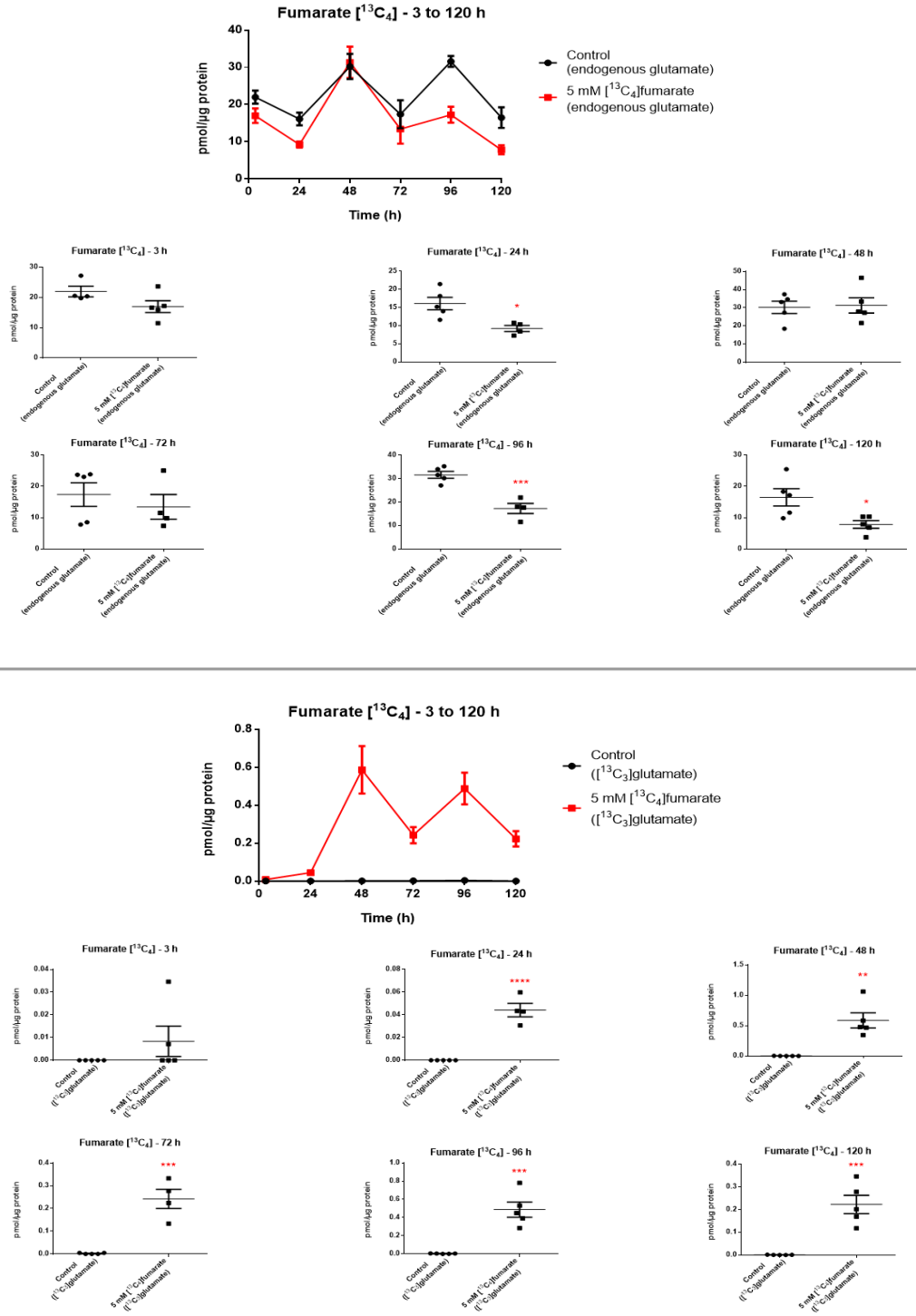

Figura 47 – Níveis de glutamato endógeno (painel superior) e [$^{13}C_3$]glutamato (painel inferior) em células BEAS-2B expostas por 3, 24, 48, 72, 96 e 120 h a 5 mM de [$^{13}C_4$]fumarato e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período para visualização das alterações significativas. Média ± erro padrão, teste t não pareado, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001 em relação ao controle.

As análises realizadas por HPLC-Q-TOF no modo negativo em *fullscan* permitiram a confirmação dos dados apresentados acima. A identificação dos metabólitos foi feita pela massa exata e por experimentos de adição de padrão à amostra, como apresentado nas **Figuras 48 e 49**.

Além dos isótopos [$^{13}C_4$], as análises revelaram a presença de isótopos [$^{13}C_3$], como [$^{13}C_3$]fumarato, [$^{13}C_3$]malato e [$^{13}C_3$]glutamato (**Figuras 50 a 53**).

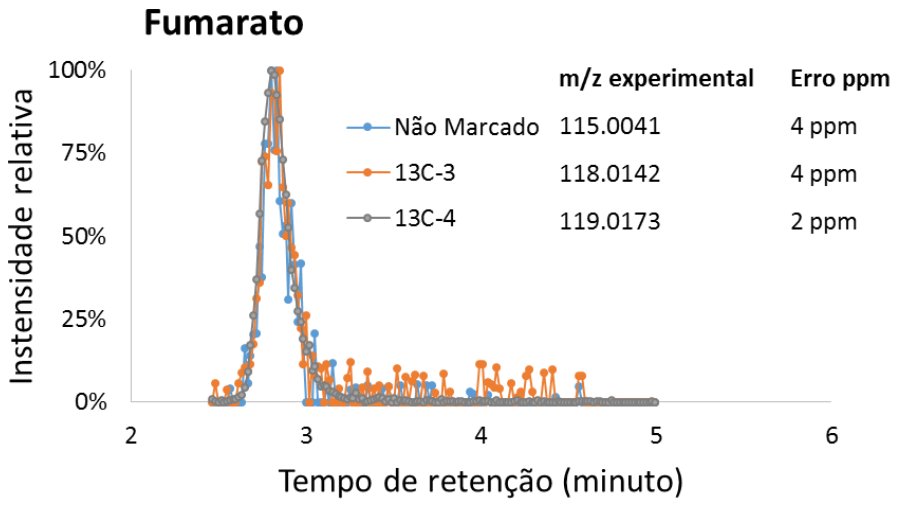

Figura 48 – Cromatogramas sobrepostos dos isótopos do fumarato (*m/z* 115.0041), [$^{13}C_3$]fumarato (*m/z* 118.0142) e [$^{13}C_4$]fumarato (*m/z* 119.00173) em amostra do grupo exposto ao [$^{13}C_4$]fumarato por 120 h.

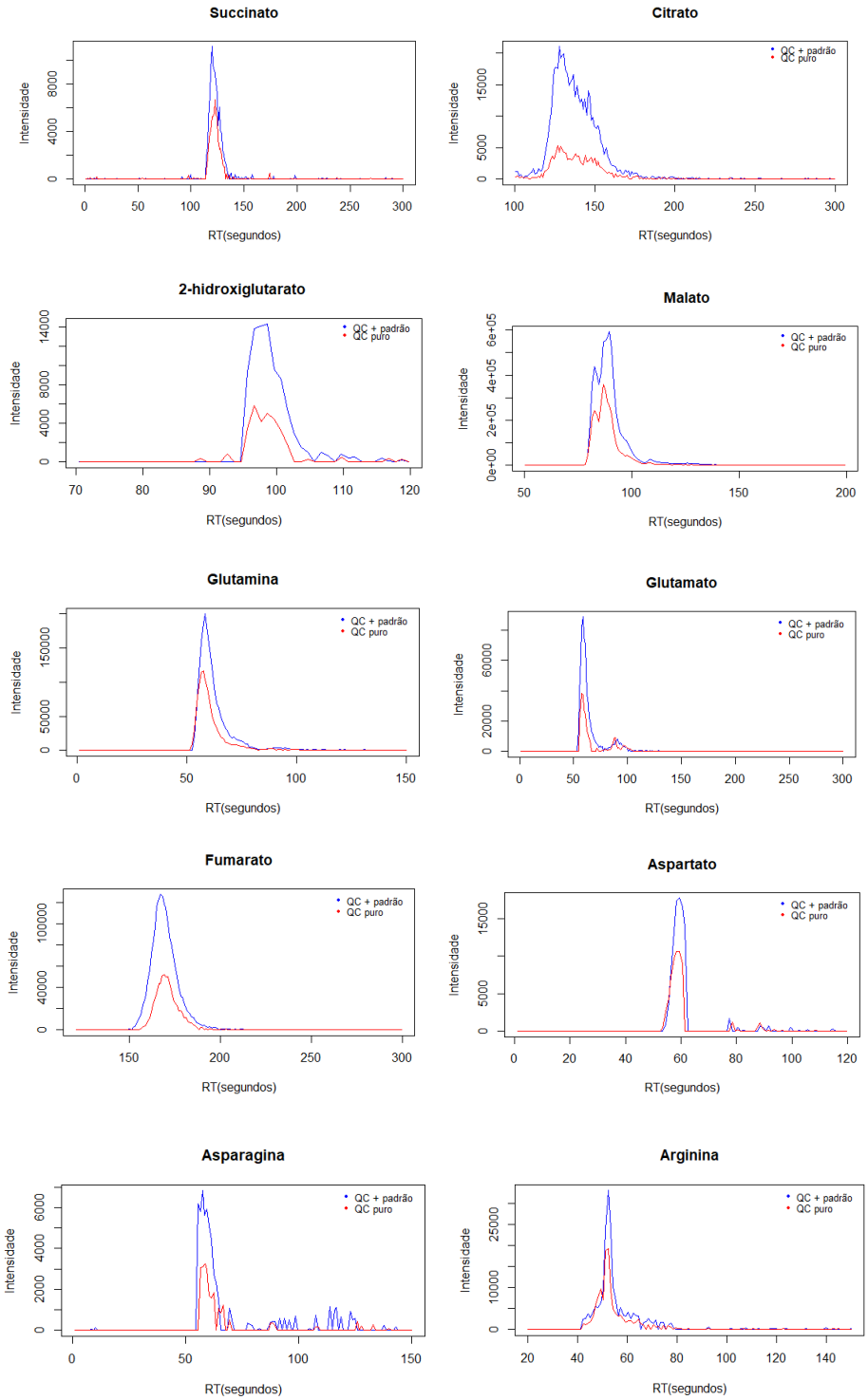

Figura 49 – Cromatogramas obtidos por HPLC-Q-TOF dos metabólitos analisados, apresentando os íons extraídos das amostras de controle de qualidade puro (vermelho) e amostra de controle de qualidade após a adição do padrão do metabólito correspondente (azul).

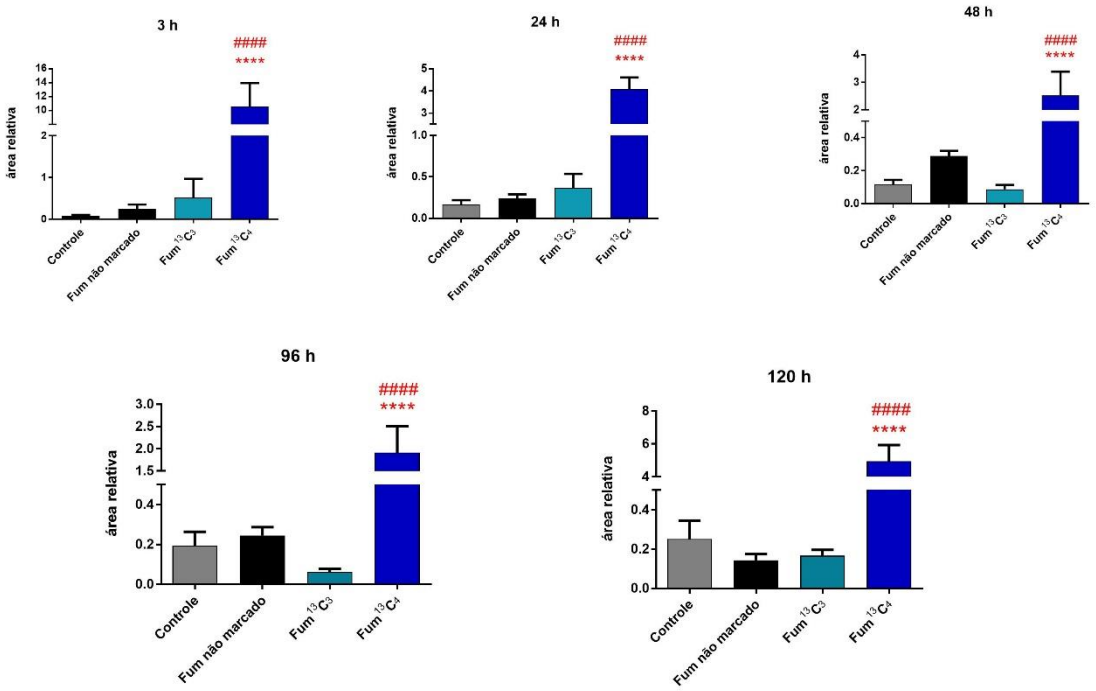

Figura 50 – Áreas relativas (metabólito/padrão interno) do fumarato endógeno no controle (cinza), fumarato endógeno nas células expostas a [$^{13}C_4$]fumarato (preto), [$^{13}C_3$]fumarato (azul claro) e [$^{13}C_4$]fumarato (azul escuro) nas células expostas a [$^{13}C_4$]fumarato. Média ± erro padrão, *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001 em relação ao controle; $^{\#}$P < 0,05, $^{\#\#}$P < 0,01, $^{\#\#\#}$P < 0,001, $^{\#\#\#\#}$P < 0,0001 em relação ao grupo fumarato não marcado.

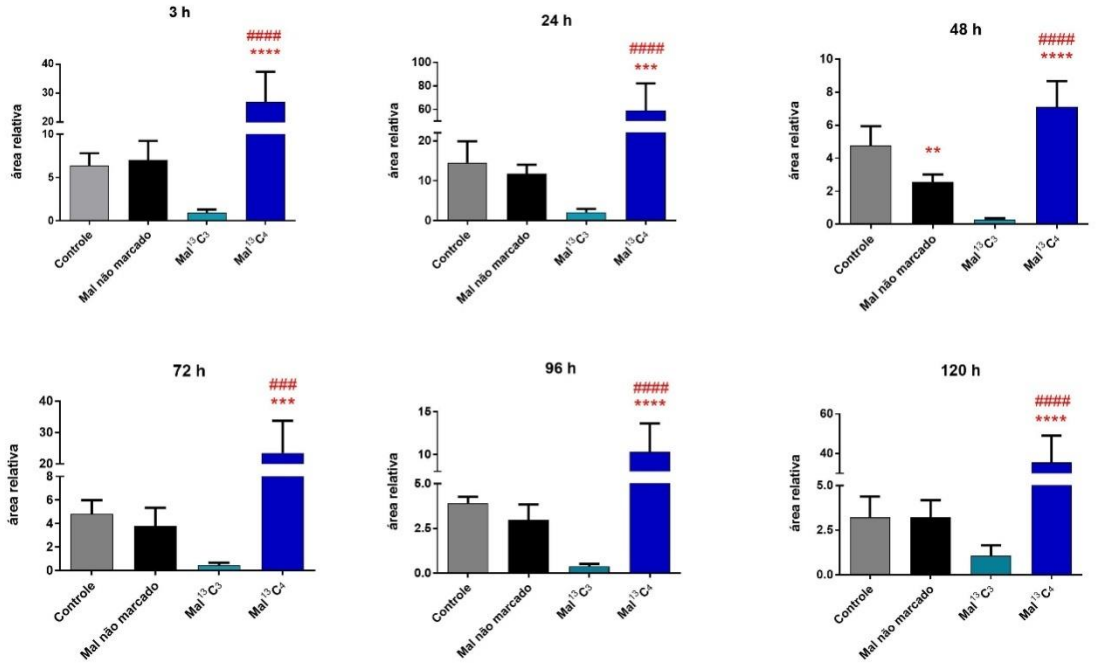

Figura 51 – Áreas relativas (metabólito/padrão interno) do malato endógeno no controle (cinza), malato endógeno nas células expostas a [$^{13}C_4$]fumarato (preto), [$^{13}C_3$]malato (azul claro) e [$^{13}C_4$]malato (azul escuro) nas células expostas a [$^{13}C_4$]fumarato. Média ± erro padrão, *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001 em relação ao controle; $^{\#}$P < 0,05, $^{\#\#}$P < 0,01, $^{\#\#\#}$P < 0,001, $^{\#\#\#\#}$P < 0,0001 em relação ao grupo malato não marcado.

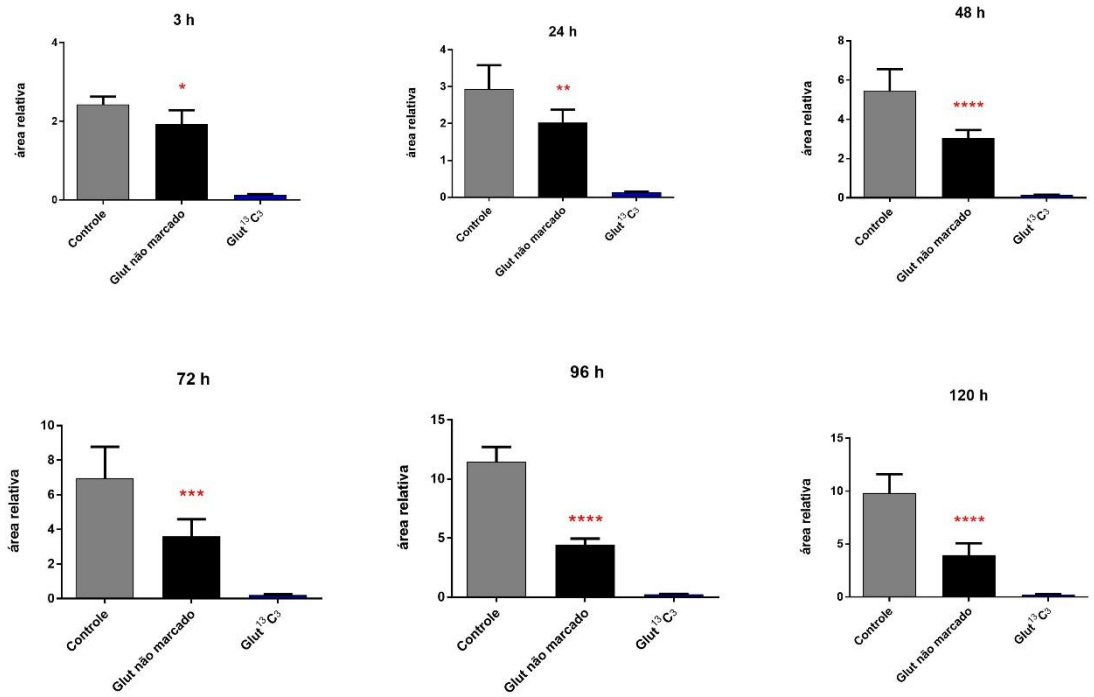

Figura 52 – Áreas relativas (metabólito/padrão interno) do glutamato endógeno no controle (cinza), glutamato endógeno (preto) e [$^{13}C_3$]glutamato (azul) nas células expostas a [$^{13}C_4$]fumarato. Média ± erro padrão, *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001 em relação ao controle.

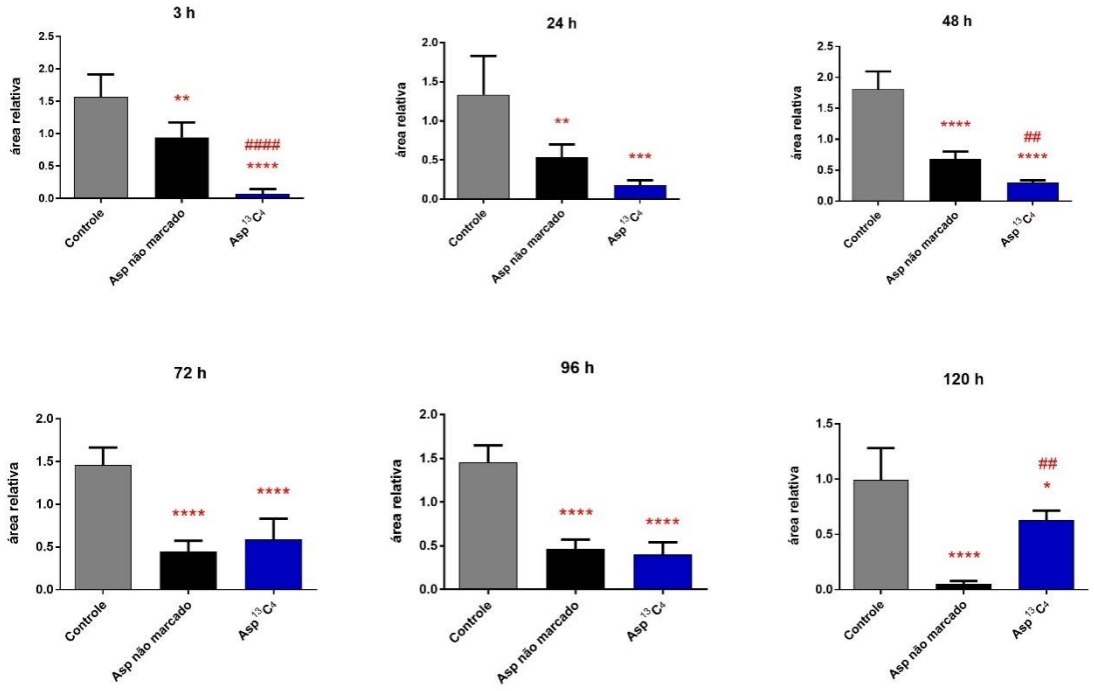

Figura 53 – Áreas relativas (metabólito/padrão interno) do aspartato endógeno no controle (cinza), aspartato endógeno (preto) e [$^{13}C_4$]aspartato (azul) nas células expostas a [$^{13}C_4$]fumarato. Média ± erro padrão, *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001 em relação ao controle; $^{\#}$P < 0,05, $^{\#\#}$P < 0,01, $^{\#\#\#}$P < 0,001, $^{\#\#\#\#}$P < 0,0001 em relação ao grupo aspartato não marcado.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

1. Fumarato presente no meio de cultura das células BEAS-2B até a concentração de 10 mM não levou a citotoxicidade significativa ao longo de 7 dias de exposição. Alterações mínimas nos ensaios do cristal violeta, MTT e análise do ciclo celular foram observadas em determinados períodos de exposição, sem uma clara relação entre concentração e resposta.
2. Todas as concentrações testadas de fumarato (1, 5 e 10 mM) ao longo de 7 dias levaram ao aumento de formação de colônias no *soft agar*, o que indica a indução da transição epitélio-mesenquimal característica de células epiteliais transformadas.
3. As colônias crescidas no *soft agar* como resultado da exposição das células a 5 e 10 mM de fumarato durante 7 dias apresentaram maior migração e invasão na câmara de Boyden (*transwell*). O efeito foi observado após um longo período de cultivo das células das colônias (90 dias, com repiques intermitentes) na ausência de fumarato.
4. Fumarato levou à redução dos níveis de 5-hmC no DNA das células, o que está de acordo com o efeito esperado de inibição de enzimas TET. O efeito sobre os níveis de 5-hmC foi melhor observado após o cultivo das células por 22 dias (com repiques intermitentes) após a última exposição ao fumarato por 7 dias, o que revelou sua persistência após cessada a exposição. A diminuição dos níveis de 5-hmC não foi acompanhada por aumento dos níveis de 5-mC.
5. Foi observada indução de estresse redox celular na exposição ao fumarato (1, 5 e 10 mM) ao longo de 7 dias.
6. As alterações metabólicas induzidas pelo fumarato não caracterizam a ocorrência de efeito Warburg. Não houve aumento da taxa de consumo de glicose pelas células ou da geração de lactato.
7. As células BEAS-2B absorveram o fumarato adicionado ao meio de cultura, o qual foi convertido intracelularmente a malato, aspartato, argininosuccinato, citrato, succinato e glutamato. O oncometabólito 2-L-hidroxiglutarato foi detectado em níveis aumentados nas células expostas a fumarato, assim como adenosina, enquanto NAD^+ e $NADP^+$ apareceram diminuídos. As alterações metabólicas na presença de fumarato contribuíram

para a manutenção do balanço energético das células, ou mesmo para um saldo positivo de energia.

8. A exposição das células a [$^{13}C_4$]fumarato permitiu a análise do fluxo inicial do fumarato absorvido pelas células. A partir dessa análise verificamos que o fumarato absorvido entra no ciclo de Krebs, gerando malato, que é em grande parte desviado para reações externas ao ciclo, como a geração de aspartato e argininosuccinato. Citrato proveniente das reações de [$^{13}C_4$]fumarato no ciclo de Krebs foi detectado em baixos níveis, bem inferiores aos níveis endógenos. O uso de [$^{13}C_4$]fumarato permitiu a visualização da geração de [$^{13}C_4$]succinato, que tem como possível fonte a atividade reversa da succinato desidrogenase, o que é relatado na literatura como importante para a sobrevivência tumoral na presença de baixas concentrações de oxigênio. Verificamos também a geração de [$^{13}C_3$]glutamato.
9. Supõe-se que as alterações metabólicas induzidas pelo fumarato absorvido pelas células BEAS-2B contribuam para a modulação da expressão de genes e da atividade de proteínas que favorecem o processo tumorigênico.

REFERÊNCIAS

ALTMAN, B. J.; STINE, Z. E.; DANG, C. V. From Krebs to clinic: Glutamine metabolism to cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 16, n. 10, p. 619–634, 2016.

ANDERSON, N. M. et al. The emerging role and targetability of the TCA cycle in cancer metabolism. **Protein and Cell**, v. 9, n. 2, p. 216–237, 2018.

ATHENA AKTIPIS, C. et al. Cancer across the tree of life: Cooperation and cheating in multicellularity. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 370, p. 1–21, 2015.

BADUR, M. G.; METALLO, C. M. Reverse engineering the cancer metabolic network using flux analysis to understand drivers of human disease. **Metabolic Engineering**, v. 45, p. 95–108, 2018.

BARDELLA, C. et al. Aberrant succination of proteins in fumarate hydratase-deficient mice and HLRCC patients is a robust biomarker of mutation status. **Journal of Pathology**, v. 225, n. 1, p. 4–11, 2011.

BASTOS, A. S. et al. Quantitation of malondialdehyde in gingival crevicular fluid by a high–performance liquid chromatography–based method. **Analytical Biochemistry**, v. 423, n. 1, p. 141–146, 2012.

BELENKY, P.; BOGAN, K. L.; BRENNER, C. NAD + metabolism in health and disease. **TRENDS in Biochemical Sciences**, v. 32, n. 1, p. 12–19, 2007.

BENDER, J. Dna Methylation and Epigenetics. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, n. 1, p. 41–68, 2004.

BERTERO, E.; MAACK, C. Calcium signaling and reactive oxygen species in Mitochondria. **Circulation Research**, v. 122, n. 10, p. 1460–1478, 2018.

BIALOUS, S. A.; SARNA, L. Lung Cancer and Tobacco: What Is New? **Nursing Clinics of North America**, v. 52, n. 1, p. 53–63, 2017.

BOISON, D. Adenosine kinase: Exploitation for therapeutic gain. **Pharmacological Reviews**, v. 65, n. 3, p. 906–943, 2013.

BOROWICZ, S. et al. The Soft Agar Colony Formation Assay. **Journal of Visualized Experiments**, n. 92, p. 1–6, 2014.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.

BYERS, L. A.; RUDIN, C. M. Small cell lung cancer: Where do we go from here? **Cancer**, v. 121, n. 5, p. 664–672, 2015.

CAIRNS, R. A.; HARRIS, I. S.; MAK, T. W. Regulation of cancer cell metabolism. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, n. 2, p. 85–95, 2011.

CHEN, S. et al. The expression of prolyl hydroxylase domain enzymes are upregulated and negatively correlated with Bcl-2 in non-small cell lung cancer. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 358, p. 257–263, 2011.

CHOI, B. H.; COLOFF, J. L. The diverse functions of non-essential amino acids in cancer. **Cancers**, v. 11, n. 675, p. 1–17, 2019.

CYR, A. R.; DOMANN, F. E. The Redox Basis of Epigenetic Modifications: From Mechanisms to Functional Consequences. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 15, n. 2, p. 551–589, 2011.

DAMIANI, L. A. et al. Carcinogen-induced gene promoter hypermethylation is mediated by DNMT1 and causal for transformation of immortalized bronchial epithelial cells. **Cancer Research**, v. 68, n. 21, p. 9005–9014, 2008.

DAYEM, A. A. et al. The role of reactive oxygen species (ROS) in the biological activities of metallic nanoparticles. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 1, p. 1–21, 2017.

DELAGE, B. et al. Arginine deprivation and argininosuccinate synthetase expression in the treatment of cancer. **International Journal of Cancer**, v. 126, n. 12, p. 2762–2772, 2010.

DESIDERI, E.; VEGLIANTE, R.; CIRIOLO, M. R. Mitochondrial dysfunctions in cancer: Genetic defects and oncogenic signaling impinging on TCA cycle activity. **Cancer Letters**, v. 356, n. 2, p. 217–223, 2015.

DING, J. et al. Cyclin D1 induction by benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide via the

phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/MAPK and p70s6k-dependent pathway promotes cell transformation and tumorigenesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 48, p. 33311–33319, 2009.

DOI, A. et al. Differential methylation of tissue- and cancer-specific CpG island shores distinguishes human induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells and fibroblasts. **Nature Genetics**, v. 41, n. 12, p. 1350–1353, 2010.

ENDTER, S. et al. RT-PCR analysis of ABC, SLC and SLCO drug transporters in human lung epithelial cell models. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 61, n. 5, p. 583–591, 2009.

ETCHEGARAY, J. P.; MOSTOSLAVSKY, R. Interplay between Metabolism and Epigenetics: A Nuclear Adaptation to Environmental Changes. **Molecular Cell**, v. 62, n. 5, p. 695–711, 2016.

FAVIER, J. et al. The Warburg effect is genetically determined in inherited pheochromocytomas. **PLoS ONE**, v. 4, n. 9, p. 1–12, 2009.

FINDER, D. R.; HARDIN, C. D. Transport and metabolism of exogenous fumarate and 3-phosphoglycerate in vascular smooth muscle. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 195, p. 113–121, 1999.

FÖRSTER, A. et al. Dimethylfumarate induces apoptosis in human mast cells. **Experimental Dermatology**, v. 22, n. 11, p. 719–724, 2013.

FRENCH, B. D. The Proposed Effects of Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NAD) Supplementation on Energy Metabolism. v. 3, n. 5, p. 96–107, 2015.

FREZZA, C. et al. Haem oxygenase is synthetically lethal with the tumour suppressor fumarate hydratase. **Nature**, v. 477, n. 7363, p. 225–228, 2011.

FRIZZELL, N. et al. Succination of thiol groups in adipose tissue proteins in diabetes. Succination inhibits polymerization and secretion of adiponectin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 38, p. 25772–25781, 2009.

FUHLER, G. M.; EPPINGA, H.; PEPPELENBOSCH, M. P. Fumarates and Cancer. **Trends in Molecular Medicine**, v. 23, n. 1, p. 3–5, 2017.

GALBRAITH, A. R. et al. Chemoprevention of lung carcinogenesis by dietary nicotinamide and

inhaled budesonide. **Cancer Prevention Research**, v. 12, n. 2, p. 69–78, 2019.

GARRIGUE, P. et al. The Evolving Role of Succinate in Tumor Metabolism: An 18 F-FDG–Based Study. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 58, n. 11, p. 1749–1755, 2017.

GLOBOCAN. **Lung cancer 2018**.

GOLEMIS, E. A. et al. Molecular mechanisms of the preventable causes of cancer in the United States. **Genes and Development**, v. 32, n. 13–14, p. 868–902, 2018.

GUITART, A. V. et al. Fumarate hydratase is a critical metabolic regulator of hematopoietic stem cell functions. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 214, n. 3, p. 719–735, 2017.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–74, 2011.

HEIDEN, M. G. Vander; CANTLEY, L. C.; THOMPSON, C. B. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. **Science**, v. 324, n. 5930, p. 1029–1033, 2010.

HEINONEN, H. R. et al. Global metabolomic profiling of uterine leiomyomas. **British Journal of Cancer**, v. 117, n. 12, p. 1855–1864, 2017.

HIRATA, E.; SAHAI, E. Tumor Microenvironment and Differential Responses to Therapy. **Cold Spring Harb Perspect Med doi:**, v. 7, n. a026781, p. 1–14, 2017.

HIRSCH, F. R. et al. Lung cancer: current therapies and new targeted treatments. **The Lancet**, v. 389, n. 10066, p. 299–311, 2017.

HOLZEROVÁ, E.; PROKISCH, H. Mitochondria: Much ado about nothing? How dangerous is reactive oxygen species production? **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 63, p. 16–20, 2015.

HUANG, C. Y. et al. Inhibition effect of a custom peptide on lung tumors. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, p. 1–13, 2014.

HUI, L.; CHEN, Y. Tumor microenvironment: Sanctuary of the devil. **Cancer Letters**, v. 368, n. 1, p. 7–13, 2015.

INTITUTO NACIONAL DE CÂNCER - INCA. **Estatísticas de câncer do Brasil**. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>.

INTLEKOFER, A. M. et al. L-2-Hydroxyglutarate production arises from noncanonical enzyme function at acidic pH. **Nature Chemical Biology**, v. 13, n. 5, p. 494–500, 2017.

ITO, S. et al. Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion , ES cell self- renewal , and ICM specification. **Nature**, v. 466, n. 7310, p. 1129–1133, 2010.

JEONG, W. et al. Hypoxia-dependent accumulation of hypoxia-inducible factor-1 alpha induces transient cell cycle arrest in porcine trophectoderm cells. **Theriogenology**, v. 115, p. 9–15, 2018.

KALUZKI, I. et al. Dimethylfumarate inhibits melanoma cell proliferation via p21 and p53 induction and bcl-2 and cyclin B1 downregulation. **Tumor Biology**, v. 37, n. 10, p. 13627–13635, 2016.

KAMI, K. et al. Metabolomic profiling of lung and prostate tumor tissues by capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry. **Metabolomics**, v. 9, n. 2, p. 444–453, 2013.

KAPLON, J.; VAN DAM, L.; PEEPER, D. Two-way communication between the metabolic and cell cycle machineries: the molecular basis. **Cell Cycle**, v. 14, n. 13, p. 2022–2032, 2015.

KASSIE, F. et al. Inhibition of lung carcinogenesis and critical cancer-related signaling pathways by N-acetyl-S-(N-2-phenethylthiocarbamoyl)-l-cysteine, indole-3-carbinol and myo-inositol, alone and in combination. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 9, p. 1634–1641, 2010.

KRSTIC, M. N. et al. General Aspects of Primary Cancer Prevention. **Digestive Diseases**, p. 1–10, 2019.

KUO, C.-Y. et al. HIF-1-alpha links mitochondrial perturbation to the dynamic acquisition of breast cancer tumorigenicity. **Oncotarget**, v. 7, n. 23, p. 34052–34069, 2016.

LAURENTI, G.; TENNANT, D. A. Isocitrate dehydrogenase (IDH), succinate dehydrogenase (SDH), fumarate hydratase (FH): three players for one phenotype in cancer? **Biochemical Society Transactions**, v. 44, n. 4, p. 1111–1116, 2016.

LI, Y. et al. Correction: Real-world management of patients with epidermal growth factor receptor (EGFR) mutation-positive non-small-cell lung cancer in the USA. **PLoS ONE**, v. 14, n.

1, p. 1–14, 2019.

LOUREIRO, A. P. de M.; OLIVEIRA, A. A. F. de; OLIVEIRA, T. F. de. Sistemas antioxidantes. **In: Cristiane Cominetti, Marcelo Macedo Rogero, Maria Aderuza Horst. (Org.). Genômica Nutricional - Dos fundamentos à nutrição molecular**. 1. ed. [s.l: s.n.]p. 386–408.

LUNDBERG, A. S. et al. Immortalization and transformation of primary human airway epithelial cells by gene transfer. **Oncogene**, v. 21, n. 29, p. 4577–4586, 2002.

MAGAÑA, A. A. et al. High-performance liquid chromatography determination of 5-methyl-2′-deoxycytidine, 2′-deoxycytidine, and other deoxynucleosides and nucleosides in DNA digests. **Analytical Biochemistry**, v. 374, n. 2, p. 378–385, 2008.

MENG, W.; XUE, S.; CHEN, Y. The role of CXCL12 in tumor microenvironment. **Gene**, v. 641, p. 105–110, 2018.

MING, Z. et al. Bioinformatics analysis and expression study of fumarate hydratase in lung cancer. **Thoracic Cancer**, v. 5, p. 543–549, 2014.

MOLONEY, J. N.; COTTER, T. G. ROS signalling in the biology of cancer. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 80, p. 50–64, 2018.

NAGASAKA, H. et al. Circulating tricarboxylic acid cycle metabolite levels in citrin-deficient children with metabolic adaptation, with and without sodium pyruvate treatment. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 120, n. 3, p. 207–212, 2017.

NANAVATY, P.; ALVAREZ, M. S.; MICHAEL ALBERTS, W. Lung Cancer Screening: Advantages, controversies, and applications. **Cancer Control**, v. 21, n. 1, p. 9–14, 2014.

PAVLOVA, N. N.; THOMPSON, C. B. THE EMERGING HALLMARKS OF CANCER METABOLISM. **Cell Metabolism**, v. 23, n. 1, p. 27–47, 2016.

PAVLOVA, N. N.; THOMPSON, C. B. THE EMERGING HALLMARKS OF CANCER METABOLISM. **Cell Metabolism**, v. 23, n. 1, p. 27–47, 2017.

POLJSAK, B. NAD+ in Cancer Prevention and Treatment: Pros and Cons. **Journal of Clinical & Experimental Oncology**, v. 5, n. 4, p. 1–15, 2016.

PUGLIESE, G. **Sobre o “ Caso Marie Curie ” A Radioatividade e a Subversão do Gênero**.

2009. 2009.

RAHMAN, A. M. A. et al. Targeted metabolomics in cultured cells and tissues by mass spectrometry: Method development and validation. **Analytica Chimica Acta**, v. 845, p. 53–61, 2014.

RAJMAN, L.; CHWALEK, K.; SINCLAIR, D. A. Therapeutic Potential of NAD-Boosting Molecules: The In Vivo Evidence. **Cell Metabolism**, v. 27, n. 3, p. 529–547, 2018.

RAMIREZ, R. D. et al. O-205 Immortalization of normal human bronchial epithelial cells (NHBEC) in the absence of viral oncoproteins. In: Lung Cancer, **Anais**...2004.

SAKAI, C. et al. Mitochondrial fumarate reductase as a target of chemotherapy: From parasites to cancer cells. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1820, n. 5, p. 643–651, 2012.

SALMINEN, A. et al. Krebs cycle intermediates regulate DNA and histone methylation: Epigenetic impact on the aging process. **Ageing Research Reviews**, v. 16, n. 1, p. 45–65, 2014.

SAN-MILLÁN, I.; BROOKS, G. A. Reexamining cancer metabolism: Lactate production for carcinogenesis could be the purpose and explanation of the Warburg Effect. **Carcinogenesis**, v. 38, n. 2, p. 119–133, 2017.

SCHAEFER, I.-M.; HORNICK, J. L.; BOVÉE, J. V. M. G. The role of metabolic enzymes in mesenchymal tumors and tumor syndromes: Genetics, pathology, and molecular mechanisms. **Metabolic enzymes in mesenchymal tumors**, v. 98, n. 4, p. 414–426, 2018.

SCIACOVELLI, M. et al. Fumarate is an epigenetic modifier that elicits epithelial-to-mesenchymal transition. **Nature**, v. 537, n. 7621, p. 544–547, 2017.

SCIACOVELLI, M.; FREZZA, C. Oncometabolites: Unconventional triggers of oncogenic signalling cascades. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 100, p. 175–181, 2016.

SCOURZIC, L.; MOULY, E.; BERNARD, O. A. TET proteins and the control of cytosine demethylation in cancer. **Genome Medicine**, v. 7, n. 9, p. 1–16, 2015.

SCRIMA, M. et al. Signaling networks associated with AKT activation in non-small cell lung cancer (NSCLC): New insights on the role of phosphatydil-inositol-3 kinase. **PLoS ONE**, v. 7, n.

2, p. 1–15, 2012.

SELAK, M. A. et al. Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF-α prolyl hydroxylase. **Cancer Cell**, v. 7, n. 1, p. 77–85, 2005.

SHANMUGASUNDARAM, K. et al. The oncometabolite fumarate promotes pseudohypoxia through noncanonical activation of NF-κB signaling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 35, p. 24691–24699, 2014.

SHIN, H. et al. Establishment of five immortalized human ovarian surface epithelial cell lines via SV40 T antigen or HPV E6 / E7 expression. **PLoS ONE**, v. 13, n. 10, p. 1–17, 2018.

SHRIVASTAVA, M. et al. Global long-range transport and lung cancer risk from polycyclic aromatic hydrocarbons shielded by coatings of organic aerosol. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 6, p. 1246–1251, 2017.

SIEGLER, L. et al. Fumarate hydratase (FH) deficiency in uterine leiomyomas: recognition by histological features versus blind immunoscreening. **Virchows Archiv**, v. 472, n. 5, p. 789–796, 2018.

SMITH, C. A. et al. XCMS: Processing Mass Spectrometry Data for Metabolite Profiling Using Nonlinear Peak Alignment, Matching, and Identification. **Analytica Chimica**, v. 78, n. 3, p. 779–787, 2006.

SRIDHARAN, V. et al. O 2 -sensing signal cascade: clamping of O 2 respiration, reduced ATP utilization, and inducible fumarate respiration. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 295, n. 1, p. C29–C37, 2008.

SULLIVAN, L. B.; GUI, D. Y.; VAN DER HEIDEN, M. G. Altered metabolite levels in cancer: Implications for tumour biology and cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 16, n. 11, p. 680–693, 2016.

TEIXEIRA, L. A.; FONSECA, C. O. **INCA e o controle de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 2007.

TROTTA, A. P.; CHIPUK, J. E. Mitochondrial dynamics as regulators of cancer biology. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 74, n. 11, p. 1999–2017, 2017.

TYRAKIS, P. A. et al. Fumarate Hydratase Loss Causes Combined Respiratory Chain Defects. **Cell Reports**, v. 21, n. 4, p. 1036–1047, 2017.

VAZQUEZ, A. et al. Cancer metabolism at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 129, n. 18, p. 3367–3373, 2016.

VINCENT, T.; GATENBY, R. An evolutionary model for initiation, promotion, and progression in carcinogenesis. **International Journal of Oncology**, v. 32, p. 729–737, 2008.

WENTZEL, J. F. et al. Exposure to high levels of fumarate and succinate leads to apoptotic cytotoxicity and altered global DNA methylation profiles in vitro. **Biochimie**, v. 135, p. 28–34, 2017.

WILLIAMS, K.; CHRISTENSEN, J.; HELIN, K. DNA methylation: TET proteins-guardians of CpG islands? **EMBO Reports**, v. 13, n. 1, p. 28–35, 2012.

XIAO, M. et al. Inhibition of α-KG-dependent histone and DNA demethylases by fumarate and succinate that are accumulated in mutations of FH and SDH tumor suppressors. **Genes and Development**, v. 26, n. 12, p. 1326–1338, 2012.

XU, X. et al. MUC1 contributes to BPDE-induced human bronchial epithelial cell transformation through facilitating EGFR activation. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, p. 1–9, 2012.

YANG, M. et al. Prolyl hydroxylase domain enzymes: important regulators of cancer metabolism. **Hypoxia**, v. 2, p. 127–142, 2014.

ZHAO, Y. et al. Anticancer efficacies of arsenic disulfide through apoptosis induction, cell cycle arrest, and pro-survival signal inhibition in human breast cancer cells. **American journal of cancer research**, v. 8, n. 3, p. 366–386, 2018.

ZHENG, L. et al. Reversed argininosuccinate lyase activity in fumarate hydratase-deficient cancer cells. **Cancer & Metabolism**, v. 1, p. 1–12, 2013.

ZHENG, L. et al. Fumarate induces redox-dependent senescence by modifying glutathione metabolism. **Nature Communications**, v. 6, p. 1–12, 2015.

ANEXO

Rua Yamashita Noboru, 139 A
Mogi das Cruzes – SP.
+55 11 99455-5364
de_oliveira@usp.br / jolive17@outlook.com

JOSEANA DE OLIVEIRA

EDUCAÇÃO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACEUTICAS DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FCF-USP
Mestrado em Fisiopatologia e Toxicologia (em andamento)

"Identificação de alterações bioquímicas em células epiteliais bronquiais humanas normais expostas a fumarato".

UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI - UAM
Bacharelado em Ciências Biomédicas

ESCOLA LOPES - EL
Técnico em Radiologia

EXPERIÊNCIA

Bolsa de Estudo – Agência de fomento Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.
(agosto de 2017 a julho de 2019)
Mestrado em Fisiopatologia e Toxicologia

ESCOLA LOPES
2013-2017
Professor de curso técnico

PREFEITURA MUNICIPAL DE CARAPICUIBA
2014-2016
Servidor Público: Técnico em Radiologia

PUBLICAÇÕES

DE OLIVEIRA, JOSEANA; MUTRAN, TANGARA JORGE; SANTANA, VINICIUS CANATO. Prevalência de HPV em amostras cervicovaginais sem alterações citológicas. Arquivos de ciências da saúde (famerp), v. 24, p.47-51, 2017. DOI: https://doi.org/10.17696/2318-3691.24.1.2017.535

PUBLICAÇÕES EM ANAIS DE CONGRESSO

OLIVEIRA, J.; CORDEIRO, E. W. F. ; SILVA, G. C. ; SANTOS, M. R. ; MEDEIROS, M. H. G. ; MASCIO, P. ; MARIAENGLER, S. S. ; LOUREIRO, A. P. M. . Modulation of Epigenetic Marks and Cell Transformation in Culture of Normal Human Cells Supplemented with Fumarate. In: International Symposium on Pathophysiology and Toxicology and Simpósio de Pós-graduação em Análises Clínicas. ISPAT and SIMPAC. São Paulo, 2018. p. 1-73.

J. de Oliveira; E.W.F. Cordeiro; G.C Silva ; M.R. dos Santos ; M.H.G. Medeiros ; P. Di Mascio ; S.S. Maria-Engler ; A.P.M. Loureiro . Epigenetic changes and transformation of BEAS-2B cells exposed to fumarate. In: Cell Symposia, 2018, Washington. Cell Symposia - Metabolites as Signaling Molecules, 2018. p. 1-100.

OLIVEIRA, J.; MUTRAN, T. J. ; SANTANA, V. . HPV prevalence in cervicovaginal samples of asymptomatic women. In: 21st World Conference of Family Doctors, 2016, Rio de Janeiro. 21st World Conference of Family Doctors. Rio de Janeiro: Galoá Software for Scientists, 2016. v. 1.

OLIVEIRA, J.; MUTRAN, T. J. ; SANTANA, V. . Prevalência de HPV em Amostras Cérvico Vaginal de Mulheres Assintomáticas. In: 19 Encontro Nacional de Biomedicina, 2016, Botucatu. 19 ENBM, 2016. v. 1. p. 67-68.

APRESENTAÇÕES DE TRABALHO

DE OLIVEIRA, JOSEANA. Metabolismo, marcas epigenéticas e câncer. 2019. Apresentação de Palestra na I Escola de Inverno em Análises Clínicas e Toxicológicas - CLINTOX. Universidade de São Paulo - SP

OLIVEIRA, J.; CORDEIRO, E. W. F. ; SILVA, G. C. ; SANTOS, M. R. ; MEDEIROS, M. H. G. ; MASCIO, P. ; MARIAENGLER, S. S. ; LOUREIRO, A. P. M. . Effects of Fumarate on Transformation and Epigenetic Marks of BEAS-2B Cells. 2018. Apresentação de Trabalho no World Toxicologic Pathology Congress. Universidade de São Paulo - SP

DE OLIVEIRA, JOSEANA; CORDEIRO, E. W. F. Xenobióticos, Metabolismo e Epigenética no Câncer. 2018. Apresentação de Palestra VII Escola de Inverno em Toxicologia - VII EITox. Universidade de São Paulo – SP

J. de Oliveira; E.W.F. Cordeiro; G.C Silva ; M.R. dos Santos ; M.H.G. Medeiros ; P. Di Mascio ; S.S. Maria-Engler ; A.P.M. Loureiro . Epigenetic changes and transformation of BEAS-2B cells exposed to fumarate. 2018. Apresentação de Trabalho no Simpósio Cell Symposia - Metabolites as Signaling Molecules. Washington. USA

OLIVEIRA, J.; CORDEIRO, E. W. F. ; SILVA, G. C. ; SANTOS, M. R. ; MEDEIROS, M. H. G. ; MASCIO, P. ; MARIAENGLER, S. S. ; LOUREIRO, A. P. M. . Modulation of Epigenetic Marks and Cell Transformation in Culture of Normal Human Cells Supplemented with Fumarate. 2018. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

CORDEIRO, E. W. F. ; **DE OLIVEIRA, JOSEANA** ; SANTOS, M. R. ; SILVA, G. C. ; OLIVEIRA, T. F. ; MEDEIROS, M. H. G. ; MASCIO, P. ; LOUREIRO, A. P. M. . Effects of Nicotinamide Riboside Supplementation on Benzo[a]pyrene Induced BEAS-2B Cell Transformation. 2018. Apresentação de Trabalho no 54th Congress of the European Societies of Toxicology. Brussels. Belgium.

OLIVEIRA, J.; CORDEIRO, E. W. F. ; SILVA, G. C. ; SANTOS, M. R. ; MEDEIROS, M. H. G. ; MASCIO, P. ; MARIA-ENGLER, S. S. ; LOUREIRO, A. P. M. . Modulation of Epigenetic Marks and Cell Transformation in Culture of Normal Human Cells Supplemented with Fumarate. 2018. Apresentação de Trabalho no VIII Simposio de Pós-graduação em Analises Clinicas–SIMPAC and III International Symposium on

Pathophysiology and Toxicology-ISPAT. Universidade de São Paulo – SP.

CORDEIRO, E. W. F. ; **OLIVEIRA, J.** ; SANTOS, M. R. ; SILVA, G. C. ; MEDEIROS, M. H. G. ; MASCIO, P. ; LOUREIRO, A. P.M. . Modulation of The Intracellular Concentration of NAD+ and it s Effect on the Benzo(a)pyrene Induced Transformation of Human Bronchial Epithelial Cells. 2018. Apresentação de Trabalho no VIII Simpósio de Pos-graduação em Analises Clinicas–SIMPAC and III International Symposium on Pathophysiology and Toxicology-ISPAT. Universidade de São Paulo - SP

JOSEANA DE OLIVEIRA. Projeto: Conhecimento do aluno e sua futura atuação na sociedade, como cidadão e profissional. 2018. Apresentação de palestra na XX Jornada de Trajetórias e Profissões do Cursinho da Poli. São Paulo – SP.

CORDEIRO, E. W. F. ; **OLIVEIRA, J.** ; SANTOS, M. R. ; SILVA, G. C. ; MEDEIROS, M. H. G. ; MASCIO, P. ; LOUREIRO, A. P. M. . Effects of Nicotinamide Riboside Supplementation on Benzo[a]pyrene Induced Cellular Transformation. 2018. Apresentação de Trabalho no World Toxicologic Pathology Congress. Universidade de São Paulo - SP

OLIVEIRA, J.; MUTRAN, T. J. ; SANTANA, V. . HPV prevalence in cervicovaginal samples of asymptomatic women. 2016. Apresentação de Trabalho na Conferência Mundial WONCA de Médicos de Familia. Rio de Janeiro - RJ

OLIVEIRA, J.; MUTRAN, T. J. ; SANTANA, V. . Prevalência de HPV em Amostras Cérvico Vaginal de Mulheres Assintomáticas. 2016. Apresentação de Trabalho no I Simpósio de Educação Continuada da Rede de Hospitais São Camilo de São Paulo. SP

OLIVEIRA, J.; MUTRAN, T. J. SANTANA, V. . Prevalência de HPV em Amostras Cérvico Vaginal de Mulheres Assintomáticas. 2016. Apresentação de Trabalho no 19 Encontro Nacional de Biomedicina. Botucatu - SP

OLIVEIRA, J.; MUTRAN, T. J. Uma Experiência de Ensino da Biologia Molecular Utilizando o Método Aprendizado Baseado em Problemas. 2016. Apresentação de Trabalho no I Simpósio de Educação Continuada da Rede de Hospitais São Camilo de São Paulo - SP

OLIVEIRA, J.; MUTRAN, T. J. SANTANA, V. Prevalência de HPV em Amostras Cérvico Vaginal de Mulheres Assintomáticas. 2015. Apresentação de Trabalho/Outra Encontro de Iniciação Cientifica da Universidade Anhembi Morumbi – SP

JOSEANA DE OLIVEIRA. Orientação Profissional para estudantes do Ensino Médio em escolas públicas. 2014. Apresentação de palestra no 21 PROJETO RUMO.

PARTICIPAÇÕES EM EVENTOS

Quimiofobia: fato ou fake. Impacto no seu cotidiano. International Life Sciences Institute Brasil – ILSA. SP. 2019

Palestra Cancer and MicroRNA. Programa Seminários da Comissão de Pesquisa, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo – SP. 2019

Web of Science, EndNote e Plubons. Universidade Federal de São Paulo – SP. 2019

Cell Symposia - Metabolites as Signaling Molecules. Washington – USA. 2018.

VIII Simposio de Pós-graduação em Analises Clínicas-SIMPAC and III International Symposium on Pathophysiology and Toxicology-ISPAT. Universidade de São Paulo - SP 2018.

World Toxicologic Pathology Congress. Universidade de São Paulo – SP. 2018.

XXIII Semana Farmacêutica de Ciências e Tecnologia LIII Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica X Simpósio Anual de Pesquisa em Ciências Farmacêuticas XVIII Campanha de Diabetes. Universidade de São Paulo – SP. 2018.

Palestra Professores e Professoras: Carreira e Vocações Possíveis. Suzano – SP. 2017.

21 Conferência Mundial WONCA de Médicos de Família. Rio de Janeiro – RJ. 2016.

I Simpósio de Educação Continuada da Rede de Hospitais São Camilo – SP. 2016.

45 Jornada Paulista de Radiologia. São Paulo – SP. 2015. (Congresso).

2 Semana de Biomedicina. Universidade Anhembi Morumbi – SP. 2014.

3 Simpósio Internacional de Medicina Diagnostica. 2014.

II Congresso Internacional de Biomedicina. Araras – SP. 2014.

Pré-Congresso Brasileiro de Biomedicina. Araras – SP. 2014.

XIV Congresso internacional Alatra e I Congresso internacional CIMAS. São Paulo – SP. 2013.

ORGANIZAÇÃO DE EVENTOS	VIII Simpósio de Pós-graduação em Analises Clinicas-SIMPAC and III International Symposium on Pathophysiology and Toxicology-ISPAT. 2018. Universidade de São Paulo – SP.
PREMIAÇÕES	Premiação MENÇÃO HONROSA em Apresentação Oral na categoria MESTRADO com o trabalho: Modulation of epigenetic marks and transformation in culture of normal cells supplemented with fumarate, na XXIII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia LIII Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica e X Simpósio Anual de Pesquisa em Ciências Farmacêuticas XVIII Campanha de Diabetes e Hipertensão. Na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. 2018

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

FICHA DO ALUNO

9143 - 10476445/1 - Joseana de Oliveira

Email:	de_oliveira@usp.br
Data de Nascimento:	17/12/1991
Cédula de Identidade:	RG - 48.448.812-0 - SP
Local de Nascimento:	Estado de São Paulo
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Bacharela em Ciências Biomédicas - Universidade Anhembi Morumbi - São Paulo - Brasil - 2017

Curso:	Mestrado
Programa:	Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)
Área:	Toxicologia
Data de Matrícula:	12/07/2017
Início da Contagem de Prazo:	12/07/2017
Data Limite para o Depósito:	13/01/2020
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Ana Paula de Melo Loureiro - 12/07/2017 até o presente. Email: apmlou@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 12/07/2017
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 03/08/2018
Data do Depósito do Trabalho:	
Título do Trabalho:	
Data Máxima para Aprovação da Banca:	
Data de Aprovação da Banca:	
Data Máxima para Defesa:	
Data da Defesa:	
Resultado da Defesa:	

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor de 20/04/2013 até 28/03/2018).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 15/07/2019

Impresso em: 06/01/2020 16:32:25

Universidade de São Paulo

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

FICHA DO ALUNO

9143 - 10476445/1 - Joseana de Oliveira

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5757-8/1	Tópicos em Fisiopatologia e Toxicologia II	15/08/2017	27/11/2017	15	1	80	A	N	Concluída
BIO5725-4/1	Genética e Câncer (Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo)	22/09/2017	12/10/2017	90	6	100	A	N	Concluída
FBF5805-2/5	Delineamento de Experimentos e Ferramentas Estatísticas Aplicadas às Ciências Farmacêuticas	06/02/2018	16/04/2018	90	6	90	B	N	Concluída
FBC5793-14/1	Tópicos em Fisiopatologia e Toxicologia I	05/03/2018	19/06/2018	15	1	88	A	N	Concluída
FBC5954-1/1	Redação de Trabalhos Científicos	12/04/2018	18/04/2018	15	1	100	A	N	Concluída
MPT5760-5/3	Metodologia de Ensino I: Preparação Pedagógica (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	07/08/2018	08/10/2018	90	6	100	A	N	Concluída
EDF5116-1/1	Ética, Educação e Aprendizagem Baseada em Problemas (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	21/08/2018	10/09/2018	30	0	-	-	N	Matrícula cancelada
BIF5794-2/2	Sinalização Celular (Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo)	02/10/2018	10/12/2018	120	8	80	B	N	Concluída
FBC5792-5/2	Tópicos em Fisiopatologia e Toxicologia III	12/03/2019	24/06/2019	15	1	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	30
Estágios:			
Total:	0	25	30

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 15/07/2019

Impresso em: 06/01/2020 16:32:26