

Universidade de São Paulo  
Instituto de Física

Avaliação utilizando metabolômica sobre modificações  
fisiológicas em células cardíacas desencadeadas como  
resposta a processos de pré-condicionamento

Luis Daniel Montañez Condori



Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Bloise Junior

Dissertação de mestrado apresentada ao Instituto de Física da Universidade de São Paulo, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Antonio Carlos Bloise Junior - Orientador (IFUSP)

Prof. Dr. José Pedro Donoso Gonzalez (IFSC/USP)

Prof. Dr. Jônatas Bussador do Amaral (UNIFESP)

São Paulo

2020

## FICHA CATALOGRÁFICA

**Preparada pelo Serviço de Biblioteca e informação  
do Instituto de Física da Universidade de São Paulo**

Montañez Condori, Luis Daniel

Avaliação utilizando metabolômica sobre modificações fisiológicas em células cardíacas desencadeadas como resposta a processos de pré-condicionamento. São Paulo, 2020.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, Instituto de Física, Depto. de Física Geral.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Bloise Junior

Área de Concentração: Física

Unitermos: 1. Metabolômica; 2. Cardiomiócitos; 3. Pré-condicionamento; 4. Hipóxia; 5. Ressonância Magnética Nuclear.

USP/IF/SBI-078/2020

University of São Paulo  
Physics Institute

Evaluation using metabolomics on physiological  
changes in cardiac cells triggered in response to  
preconditioning processes

Luis Daniel Montañez Condori

Supervisor: Prof. Dr. Antonio Carlos Bloise Junior

Dissertation submitted to the Physics Institute of the  
University of São Paulo in partial fulfillment of the  
requirements for the degree of Master of Science.

Examining Committee:

Prof. Dr. Antonio Carlos Bloise Junior - Supervisor (IFUSP)

Prof. Dr. José Pedro Donoso Gonzalez (IFSC/USP)

Prof. Dr. Jônatas Bussador do Amaral (UNIFESP)

São Paulo

2020



*Dedico a minha família, especialmente  
a meus pais e irmãos, obrigado por  
todo seu apoio e incentivo*



# Agradecimentos

Gostaria de iniciar agradecendo do fundo do meu coração a minha família. Meus pais, Daniel e Ana, meus irmãos, Lidia, Cathy e Kenye. Agradeço às minhas tias, Gladys e Olga, pelo apoio aos meus pais neste último ano que foi difícil para toda a família. Agradeço a minha avó Gregoria (Descanse em paz) pelas palavras e conselhos que deu comigo, sempre me lembrarei de você. Agradeço o apoio e compreensão de todos nesses anos que estive longe de todos vocês.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Antonio por abrir as portas do grupo para mim, agradeço pela confiança depositada em mim, pela excelente orientação, pela amizade, e por ter me apoiado em todos os momentos de meu mestrado, inclusive nos momentos difíceis que passei. Obrigado por essas discussões sobre os temas de nosso projeto, que aumentaram minha visão de pesquisa em outras áreas fora da Física.

Agradeço Prof. Adriano pelas discussões e liberação das instalações do laboratório, Prof. Lígia, a Jenifer e a Isis pelas discussões e orientações, Prof. Roger Chammas (ICESP) pela motivação deste trabalho, IPT por permitir realizar as medidas de  $1\text{H-RMN}$ , FCF-USP pela liofilização das amostras de cardiomiócitos, FM-USP pelo fornecimento de cardiomiócitos, Instituto Butantan pelo fornecimento de RASM e FN1,

Agradeço aos meus amigos Erick, Cristofher e Rodrigo pelo apoio desde o início desta aventura chamada pós-graduação. Por fim FAPESP e CNPq pela financiamento para aquisição de insumos básicos para realização das experiências de  $1\text{H-RMN}$ .





*Sinta-se infeliz ou se motive. Tudo o  
que precisa ser feito, a escolha será  
sempre sua.*

**Wayne Dyer**



# Resumo

O pré-condicionamento em células tem sido estudados extensivamente nos últimos anos, tanto em nível de órgão ou tecido muscular, em particular, em trabalhos que abordam temas ligados ao câncer e tratamentos quimioterápicos. No presente trabalho foram estudados os efeitos de pré-condicionamento em células cardíacas ou cardiomiócitos através de Metabolômica, uma ciência ômica que têm ganhado maior importância e interesse nos últimos anos por ser uma técnica interdisciplinar, onde convergem três grandes ciências básicas: Física, Estatística e Biologia. Cardiomiócitos de rato neonatal foram usados para realizar as experiências para este estudo. Além disso, foi fundamental desenhar, construir e testar uma incubadora que foi capaz de realizar ciclos normóxicos e hipóxicos (pré-condicionamento) controlados pelo microcontrolador Arduino. Uma das ferramentas da Metabolômica, a ressonância magnética nuclear foi utilizada para conseguir os diferentes espectros de ressonância nas diferentes amostras coletadas das diferentes experiências com cardiomiócitos pré-condicionadas e controle. Os cardiomiócitos foram pré-condicionados com ciclos de normóxia-hipóxia de 135min por ciclo, aproximadamente 96h no total, 45min de normóxia e 90 de hipóxia. Outra das ferramentas da Metabolômica foi a teoria de Estatística multivariada e univariada para identificar metabólitos relevantes nas diferentes comparações de amostras coletadas em experiências de pré-condicionamento e não pré-condicionadas que apresentem uma significância estatística ( $\rho < 0.05$ ). Esses metabólitos informam uma determinada via metabólica que pode nos dizer quais são as diferenças biológicas existentes entre essas amostras comparadas. Foram analisadas as amostras de ressonância compostas por células e o meio de cultivo celular. Nossos resultados apontam que é possível que o metabolismo dos cardiomiócitos pré-condicionados estão se adaptando ao estresse induzido pelos ciclos de hipóxia e normóxia, aumentando a biossíntese de acetil-CoA. O processo de pré-condicionamento celular ativa mecanismos de degradação de cadeias carbônicas de origem proteica.

**Palavras chave: Metabolômica; Cardiomiócitos; Pré-condicionamento; Hipóxia; Ressonância Magnética Nuclear .**



# Abstract

Pre-conditioning in cells has been studied extensively in recent years, both in terms of organ or muscle tissue. In the present work, the effects of preconditioning on cardiac cells or cardiomyocytes through Metabolomics were studied, an omic science that has gained greater importance and interest in recent years because it is an interdisciplinary technique, where three major basic sciences converge: Physics, Statistics and Biology. Neonatal rat cardiomyocytes were used to conduct the experiments for this study. In addition, it was essential to design, build and test an incubator that is capable of performing normoxic and hypoxic cycles (preconditioning) controlled by the Arduino microcontroller. One of the tools of Metabolomics, nuclear magnetic resonance is necessary to achieve the different resonance spectra in the different samples collected from different experiments with preconditioned and nonconditioned cardiomyocytes. Cardiomyocytes were preconditioned with normoxia-hypoxia cycles of 135 minutes per cycle, approximately 96 hours in total, 45 minutes of normoxia and 90 of hypoxia. Another of the Metabolomics tools was the theory of multivariate and univariate statistics to identify relevant metabolites in different comparisons of samples collected in preconditioning and non-preconditioning experiments that present statistical significance ( $\rho < 0.05$ ). These metabolites carry a certain metabolic pathway that can tell us what are the biological differences between these compared samples. The cells and the cell culture medium were analyzed. Our results show that it is possible that the metabolism of preconditioned cardiomyocytes adapt to the stress induced by the hypoxia and normoxia cycles, increasing the acetyl-CoA biosynthesis. The process of cellular preconditioning activates mechanisms of degradation of carbon chains of protein origin.

**Keywords: Metabolomics; Cardiomyocytes; Pre-conditioning; Hypoxia; Nuclear Magnetic Resonance.**



# Lista de Tabelas

5.1	Observamos que a viabilidade para as células RASM e Fibroblasto de origem IH é baixa em comparação com as células que vêm da IC . . . . .	38
5.2	Observamos uma viabilidade razoável da IH com respeito a IC . . . . .	38
5.3	Observa-se que a viabilidade na terceira calibração é adequada, atingindo quase 95% . . . . .	38
6.1	Contagem das células NPC no dia final (dia 5). . . . .	47
6.2	Contagem das células PC no dia final (dia 5). . . . .	47
6.3	Contagem das células PC no dia final (5to dia). As amostras de origem IC são amostras não pré-condicionadas (NPC). . . . .	48
6.4	Contagem das células PC no dia final (5to dia).As amostras de origem IC são amostras não pré-condicionadas (NPC). . . . .	48
6.5	Todos os metabólitos presentes nos espectros das amostras NPC e PC e seus respectivos intervalos ou posições de máxima intensidade. 4,6,8 foram metabólitos não encontrados na base de dados do software <i>Chenomx</i> . . . .	51
6.6	Matriz multivariada para todos os metabólitos identificados nos espectros de ressonância das amostras de células NPC e PC . . . . .	52
6.7	Todos os metabólitos identificados no espectros das amostras NPC e PC e seus respectivos intervalos. $\diamond$ : Metabólitos presentes no meio de cultura. . . .	54
6.8	Os valores médios e seu respectivo desvio padrão dos metabólitos presentes em ambos grupos. O metabólito destacado apresenta significância estatística. † foi utilizado o Kruskal-Wallis, indicado para distribuições de dados não-normais (não-gaussianas). . . . .	58
6.9	Valores médios e respectivos desvio padrão dos metabólitos presentes em ambos grupos. Metabólitos destacados apresentam significância estatística. † foi utilizado o test Kruskal-Wallis. . . . .	60
6.10	Grupos comparados IC vs IH após de 48h de desenvolvimento celular, apresentando um metabólitos com significância estatística ( $\rho < 0.05$ ). . . . .	65

6.11 Grupos comparados IC vs IH após 96h de desenvolvimento celular, apresentando seis metabólitos com significância estatística ( $\rho < 0.05$ ). . . . .	65
6.12 Diferentes metabólitos classificadores de grupo com significância estatística para o grupo IC48h vs IC96h. † : utilizado test Kruskal-Wallis . . . . .	68
6.13 Diferentes metabólitos classificadores de grupo com significância estatística para o grupo IH48h vs IH96h. † : utilizado test Kruskal-Wallis . . . . .	68
6.14 Diferentes metabólitos classificadores de grupo com significância estatística para o grupo PC48h vs PC96h. † : utilizado test Kruskal-Wallis . . . . .	70
6.15 Análise univariada ou Test-t para os grupos NPC48h vs PC48h. †: foi utilizado test Kruskal-Wallis . . . . .	74
6.16 Análise univariada para os grupos NPC vs PC - 96h. †: foi utilizado test Kruskal-Wallis . . . . .	75
6.17 Resumo da análise estatística mostrando casos comparados (primeira coluna), VIPs obtidos (segunda coluna), valores de $\rho$ resultantes do Test-t (terceira coluna), taxas de incrementos percentuais (quarta coluna). As taxas percentuais foram comparadas com respeito ao primeiro grupo. . . . .	76
B.1 Matriz multivariada para todos os metabólitos identificados nos espectros de ressonância das amos de meio de cultura NPC e PC . . . . .	100



# Lista de Figuras

3.1	Quantização da componente $z$ , momento angular de spin nuclear para $I = 1$ [30]. . . . .	12
3.2	Quantização da componente $z$ , projeções dos estados $\alpha$ e $\beta$ para $I = \frac{1}{2}$ [30].	13
3.3	Quando o campo magnético $B_0 = 0$ os estados $\alpha$ e $\beta$ não tem uma diferença de energia, porem quando o campo magnético $B_0 \neq 0$ observamos o desdobramento de energia. . . . .	15
3.4	Precessão ao redor do eixo $z$ , com frequência angular $w_0$ . . . . .	15
3.5	Precessão do vetor $M$ em presença do campo de RF ( $B_1$ ). . . . .	17
3.6	Exemplo (a) simples de uma função $f(t)$ no espaço de tempo ( $t$ ) e (b) sua respectiva transformada de fourier no espaço de frequência ( $w$ ) . . . . .	20
3.7	Diferentes FIDs com a sua respectiva TF. . . . .	20
4.1	Distribuição t de Student. quando $n \rightarrow \infty$ a distribuição t tende a distribuição normal . . . . .	29
4.2	Distribuição t de Student. Simetria, $P(t_n > t_{\alpha,n}) = \alpha$ e $t_{\alpha,n} = -t_{1-\alpha,n}$ . . . . .	30
5.1	Vista frontal da IH . . . . .	32
5.2	Display LCD 16x2 interativo, o usuário é capaz de inserir os parâmetros da experiência. . . . .	32
5.3	Vista lateral da IH. Componentes: 1. Aquecedor; 2. <i>Coolers</i> ; 3. Sensores de temperatura; 4. Eletroválvulas (ingresso de gases $CO_2$ ou $N_2$ ); 5. Lâmpada UV; 6. Garrafas de cultivo; 7. Lamina de acrílico; 8. Filtro de ar; 9. Ingresso de ar. . . . .	33
5.4	Partes do código criado para o controle e manipulação da IH no Software Arduino Mega . . . . .	35
5.5	Camara Neubauer, instrumento típico para uso em Ciências Biológicas. . . . .	36
5.6	O gráfico mostra uma melhora que depende do tempo de abertura da válvula de gás $CO_2$ . . . . .	39

5.7	Placa para cultivo celular de 6 poços. . . . .	43
5.8	Esquema de placas e meio de cultivo celular. (a) Placa de 6 poços inserido na IH, (b)placa de 2 poços inserido na IC, são as amostras controles das células. . . . .	43
5.9	A área sob as linhas representam as áreas dos metabolitos identificados nos espectros de RMN . . . . .	45
5.10	Após da obtenção das áreas sob a linha dos espectros se pode construir a matriz multivariada. . . . .	45
6.1	Espectro de RMN das amostras não pré-condicionados, metabólitos identificados no intervalo de 0-8 ppm . . . . .	49
6.2	Espectro de RMN das amostras pré-condicionadas, metabólitos identificados no intervalo de 0-8 ppm . . . . .	50
6.3	Comparação dos diferentes espectros, NPC e PC, linhas de cor azul representam os espectros de ressonância das amostras PC e de cor preta são os espectros NPC. . . . .	51
6.4	Metabólitos identificados no espectro de RMN de meio de cultivo não pré-condicionado . . . . .	53
6.5	Metabólitos identificados no espectro de RMN de meio de cultivo pré-condicionado . . . . .	53
6.6	Avaliação de dois grupos de amostras de diferentes origens, as amostras de cor vermelha ( $\Delta$ ) são de origem IC e as amostras de cor preta (+) são de origem IH. Foram avaliadas 2 combinações de componentes, comp. 1 vs. comp. 2 e comp. 1 vs. comp. 3. Os valores entre parênteses representam a contribuição de cada componente para explicar o modelo gerado. . . . .	56
6.7	Metabólitos identificados como possíveis classificadores de grupo. Os valores de 0 e 1, representam os grupos avaliados, nesse caso 0 é IH e 1 IC, a escala de cores representa a concentração nos grupos. . . . .	57
6.8	Grafico de <i>scores</i> para os grupos pré-condicionados (grupo PC, 0) e não pré-condicionados (grupo NPC, 1). . . . .	59
6.9	Metabólitos identificados como possíveis classificadores de grupo, grupo PC (0) e NPC (1). . . . .	60
6.10	Grupos comparados após 48h, 0 representa ao grupo IC e 1 representa ao grupo IH. . . . .	62
6.11	Grupos comparados após 96h de desenvolvimento celular, 0 representa ao grupo IC e 1 representa ao grupo IH. . . . .	63

6.12	Metabólitos identificados como possíveis classificadores de grupo IH vs IC após 48h. 0 e 1 representa IC e IH respectivamente. . . . .	64
6.13	Metabólitos identificados como possíveis classificadores de grupo IH vs IC após 96h. 0 e 1 representa IC e IH respectivamente. . . . .	64
6.14	Grupos comparados IC48h vs IC96h. 0 representa o grupo IC48h e 1 representa IC96h. . . . .	66
6.15	Grupos comparados IH48h vs IH96h. 0 representa o grupo IH48h e 1 representa IH96h. . . . .	66
6.16	Metabólitos identificados como possíveis classificadores de grupo. 0 e 1 representam aos grupos IC48h e IC96h respectivamente. . . . .	67
6.17	Metabólitos identificados como possíveis classificadores de grupo. 0 e 1 representam aos grupos IH48h e IH96h respectivamente. . . . .	67
6.18	Grupo PC 48h (0) e grupo PC 96h (1). . . . .	69
6.19	Metabólitos identificados como possíveis classificadores de grupo. 0 representa a PC48 e 1 representa a PC96. . . . .	70
6.20	Grupos NPC vs PC nas primeiras 48 horas de atividade celular, 0 representa NPC e 1 representa PC, mais de 60% da covariância explicada pelas duas componentes 1 e 2. . . . .	71
6.21	Grupos NPC vs PC nas últimas 48 horas de atividade celular (96h no total), 0 representa NPC e 1 representa PC, mais de 50% da covariância explicada pelas duas componentes 1 e 2. . . . .	72
6.22	Metabólitos identificados como possíveis classificadores de grupo NPC (0) vs PC (1) nas primeiras 48h de atividade celular . . . . .	73
6.23	Metabólitos identificados como possíveis classificadores de grupo NPC (0) vs PC (1) nas últimas 48h de atividade celular. . . . .	73
6.24	Classificação resultante de metabólitos gerados após da análise estatística, ilustrada por meio de conceitos de espaço topológico. . . . .	77
6.25	Classificação resultante de metabólitos gerados após da análise estatística, ilustrada por meio de conceitos de espaço topológico. . . . .	77
6.26	Gráfico de da variação de taxas percentuais para uma melhor observação nos diferentes metabólitos encontrados no meio de cultura após do análise multivariada e univariada. . . . .	78

7.1	Destino da cadeia carbônica dos aminoácidos, que foram reunidos em seis grupos (1 a 6), de acordo com o composto formado. Figura e legenda extraídas do livro <i>Bioquímica Básica</i> de Anita Marzzoco e Bayardo Baptista Torres. . . . .	84
7.2	Mapa simplificado de parte do metabolismo de carboidratos, lipídios, e proteínas. As setas indicam, em alguns casos, reações e, em outros, etapas de vias metabólicas compostas por várias reações. As reações ou etapas irreversíveis estão assinaladas em vermelho. Figura e legenda extraídas do livro <i>Bioquímica Básica</i> de Anita Marzzoco e Bayardo Baptista Torres. . .	87
C.1	Diferentes equipamentos para a realização deste trabalho, os quais podem ser encontrados no <i>LabM<sup>2</sup></i> -IFUSP. . . . .	102

# Sumário

<b>Resumo</b>	<b>v</b>
<b>Abstract</b>	<b>vii</b>
<b>Lista de Tabelas</b>	<b>ix</b>
<b>Lista de Figuras</b>	<b>xi</b>
<b>1 Introdução</b>	<b>1</b>
1.1 Objetivos . . . . .	4
<b>2 Ciências Ômicas e Ressonância Magnética Nuclear</b>	<b>5</b>
2.1 Ciências Ômicas . . . . .	5
2.1.1 Genômica . . . . .	5
2.1.2 Transcriptômica . . . . .	6
2.1.3 Proteômica . . . . .	7
2.1.4 Metabolômica . . . . .	8
2.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear . . . . .	9
<b>3 Bases Físicas da Espectroscopia de RMN</b>	<b>11</b>
3.1 Spin Nuclear . . . . .	11
3.1.1 Estados de spin nuclear . . . . .	11
3.2 Momento magnético nuclear . . . . .	13
3.3 Magnetização em Equilíbrio . . . . .	16
3.4 Pulso ou campo de radiofrequência (RF) . . . . .	16
3.5 Tempos de Relaxação . . . . .	17
3.5.1 Relaxação Transversal . . . . .	17
3.5.2 Relaxação longitudinal . . . . .	18

3.6	Transformada de Fourier . . . . .	18
3.7	Interações em RMN . . . . .	21
3.7.1	Interação Zeeman Nuclear . . . . .	21
3.7.2	Interação dos sistemas de spins com os campos de RF . . . . .	22
3.7.3	Interação spin - spin . . . . .	22
3.7.4	Interação de deslocamento químico . . . . .	23
<b>4</b>	<b>Análise Estatística</b>	<b>26</b>
4.1	Partial Least Squares - Discriminant Analysis . . . . .	26
4.2	Test-t ou Test de Student . . . . .	28
<b>5</b>	<b>Métodos e Materiais</b>	<b>31</b>
5.1	Construção da Incubadora Hipoxia . . . . .	31
5.2	Calibração da Incubadora Hipóxia . . . . .	35
5.3	Experiência com cardiomiócitos . . . . .	39
5.3.1	Condição Normóxia . . . . .	39
5.3.2	Condição Hipóxia . . . . .	39
5.3.3	Condição Normóxia-Hipóxia . . . . .	40
5.3.4	Cultivo Celular realizado com Cardiomiócitos . . . . .	40
5.3.5	Coleta de Células e meio de Cultura . . . . .	42
5.3.6	Experiências de Ressonância Magnética Nuclear . . . . .	43
5.3.7	Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) . . . . .	46
<b>6</b>	<b>Resultados</b>	<b>47</b>
6.1	Contagem de cardiomiócitos . . . . .	47
6.2	Ressonância Magnética Nuclear . . . . .	48
6.2.1	Espectros de ressonância de Células - Experiência NPC e PC . . . . .	49
6.2.2	Espectros de ressonância de meios de cultura - Experiência NPC e NP . . . . .	52
6.3	Análise Estatística PLS-DA . . . . .	54
6.3.1	Análise Multivariada PLS-DA Condição Normóxia . . . . .	55
6.3.2	Análise Multivariada PLS-DA Condição Hipóxia-Normóxia . . . . .	59
6.3.3	Análise Multivariada PLS-DA para Meios de Cultura . . . . .	61
6.3.3.1	Primeiro Caso: Condição Normóxia . . . . .	62

6.3.3.2	Segundo Caso: Condição Pré-condicionamento Dinâmico .	69
6.3.3.3	Terceiro Caso: Condição Pré-condicionamento Persistente	71
<b>7</b>	<b>Discussões</b>	<b>79</b>
7.1	Discussões de Resultados . . . . .	79
<b>8</b>	<b>Conclusões</b>	<b>90</b>
	<b>Referências bibliográficas</b>	<b>92</b>
<b>A</b>	<b>Protocolos de cultivo celular</b>	<b>96</b>
A.1	Protocolo de descongelamento celular . . . . .	96
A.2	Protocolo de sub-cultivo celular . . . . .	97
<b>B</b>	<b>Matriz multivariada - meios de cultura</b>	<b>99</b>
<b>C</b>	<b>Equipamentos</b>	<b>101</b>

# Capítulo 1

## Introdução

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) mais do 20% do total de mortalidade no mundo a cada ano é causada pelo câncer. A OMS prevê que a incidência de câncer aumentará 100% dentro dos primeiros 20 anos do Séc. XXI, principalmente nos países em desenvolvimento [1].

No Brasil, dados epidemiológicos apresentados pelo Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) apontam o câncer como a terceira maior causa de morte no país, perdendo apenas para as doenças cardiovasculares, que apresentam 27% do total. Em média o câncer é responsável por mais de 100.000 óbitos por ano [2].

O crescimento celular anormal de todo e qualquer tecido humano e em qualquer faixa etária, definido como tumor [3], adquire heterogeneidade e instabilidade genética e quando este é detectado clinicamente pelo médico, é possível que amostras de células cancerígenas sejam resistentes aos tratamentos ou medicamentos devido a propriedades físicas e químicas adquiridas por seus genes, que dificultam uma ação eficaz e imediata de tratamentos como a intervenção cirúrgica, quimioterapia e radioterapia.

A literatura médica reconhece que quanto mais avançado for o estágio em que se encontra a doença, menor é a probabilidade de se obter uma recuperação completa do paciente. As resistências a drogas quimioterápicas e os potenciais efeitos colaterais associados ao coração, são algumas consequências, as quais reduzem as chances de sucesso de um tratamento médico convencional. Tais efeitos são denominados pela *Cardiac Review and Evaluation Committee* como "cardiomiopatias" (CMP, *cardiomyopathy*). Sintomas como falha cardíaca (taquicardia), arritmias, isquemia coronária, hipertensão ou hipotensão



costumam ser atribuídas a CMP. Por exemplo, a classe de medicamentos das antraciclina (doxorrubicina) são agentes causadores de CMP em pacientes com câncer de mama, causando danos celulares irreversíveis ao músculo cardíaco relacionados a ministração cumulativa da droga [4].

O estudo de estratégias que possibilitem minimizar os efeitos que levam a CMP têm despertado interesse na comunidade científica que desenvolve estudos clínicos, onde pesquisadores buscam constantemente formas otimizadas para tratamentos com quimioterápicos combinados [4] efetivos para o combate do câncer. O pré-condicionamento (PC) celular é uma das alternativas, segundo pesquisadores do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP), como sendo um modo potencial para minimização da CMP induzida pela doxorrubicina.

Conhecer os efeitos sobre o metabolismo, em uma primeira etapa a nível celular, devido ao PC pode produzir informações importantes para entender a dinâmica da resposta de recuperação das células quando estas são submetidas às condições tóxicas causadas pela doxorrubicina. Tais informações podem, por exemplo, fornecer pistas que permitam identificar e caracterizar partes específicas do metabolismo ("vias metabólicas") modificadas durante o PC celular.

Podemos encontrar diversas outras pesquisas relacionadas ao PC que, como será discutido em maiores detalhes mais adiante, resume-se em ciclos de hipóxia-normóxia. Por exemplo, o estudo sobre a eficiência terapêutica das células-tronco mesenquimais, do inglês *Mesenchymal Stem Cells* (MSC), na fibrose renal em ratos. Resultados mostram que as MSC com condicionamento hipóxico de 1% de  $O_2$  diminuiu a fibrose renal e a inflamação de forma significativa, em comparação das MSC de 21% de  $O_2$  [5]. As MSC se utilizam com fins regenerativos, a hipoxia pode ser útil para melhorar as propriedades das MSC para o tratamento de transtornos neurodegenerativos e nos casos que se necessite neuro-regeneração [6]. Existem estudos sobre células neuronais que demonstram que o PC pode atenuar a perda neuronal no córtex cerebral depois de um traumatismo craniano [7]. Em outro estudo, demonstrou-se que o PC pode ajudar a reduzir a sobrecarga hospitalar nos centros de saúde, atenuando a lesão pulmonar após uma lobectomia toracoscópica em pacientes com câncer de pulmão, melhorando a oxigenação pós-operatória, recuperação da função pulmonar e reduzindo a necessidade de internação dos pacientes [8].

A hipóxia pode-se combinar com outros parâmetros físicos ou químicos, tais como:

pressão, temperatura, acidez, etc. Como demonstra um estudo realizado com PC hipóxico e acidez (pH), a exposição direta da linhagem celular do gânglio da raiz dorsal (DRG), a hipóxia e acidose aumentam a resposta do cálcio espontânea e estimulada por bradiquina, em comparação com cultivos em pH neutro e em normóxia [9]. Outro estudo do PC hipóxico hipobárico mostra que o processo regula o metabolismo do ferro em ratos através da eritropoiese que extrai ferro sistematicamente do tecido hematopoiético através da diminuição dos níveis de hepzidina [10].

Dentre as diversas formas de estudar o metabolismo celular, as ciências ômicas se apresentam com grande capacidade de gerar resultados que decifrem o comportamento do metabolismo, sendo a Genômica, Tanscriptômica, Proteômica e a Metabolômica as principais, que serão brevemente descritas no próximo capítulo. A Metabolômica corresponde a uma metodologia de pesquisa bem estabelecida e utilizada [11]. A Metabolômica tem como objetivo detectar, quantificar e elucidar o perfil dos metabólitos os quais se caracterizam por uma grande diversidade físico-químico nas suas composições moleculares. O método engloba uma análise compreensiva e sistemática do perfil dos níveis de metabólitos provocadas por efeitos tais como dieta, estilo de vida, ambiente, genética e farmacêutica [11]. A grande quantidade de dados que se gera ao analisar as moléculas por meio da Metabolômica é obtida por meio de ferramentas de análise espectroscópica como a Ressonância Magnética Nuclear (RMN) ou Espectroscopia de Massas (MS) cada uma com suas vantagens e desvantagens, Por exemplo, a RMN gera resultados altamente reprodutíveis, exige mínima preparação de amostra, não é do tipo destrutiva, e apresenta curtos tempos de aquisição de sinais, porém apresenta baixa sensibilidade (da ordem 100uM). A MS apresenta alta sensibilidade e informação estrutural, porém, aplicável apenas a compostos termicamente estáveis.

Neste projeto será utilizada a 1H-ERM (Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de prótons) com alta resolução (400 MHz) em estado líquido, para gerar linhas espectrais que refletem os níveis dos metabólitos além de ferramentas estatísticas de análise multivariada para reconhecimento de padrões (PCA, *Principal Components Analysis*; PLS-DA, *Partial Least Square-Discriminant Analysis*) e análise univariada para a seleção de resultados estatisticamente significantes (ANOVA, *Analysis of Variance*).

## 1.1 Objetivos

Como primeiro objetivo deste projeto, foi construir uma incubadora encarregada de fazer o pré-condicionamento celular, porém também pode funcionar como incubadora normal (Normóxia) ou Não Pré-Condicionado (NPC). A incubadora é capaz de reproduzir condições análogas a uma incubadora comercial (reprodução de células) e a outros tipos de incubadoras mais especializadas e, conseqüentemente, mais caras, mas que são capazes de efetuar o Pré-condicionamento (ciclos de hipóxia e normóxia). Desta forma, atuando entre os modos de pré-condicionamento e normal, foi possível (1) medir a eficiência da incubadora, realizando provas ou testes de reprodutibilidade e (2) obter um produto final, construído a baixo custo, que pode ser utilizado em laboratórios para o cultivo regular de células ou mesmo em pesquisas onde há necessidade de aplicar o pré-condicionamento celular. Estes procedimentos serão explicados no capítulo de métodos e materiais.

O segundo objetivo, foi estudar as alterações nos processos desencadeadas pelo pré-condicionamento nas células cardíacas ou cardiomiócitos (CMs) de rato neonato WT (*wild type*) utilizando metabolômica e 1H-ERM. Com respeito ao processo de pré-condicionamento celular, inicialmente foram realizados testes com outras células (RASM, *Rabbit Aorta Smooth Muscle*) a fim de calibrar e controlar o funcionamento adequado da incubadora (estabilidade da temperatura, controle de injeção dos gases CO<sub>2</sub> e N<sub>2</sub>, níveis adequados de pH, vazamentos e esterilização de gases internos, entre outros fatores), avaliando a viabilidade destas células já que estas apresentam boa resistência a ambientes menos adequados a sobrevivência uma vez que cardiomiócitos são células frágeis e que não se proliferam em cultura. Após os testes com as células RASM, foi obtido um conjunto de parâmetros experimentais tomados como ponto inicial para induzir o pré-condicionamento nos cardiomiócitos.

## Capítulo 2

# Ciências Ômicas e Ressonância Magnética Nuclear

### 2.1 Ciências Ômicas

O termo "Ômica" é um neologismo que provem do inglês *Omic* que em biologia molecular utiliza-se como sufixo para referir-se ao estudo da totalidade ou subconjunto de algo, como genes, organismos de um ecossistema, proteínas ou a relação entre eles. Nos anos 1980 o termo "ômica" foi utilizado para referir-se ao estudo de um conjunto de moléculas, por exemplo, **Genômica** se refere ao estudo de muitos genes no ADN; **Transcriptômica**, é o estudo de muitos transcritos ou ARNm; **Proteômica**, é o estudo de muitas proteínas; **Metabolômica**, é o estudo de muitos metabolitos [12]. Estas são as principais ômicas desenvolvidas nos últimos anos, porém, cada uma delas foi ramificando-se a medida que vão obtendo-se um maior número de dados. Todas elas aportam grandes avanços no conhecimento básico dos temas biológicos, além, de trazer consigo um enorme desenvolvimento no campo de análises da funcionalidade celular e na suas aplicações biotecnológicas [13].

#### 2.1.1 Genômica

A primeira das ômicas a criar-se, esta ciência está baseada no estudo do genoma ou ADN. Anteriormente a limitação tecnológica só permitia estudar poucos genes assim como suas mudanças ou mutações. No princípio do século XXI se deu a conhecer a sequência

completa do genoma humano [14] com o qual decifrou-se a ordem de todos os nucleótidos contidos no ADN do ser humano.

A genômica tem dois campos de estudo principais: a genômica estrutural orientada a caracterização e localização das sequências que conformam o ADN, que permite ter a obtenção de mapas genéticos dos organismos, e a genômica funcional orientada a coleta sistemática de informação acerca das funções desempenhadas pelos genes. Ambos os ramos permitem ir mais além da simples descrição de um só gene, já que permitem conhecer as variações do genoma a diferentes níveis: expressão de ARNs mensageiros, função de proteínas, produção de metabólitos bem como as interações físicas que cada um destes componentes celulares estabelecem para formar as redes que compõem um sistema biológico [15].

Em termos gerais, a genômica tende a explicar a origem de um fenótipo determinado a partir dos câmbios gerados em quaisquer níveis.

### 2.1.2 Transcriptômica

Ômica que encarrega-se de estudar a expressão dos transcritos provenientes de diferentes genes (ARNr, ARNt, ARNm, ARNi, miARN) que existem na célula, tecido ou órgão. O ARNm é específico em cada célula e das condições fisiopatológicas em determinado momento, por exemplo, o ARNm extraído de células do músculo será diferente às células do fígado antes e depois de comer.

As metodologias que se utilizam para analisar o ARNm são: **microarranjos** e **sequenciação do ARN (ARNseq)**. Microarranjos consistem em hibridizar o ARNm de um determinado tecido a sequências de genes previamente conhecidos que encontram-se unidos a um microarranjo, e dessa forma poder fazer comparações entre casos controles ou simplesmente ver que genes se expressam majoritariamente em algumas condições, porém, o ARNseq consiste em sequenciar todos os transcritos presentes nessas condições, tendo como consequência encontrar novos transcritos que não se conheciam anteriormente e novos genes envolvidos, por exemplo, em uma enfermidade [16].

Atualmente, uma das aplicações da transcriptômica é a análise da expressão de genes implicados em diferentes tipos de canceres. uma destas aplicações tem lugar no México onde utiliza-se o microarranjo *Oncotype RX*, que mede a expressão de 21 genes envolvidos

no câncer de mama, melhorando desta forma na tomada de decisões do tratamento por parte profissional da área médica [17].

### 2.1.3 Proteômica

Encarrega-se de estudar as proteínas presentes em uma amostra. Estas são partes importantes dos seres vivos porque são as componentes principais dos mecanismos metabólicos das células.

Proteínas existem em maior quantidade que os genes que a determinam, já que um só gene pode codificar diferentes versões de uma proteína, que inclusive podem ter uma função diferente. Por exemplo, o genoma humano tem uns 25000 genes, sua expressão gera ao menos umas 500000 proteínas diferentes devido a mecanismos como o *splicing* e a modificações pós-traducionais.

A metodologia para estudar proteômica consiste em: 1. separar as proteínas por técnicas cromatográficas; 2. digerir as proteínas; 3. detectar os fragmentos peptídeos por espectroscopia de massas e 4. identificar as proteínas [16]

Na área clínica, atualmente utiliza-se a proteômica para: a. identificação de uma proteína em uma amostra biológica; b. identificação de um perfil de proteínas comparando amostras entre casos e controles; c. determinação da interação entre diversas proteínas e sua rede funcional; e d. identificação das modificações pos-transcripcionais [18]. Desta forma pode-se encontrar biomarcadores (proteínas) que possam servir para diagnosticar doenças, com o fim de dar um tratamento melhor para o paciente.

Com o esforço e união de muitos cientistas foi elaborado o Projeto de Proteoma Humano, que fornece uma lista de proteínas que encontram-se em diferentes tipos celulares e órgãos de adultos ou de fetos. Estes dados aportam umas 30000 proteínas identificadas no humano [19].

A proteômica pode ser utilizada para o estudo de doenças como câncer, diabetes, obesidade entre outros, por exemplo, dentro do âmbito da reprodução assistida a proteômica é de grande interesse para analisar os gametos (óvulos e espermatozoides) e identificar proteínas que possam ser utilizadas como biomarcadores para poder selecionar e aumentar a taxa de êxito da reprodução assistida [18].

## 2.1.4 Metabolômica

Os metabolitos são aquelas moléculas que participam como substratos intermediários ou produtos nas reações químicas do metabolismo. O metabolismo é o conjunto de reações químicas, organizadas em vias metabólicas que são sequências de reações enzimáticas. Estes complexos processos inter-relacionados são a base da vida na escala molecular que permitem as diversas atividades na célula: crescer, reproduzir, manter suas estruturas e responder a estímulos. Na antiguidade a ideia que os fluidos biológicos refletiam a saúde das pessoas existiu durante muito tempo; na idade média, utilizava-se "tabelas de urina" para associar as cores, sabores e cheiros da urina a diferentes condições médicas, que são de origem metabólica [20]. Ao final da década 40 foi Roger Williams que introduziu o conceito de "perfil metabólico" que poderia estar conectado com a constituição de seus fluidos biológicos [21].

Horning e seus colaboradores com o trabalho sobre a cromatografia de gases-espectrometria de massa (CG-EM) introduziram o termo "perfil metabólico" no ano 1971, quando demonstraram que a técnica poderia ser utilizada para medir compostos presentes na urina e tecidos humanos [22]. Ao longo dos anos 70 o grupo de Horning foi encarregado para o desenvolvimento do método CG-EM para monitorar os metabolitos presentes na urina.

A metabolômica está fortemente ligada ao desenvolvimento da espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) que é uma técnica não destrutiva, descoberta nos anos 40 e que foi se desenvolvendo rapidamente. Em 1974 Seeley, *et al*, demonstraram a utilidade de utilizar a espectroscopia RMN para detectar metabolitos em amostras biológicas inalteradas [23]. Atualmente o uso da técnica é importante para as investigações no campo da metabolômica.

No ano 2005, a primeira base de dados de metabólomica para a caracterização de metabolitos humanos, METLIN: *A Metabolite Mass Spectral Database* [24], desenvolvido no laboratório *Siuздak Scripps Research Institute*, continha mais de 10,000 metabolitos e dados de espectros de masa. Na atualidade conta com mais de 60,000 metabolitos, sendo o maior repositório de dados de espectros de massa no campo da metabolômica.

Estudos de metabolômica em obesidade e diabetes tem logrado avanços no conhecimento da concentração de certos metabolitos em soro e urina que podem ter um maior risco de desenvolver as referidas doenças. Estes metabolitos incluem vários aminoácidos,

lípidos, hidratos de carbono e ácidos nucleicos. Em condições de obesidade a concentração de alguns aminoácidos, especialmente os de cadeias ramificadas (isoleucina, leucina e valina) está elevada [25]. A obesidade também caracterizada pela presença elevada de ácidos graxos livres em soro. Conforme demonstrado pelos estudos de metabolômica, apresenta a concentração de ácido oleico, palmítico, palmitoleico e esteárico elevada, enquanto, a concentração de etanolamina e lisofosfatidiletanolamina encontra-se diminuída em organismos obesos [25]. Em resumo, o conjunto de metabolitos associados à obesidade e diabetes podem fornecer informação valiosa sobre as vias metabólicas alteradas durante o desenvolvimento destas doenças.

## 2.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

A Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) descrita pela primeira vez no ano 1938 por Rabi, *et al* e 8 anos depois estudada também por Bloch, *et al* [26] em líquidos e Purcell, *et al* em sólidos [27].

A RMN representa uma técnica com grande capacidade de análise estrutural dinâmica e analítica. A princípio na década de 1950, se comercializaram os primeiros espectrômetros para a obtenção de espectros de prótons, após descobrimento em 1945 do fenômeno da ressonância. Esse fenômeno sugere que os núcleos atômicos submetidos a um campo magnético externo podem absorber radiação eletromagnética na ordem de radiofrequências, como a frequência exata dessa absorção depende do entorno químico dos núcleos, o espectro de sinais de absorção revela uma valiosa informação de natureza analítica.

Em 1970, Seeley, *et al* [23]. demonstraram a utilidade da ressonância magnética nuclear para detectar metabólitos em amostras biológicas inalteradas. Esse primeiro estudo em músculo destacou o valor dessa técnica, ao revelar que 90% de trifosfato de adenosina (ATP) celular está complementado com magnésio.

Jeremy K. Nicholson e Elaine Holmes no *Birkbeck College e Imperial College London* lideraram esforços no uso de RMN para aplicações em Metabolômica. Em 1984, Nicholson mostrou que a espectroscopia de RMN podia ser usada para o diagnóstico da diabetes [28].

Além de existir a RMN do próton, existem diversas aplicações de RMN como espectros-



copia RMN de  $^{13}\text{C}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^7\text{Li}$ ,  $^{29}\text{Si}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$ ,  $^{15}\text{N}$ , espectroscopia RMN bi-dimensional, RMN de tempos de relaxação e formas de linha em baixa ou alta resolução, dentre outras. Na década dos anos 1990 se obteve campos magnéticos mais altos, obtendo progressivamente os 600, 700, 800 e 900MHz como frequências de ressonância de próton utilizadas como referências dos campos magnéticos obtidos. Porém a baixa sensibilidade inerente na espectroscopia de RMN segue constituindo sua principal limitação [29] e, por essa razão o desenvolvimento de campos mais altos prossegue com dificuldade, entretanto, após de uma década cientistas conseguiram a instalação do primeiro espectrômetro comercial de 1GHz em Lyon, França [29]. A procura de outros caminhos para incrementar a sensibilidade ou para reduzir o tempo de medida ainda está em progresso.

# Capítulo 3

## Bases Físicas da Espectroscopia de RMN

### 3.1 Spin Nuclear

Propriedade física das partículas elementares que associa momento angular intrínseco de valor quantizado. Um dos postulados da Mecânica Quântica estabelece que o momento angular de uma partícula não pode assumir qualquer valor, princípio este conhecido como a quantização do momento angular, que conduz que os valores de energia também sejam quantizados [30]. A grandeza do momento angular pode ser expressa em termos de um número quântico: *número quântico de momento angular* representa-se pela letra  $I$ , valores que só podem ser múltiplos de  $\frac{1}{2}$  ( $I = \frac{n}{2}; n = 1, 2, 3, \dots$ ).

#### 3.1.1 Estados de spin nuclear

O momento angular de spin nuclear é uma propriedade vectorial que pode ser definida em termos de do número quântico de spin  $I$ .

$$a = \sqrt{I(I + 1)}\hbar$$

$\hbar$ : constante reduzida de planck

$a$ : tem unidades de  $Jrad^{-1}s$

Não só a grandeza do momento angular de spin esta quantizada. No eixo  $z$ , só determinadas componentes  $a_z$  são permitidas de acordo com os princípios da mecânica quântica

[30].

$$a_z = m_I \hbar$$

Onde:  $m_I = -I, -I + 1, \dots, +I$ . Por exemplo para um valor de  $I = \frac{1}{2}$  o número quântico direcional  $m_I$  pode ser  $-\frac{1}{2}$  e  $+\frac{1}{2}$ , para  $I = 1$ , é  $m_I = -1; 0; +1$ , a representação gráfica para esse exemplo é mostrado na seguinte figura.

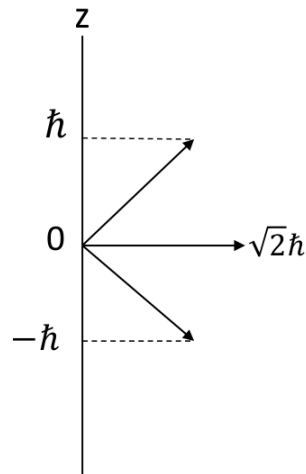


Figura 3.1: Quantização da componente  $z$ , momento angular de spin nuclear para  $I = 1$  [30].

A cada um dos  $2I + 1$  valores  $m_I$  corresponde uma função de onda de spin  $\psi$ . Estas funções de onda são próprias do operador quântico  $\hat{a}_z$  [30].

$$\hat{a}_z |\psi_i\rangle = m_I \hbar |\psi_i\rangle$$

O valor esperado ou expectância, da componente  $\hat{a}_z$  é dado por

$$\begin{aligned} a_z &= \langle \psi_i | \hat{a}_z | \psi_i \rangle \\ &= m_I \hbar \langle \psi_i | \psi_i \rangle \\ &= m_I \hbar \end{aligned}$$

Se o valor de  $\psi_i$  estiver normalizada ( $\langle \psi_i | \psi_i \rangle = 1$ ), para  $I = \frac{1}{2}$  temos duas funções de spin  $\alpha$  e  $\beta$

$$\langle \alpha | \hat{a}_z | \alpha \rangle = +\frac{1}{2} \hbar$$

$$\langle \beta | \hat{a}_z | \beta \rangle = -\frac{1}{2} \hbar$$

e graficamente

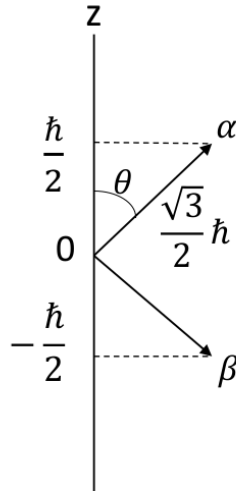


Figura 3.2: Quantização da componente z, projeções dos estados  $\alpha$  e  $\beta$  para  $I = \frac{1}{2}$  [30].

## 3.2 Momento magnético nuclear

Na ausência de campo magnético os estados de spin magnético estão desorientados, porém quando é aplicado um campo magnético de alta intensidade e homogêneo esses estados tendem a orientar-se paralelamente e anti-paralelamente ao campo magnético aplicado [31]. O momento magnético nuclear  $\boldsymbol{\mu}$  é proporcional ao momento angular de spin  $\boldsymbol{a}$

$$\boldsymbol{\mu} = \gamma \boldsymbol{a}$$

$$\mu_z = \gamma a_z$$

$\gamma$ : razão giromagnética, constante que depende do núcleo, que pode ser expressa em termos de  $g_N$ , uma constante adimensional positiva ou negativa e  $\mu_N = \frac{e\hbar}{2M}$ , chamado magnetão nuclear onde  $e$  é a carga e  $M$ , é a massa de próton respectivamente.

$$\gamma = \frac{g_N \mu_N}{\hbar}$$

Nessas condições são criados diferentes estados ou níveis de energia que dependem do campo magnético  $B_0$  aplicado na direção z. O hamiltoniano  $\boldsymbol{H}$  para a interação do

campo com o momento magnético é descrito através da equação

$$\begin{aligned}\mathbf{H} &= -\mu_z B_0 \\ &= -\gamma \hbar I_z B_0\end{aligned}\tag{3.1}$$

aplicando o hamiltoniano aos estados de spin ( $I, m$ )

$$\begin{aligned}\mathbf{H}|I, m\rangle &= -\gamma \hbar I_z B_0 |I, m\rangle \\ &= -\gamma \hbar B_0 m |I, m\rangle\end{aligned}\tag{3.2}$$

conseguindo assim o valor de energia dependente do autovalores  $m$

$$E_m = -m\gamma \hbar B_0\tag{3.3}$$

considerando núcleo com  $I = \frac{1}{2}$  obtemos  $m = +\frac{1}{2}$  e  $m = -\frac{1}{2}$ , então a energia do estado  $\alpha$

$$E_\alpha = -\frac{1}{2}\gamma \hbar B_0$$

a energia do estado  $\beta$

$$E_\beta = \frac{1}{2}\gamma \hbar B_0$$

a diferença de energia  $\Delta E$  para estes dois níveis será  $E_\beta - E_\alpha$

$$\Delta E = \gamma \hbar B_0\tag{3.4}$$

$E_\beta$  e  $E_\alpha$  são autovalores do operador  $\mathbf{H}$  na equação

$$\mathbf{H}|\psi\rangle = E|\psi\rangle$$

tem-se, então, o seguinte diagrama de energias

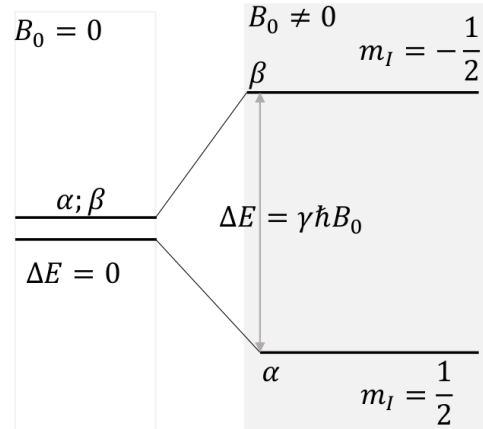


Figura 3.3: Quando o campo magnético  $B_0 = 0$  os estados  $\alpha$  e  $\beta$  não tem uma diferença de energia, porem quando o campo magnético  $B_0 \neq 0$  observamos o desdobramento de energia.

A configuração de campo magnético e momento magnético de spin produz uma precessão entorno ao eixo  $z$ , chamada precessão de larmor[31], O vetor que representa o momento magnético do próton descreve uma figura cônica

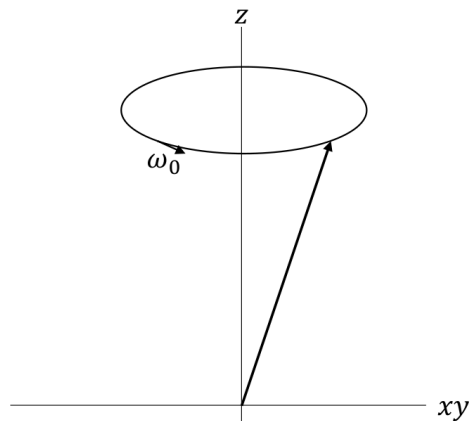


Figura 3.4: Precessão ao redor do eixo  $z$ , com frequência angular  $w_0$ .

a frequência de precessão depende do campo magnético

$$\begin{aligned} w_o &= \gamma B_0 \\ \nu &= \frac{\gamma}{2\pi} B_0 \end{aligned} \tag{3.5}$$

o valor de  $\nu$  é conhecido como a **frequência de larmor**.

### 3.3 Magnetização em Equilíbrio

Quando um sistema de spins se encontra na presença do campo magnético estático  $B_0$  todos os núcleos precessionam em torno de esse campo. Com um sistema de spins de  $N$  núcleos, com  $I = 1/2$  existem dois possíveis estados,  $\alpha$  ou  $\beta$ , onde a soma das populações entre esses estados  $N_\alpha + N_\beta = N$ , e a diferença das populações determina um momento magnético total ou Magnetização resultante  $\vec{M} = \sum \mu$  [32], descrita por uma distribuição de Boltzmann no equilíbrio térmico a temperatura  $T$  na forma da equação

$$\begin{aligned} \frac{N_\alpha}{N_\beta} &= \exp(-h\gamma B_0)/kT \\ &= \exp(-\Delta E/kT) \end{aligned} \tag{3.6}$$

esse resultado conduz a que o vetor magnetização total  $\vec{M}$  no estado de equilíbrio estará ao longo do eixo  $z$  já que os movimentos de precessão dos spins no plano transversal ao campo são independentes ( $M_{xy} = 0$ ).

### 3.4 Pulso ou campo de radiofrequência (RF)

Em estado de repouso, e na presença de um campo magnético uniforme na direção do eixo- $z$ , as componentes  $x$  e  $y$  do vetor magnetização não podem ser detectadas.

Para conseguir levar o vetor magnetização  $M$  ao plano  $xy$ , é necessário incidir um segundo campo magnético na forma pulsada ou simplesmente o campo de RF ( $B_1$ ) sobre campo magnético aplicado ( $B_0$ ), porém, o campo de RF deve cumprir algumas condições: Pulso na direção transversal do campo aplicado e deve ter a mesma frequência que a frequência de larmor [32], quando nesta situação específica, chamada condição de ressonância, o vetor de magnetização  $M$  tenderá a precessar ao redor do campo  $B_0$

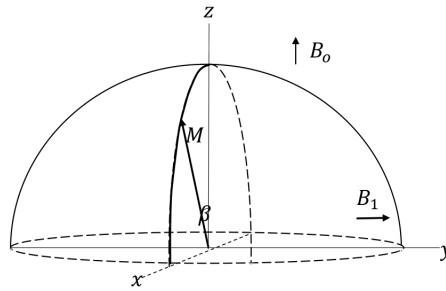


Figura 3.5: Precessão do vetor  $M$  em presença do campo de RF ( $B_1$ ).

se o campo de RF é aplicado durante um tempo  $t_p$ , o ângulo  $\beta$  que o vetor  $M$  forma com o campo estático será

$$\beta = \omega_1 t_p$$

## 3.5 Tempos de Relaxação

Quando o pulso de RF é desligado o vetor  $M$  tende a retornar à situação original de equilíbrio. Este retorno é conhecido por relaxação, que faz com que os núcleos percam o excesso de energia recebida através da RF aplicada. O decaimento da magnetização em  $x$  e  $y$  que ocorre quando  $M$  retorna à sua posição de equilíbrio de forma exponencial, origina o sinal de RMN. Este sinal recebe o nome de FID (*Free Induction Decay*).

O decaimento da magnetização nos eixos  $x$  e  $y$  denomina-se relaxação transversal enquanto o retorno da magnetização ao longo do campo magnético  $B_0$  relaxação longitudinal.

### 3.5.1 Relaxação Transversal

Como observamos, um núcleo precessiona com uma frequência proporcional ao campo magnético aplicado sobre ele, e no caso de um número grande de núcleos ( $10^{23}$ ) nas amostras em estudo, cada núcleo isolado deverá sentir um campo magnético ligeiramente diferente dos outros devido ao campo magnético gerado pelos núcleos vizinhos, deste modo cada núcleo deve precessionar com uma frequência também ligeiramente diferente de seus vizinhos.

Logo após um pulso de RF todos os núcleos estarão com a mesma orientação no plano



transversal (pulso de  $90^\circ$ ), porém devido ao fato de que cada um tem uma velocidade angular ligeiramente diferente, eles começam a separar-se, e a soma vetorial dos momentos magnéticos diminuirá. Após um certo intervalo de tempo característico  $T_2$  os núcleos terão espalhado totalmente no plano transversal e teremos uma magnetização resultante nula. Deste modo a sinal de RMN decai exponencialmente[33] na forma

$$S(t) = M_0 \cos(w_0 t) \exp(-t/T_2)$$

$M_0$  magnetização de equilíbrio

$T_2$  tempo característico de decaimento transversal, denominado tempo de relaxação transversal. Este decaimento é intrínseco do sistema de spins nucleares e sua determinação é importante para que não ocorram distorções nas formas dos sinais adquiridos.

### 3.5.2 Relaxação longitudinal

O retorno completo ao equilíbrio exige que a componente longitudinal  $M_z$  volte ao valor  $M_0$ . Os spins devem se livrar da energia recebida pelo pulso de RF cedendo-a à rede. Este retorno também ocorre na forma exponencial

$$M_z(t) = M_0 [1 - \exp(-t/T_1)]$$

$T_1$  tempo de relaxação longitudinal (ou spin rede);  $T_1$  e  $T_2$  são diferentes para cada tipo de núcleo (1H, 13C, 19F, 7Li, 31P, etc). Apesar deste processo de relaxação não induzir sinal nos detectores, ele pode ser caracterizado através de algumas experiências específicas de RMN. Sua determinação é importante para que não ocorram distorções nas amplitudes dos sinais adquiridos [33].

## 3.6 Transformada de Fourier

A transformada de Fourier (TF) é um conceito matemático usado na RMN que permite levar o sinal FID do domínio de tempo ao domínio de frequência [34]. Esta técnica é atualmente usada nos espectrômetros permite diminuir drasticamente o tempo que se requiere adquirir uma acumulação (scan) do espectro completo de RMN na forma pulsada

comparativamente a forma de onda contínua.

Em termos matemáticos a transformada de fourier se define como a integral

$$f(w) = \int_{-\infty}^{\infty} f(t)e^{-iwt} dt \quad (3.7)$$

Observamos que a equação 3.7 possibilita ir do espaço de tempo  $t$  para o espaço de frequência  $w$ , tornando possível obter o espectro de RMN composto por diferentes frequências que podem ser analisadas isoladamente.

Pode-se demonstrar que a função  $f(w)$  tem inversa, isto é, que dada uma  $f(w)$  podemos calcular  $f(t)$ . A expressão de dita transformada é

$$f(t) = \int_{-\infty}^{\infty} f(w)e^{-iwt} dw \quad (3.8)$$

essas duas funções  $f(w)$  e  $f(t)$  são denominadas **par de transformadas de fourier** [34].

É importante indicar que as funções que definem o espectro de RMN são funções complexas com parte real e parte imaginária, assim pois  $f(w)$  poderá ser expressa de forma geral como  $f(w) = \Re(w) + i\Im(w)$ , onde  $\Re(w)$  denota a parte real e  $\Im(w)$  a parte imaginária, entretanto, costuma-se a analisar somente a componente real por se tratar da parte absorptiva do espectro onde a área é diferente de zero, proporcional a quantidade de spins nucleares que compõem a magnetização.

Como qualquer número complexo para cada valor de  $w$ ,  $f(w)$  pode-se expressar em termos de seu módulo e ângulo de fase, ou seja,  $f(w)$  também pode ser expressa como  $f(w) = |f(w)|e^{i\phi(w)}$ , onde  $|f(w)|^2 = \Re^2(w) + \Im^2(w)$  e  $\phi(w) = \tan^{-1} \frac{\Im(w)}{\Re(w)}$ . Então a função  $|f(w)|$  denomina-se espectro de fourier do sinal  $f(t)$ , e o quadrado da função  $|f(w)|^2$  denomina-se espectro de potências de  $f(t)$  [34].

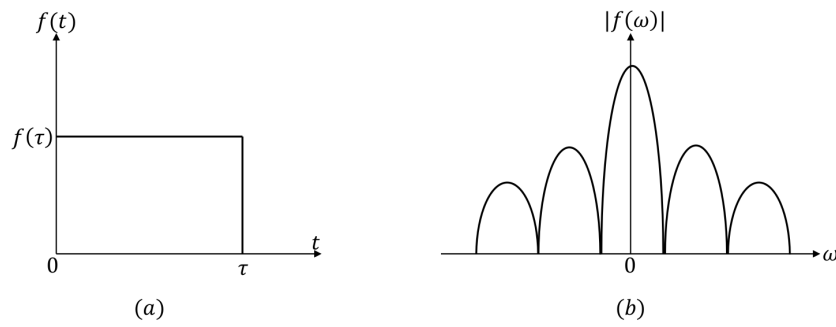


Figura 3.6: Exemplo (a) simples de uma função  $f(t)$  no espaço de tempo ( $t$ ) e (b) sua respectiva transformada de fourier no espaço de frequência ( $\omega$ )

Para extrair a informação dos sinais FIDs, é necessário utilizar o método da TF. Se a amostra for composta por diferentes moléculas, cada uma terá uma resposta em frequência e obteremos FIDs também diferentes, conforme ilustrado na figura abaixo.

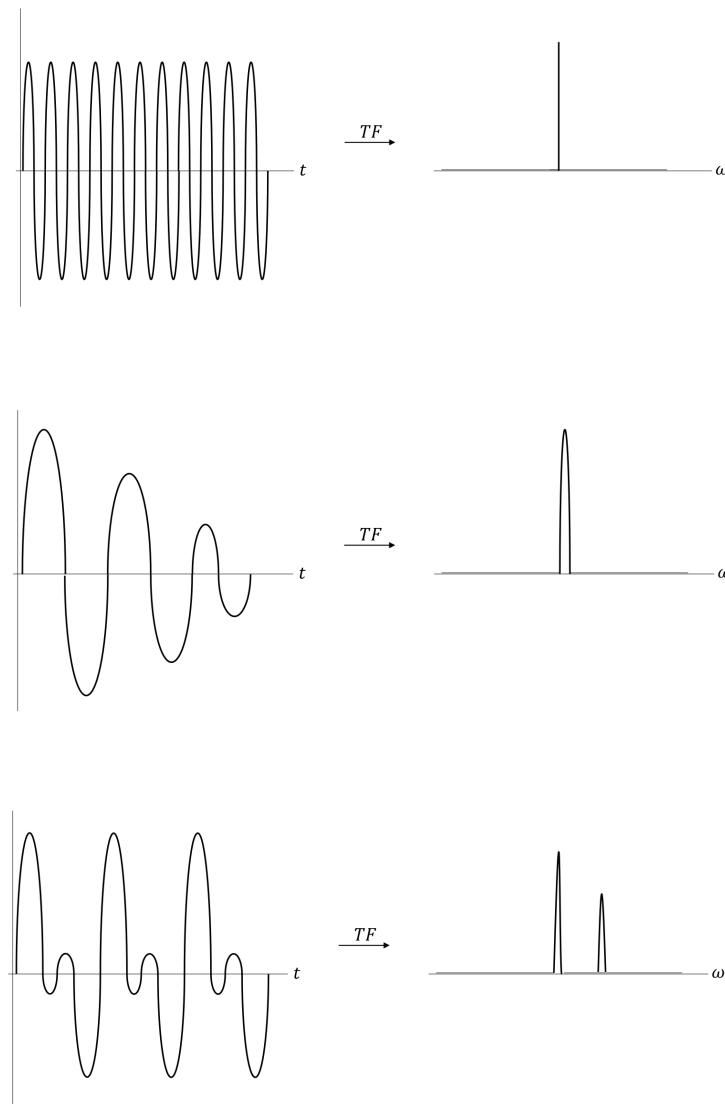


Figura 3.7: Diferentes FIDs com a sua respectiva TF.

## 3.7 Interações em RMN

Estudos de ressonância magnética nuclear apresentam resultados diretamente relacionados com as propriedades físicas dos sistemas estudados. A maneira de medir as energias presentes no sistema de interesse baseia-se no conceito físico de Hamiltoniano ( $\mathbf{H}$ ) o qual diz-nos os diferentes tipos de interações no sistema [35].

Para o nosso caso de estudo onde temos muitos núcleos que interatuam com o sistema, nosso hamiltoniano será:

$$\hat{H}_{sis} = \hat{H}_z + \hat{H}_{RF} + \hat{H}_{DQ} + \hat{H}_{JC} + \hat{H}_D + \hat{H}_Q \quad (3.9)$$

Sendo  $\hat{H}_z$ ,  $\hat{H}_{RF}$ ,  $\hat{H}_{DQ}$ ,  $\hat{H}_{JC}$ ,  $\hat{H}_D$  e  $\hat{H}_Q$  os hamiltonianos de efeito Zeeman nuclear, spins com campos de RF, deslocamento químico, acoplamento spin-spin, dipolar magnética e quadripolar elétrica. Devido a natureza deste estudo só analisaremos RMN em estado líquido e o hamiltoniano mostrado na equação 3.9, pode ser reduzido como  $\hat{H}_{sis} = \hat{H}_z + \hat{H}_{RF} + \hat{H}_{DQ} + \hat{H}_{JC}$ . A contribuição dipolar magnética ( $\hat{H}_D$ ) é anulada, devido à constante movimentação dos núcleos, e a contribuição quadripolar elétrica ( $\hat{H}_Q$ ), não existe fato de trabalhar com núcleos de Hidrogênio os quais tem spin igual a  $\frac{1}{2}$

### 3.7.1 Interação Zeeman Nuclear

Chamado assim em homenagem ao físico holandês Pieter Zeeman premiado com o prêmio nobel de física em 1902 por suas pesquisas sobre o efeito dos campos magnéticos sobre a radiação luminosa.

O hamiltoniano representa o acoplamento do momento magnético nuclear  $\mu_i = \gamma_i \hbar I_i$  com o campo magnético estático  $\vec{B}_0 = B_0 \hat{z}$ , isto é:

$$\begin{aligned} \hat{H}_z &= - \sum_i \mu_i \cdot \vec{B}_0 \\ &= - \sum_i \hbar B_0 \gamma_i I_i \hat{z} \end{aligned} \quad (3.10)$$

onde  $\gamma_i$  é razão giromagnético do i-esimo núcleo sob ação da interação Zeeman [36], sendo esta uma equação fundamental de RMN.

### 3.7.2 Interação dos sistemas de spins com os campos de RF

As transições entre níveis de energia de um sistema de spins podem ser realizadas excitando os núcleos de um sistema por meio da aplicação de um pulso de RF, sendo  $w_1$  a frequência de oscilação do campo  $B_{RF}$ , a forma de  $B_{RF}$  sera  $B_{RF} = 2B_1(t) \cos(w_{RF}t + \phi)\hat{x}$ , o hamiltoniano

$$\begin{aligned}\hat{H}_{RF} &= - \sum_i \mu_i \cdot \vec{B}_{RF} \\ &= - \sum_i \hbar \gamma_i I_i \cdot \vec{B}_{RF} \\ &= -\hbar \cos(w_{RF}t - \phi) \sum_i |\gamma_i B_1(t)| I_x^i\end{aligned}\tag{3.11}$$

onde  $B_1(t)$ ,  $w$  e  $\phi(t)$  são amplitude, frequência e fase do campo de RF respectivamente.

O efeito de  $\hat{H}_{RF}$  é induzir transições entre os estados  $\alpha \rightarrow \beta$ , com probabilidades por unidade de tempo dada pela "regra de ouro de fermi"[\[37\]](#)

$$\begin{aligned}P_{\alpha \rightarrow \beta} &= P_{\beta \rightarrow \alpha} \\ &= \gamma^2 B_1 |\langle \alpha | I_x | \beta \rangle|^2 \delta(w - w_L)\end{aligned}$$

a função  $\delta$ , garante que o campo  $B_1$  deve oscilar exatamente igual à frequência de larmor para que ocorra a absorção de energia pelo sistema de spins.

### 3.7.3 Interação spin - spin

Representa a interação dipolo-dipolo entre os momentos magnéticos de núcleos vizinhos que ocorre por meio dos momentos magnéticos de spin dos elétrons. O momento magnético do núcleo polariza os spins dos elétrons, sendo essa interação independente do campo externo  $B_0$ . Esse fenômeno produz sinais mais complexos, denominados de múltiplos (duplete, tripleto, quadruplete e múltiplo).

O hamiltoniano que representa este fenômenos é dado por:

$$\hat{H}_{JC} = 2\pi \hbar I^i \cdot j_{ik} \cdot I^k\tag{3.12}$$

onde  $j_{ik}$  é o tensor de J-acoplamento e  $I^i$ ,  $I^k$  são os spins nucleares dos diferentes núcleos.

### 3.7.4 Interação de deslocamento químico

A movimentação dos elétrons dentro da nuvem eletrônica expostos ao campo magnético  $B_0$  produz um campo magnético induzido  $B_{ind}$  [38]. O hamiltoniano pode ser representado como

$$\begin{aligned}
 \hat{H}_{DQ} &= - \sum_i \mu_i \cdot \vec{B}_{ind} \\
 &= - \sum_i \mu_i \cdot (\sigma_i \cdot \vec{B}_0) \\
 &= -\gamma_i \hbar \sum_i I_i \cdot \sigma_i \cdot \vec{B}_0
 \end{aligned} \tag{3.13}$$

onde  $\sigma_i$  representa um tensor simétrico de segunda ordem, denominado tensor de deslocamento químico que caracteriza o  $i$ -ésimo sítio nuclear por sua nuvem eletrônica. As constantes  $I$ ,  $B_0$  e  $\gamma$  representam, operador de spin nuclear, o vetor de campo magnético e razão giromagnético respectivamente.

Na maioria de casos, esse campo magnético  $B_{ind}$  se opõe e é proporcional ao campo  $B_0$  através de uma constante  $\sigma$  chamada **fator de blindagem**[39] e pode-se expressar como

$$B_{ind} = -\sigma B_0$$

Podemos inferir que se produz uma diferença entre  $B_0$  e  $B_{ind}$ . Denominamos como campo efetivo  $B_{ef}$  ao campo total sentido pelos núcleos, então teremos

$$\begin{aligned}
 B_{ef} &= B_0 - B_{ind} \\
 &= B_0 - \sigma B_0 \\
 B_{ef} &= B_0(1 - \sigma)
 \end{aligned} \tag{3.14}$$

agora a frequência de ressonância  $w$  pode ser definida como

$$\begin{aligned}
 w &= \frac{\gamma}{2\pi} B_{ef} \\
 w &= \frac{\gamma}{2\pi} B_0(1 - \sigma)
 \end{aligned} \tag{3.15}$$

da equação (3.15) se deduz que a frequência de ressonância depende da constante  $\sigma$ ,

essa propriedade importante faz que a espectroscopia tenha a possibilidade de detetar os diferentes compostos que existe em uma determinada amostra.

Surge aqui um problema de medição devido ao fato da frequência de larmor de cada núcleo, depender da intensidade dos campos magnéticos aplicados que podem ser diferentes, isto é, ela depende do equipamento utilizado na experiencia, o problema surge ao querer comparar espectros provenientes de diferentes equipamentos com diferentes campos magnéticos.

Para eliminar esta dependência e lograr que os espectros sejam comparáveis, se definem as posições das distintas ressonâncias através de uma escala relativa de valores a um valor de referência [40], posteriormente normalizado.

Se define a posição da frequência de ressonância do radical  $A$  respeito ao radical  $B$  pelo cociente entre a diferença das frequências dos dois radicais, pela do radical  $B$  tomado como referência.

$$\frac{(w_A - w_B)}{w_B}$$

substituindo na equação (3.15) para diferentes amostras

$$\begin{aligned} \frac{(w_A - w_B)}{w_B} &= \frac{\frac{\gamma}{2\pi}B_0(1 - \sigma_A) - \frac{\gamma}{2\pi}B_0(1 - \sigma_B)}{\frac{\gamma}{2\pi}B_0(1 - \sigma_B)} \\ &= \frac{(1 - \sigma_A) - (1 - \sigma_B)}{1 - \sigma_B} \\ &= \frac{\sigma_B - \sigma_A}{1 - \sigma_B} \end{aligned} \tag{3.16}$$

observamos que o cociente relativo da diferença de frequências resulta somente depender do fator de blindagem. Este importante resultado é conhecido como deslocamento químico, identificado com a letra grega  $\delta$ . Esse valor é adimensional e pequeno, sendo expresso em partes por milhão (ppm).

Em resumo os núcleos presentes em diferentes radicais químicos podem-se expressar respeito a um valor de referência correspondente a um determinado radical ( $w_B \approx w_r$ ), desta forma, qualquer núcleo de um radical  $A$  identifica-se através de seu deslocamento

químico  $\delta_A$  definido por

$$\delta_A(ppm) = \frac{w_A - w_r}{w_r}$$

onde  $w_r$  é a frequência de referência para o núcleo estudado. Desta forma identificamos os diferentes compostos presentes na amostra analisada independente do campo magnético utilizado para obter o espectro RMN.



# Capítulo 4

## Análise Estatística

Uma ferramenta utilizada em várias disciplinas científicas é a Estatística. As análises univariada e multivariada são um conjunto de métodos estatísticos e matemáticos, destinados a descrever e interpretar os dados que vem da observação de uma ou muitas variáveis estatísticas, conjuntamente estudadas. Nesta dissertação será utilizada a análise multivariada e análise univariada, a fim de abordar os desafios da Metabolômica, principalmente para a análise estatística dos resultados obtidos dos espectros de ressonância. É importante dizer que os métodos estudados nesse capítulo são apenas alguns de vários métodos com o qual os dados estatísticos podem ser estudados e analisados.

As análises estatísticas dos dados estudados constitui uma etapa importante deste trabalho uma vez que esta estuda, analisa, representa e interpreta informações de um conjunto de variáveis simultaneamente ("multivariada") ou individualmente ("univariada") de uma amostra de  $n$  elementos, sumarizada na forma de uma matriz de dados. Em análise multivariada, a informação de entrada consiste, geralmente, em matrizes de distancias, que medem o grau de discrepância entre os indivíduos [41].

### 4.1 Partial Least Squares - Discriminant Analysis

O método dos mínimos quadrados parciais (Partial Least Squares - Discriminant Analysis) ou PLS-DA, é um método de classificação supervisionado que usa a técnica de regressão multivariada que relaciona a matriz multivariada  $\mathbf{X}$  com o vetor  $Y$  que é chamado função de resposta, na forma

$$\begin{pmatrix} y_1 \\ y_2 \\ \vdots \\ y_n \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} x_{11} & x_{12} & \cdots & x_{1j} \\ x_{21} & x_{22} & \cdots & x_{2j} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ x_{n1} & x_{n2} & \cdots & x_{nj} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} b_1 \\ b_2 \\ \vdots \\ b_j \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} f_1 \\ f_2 \\ \vdots \\ f_j \end{pmatrix}$$

Em notação matricial compacta é da forma

$$\mathbf{Y} = \mathbf{X}\mathbf{B} + \mathbf{F} \quad (4.1)$$

Onde:  $\mathbf{Y}$  é vetor de  $n \times 1$ ,  $\mathbf{X}$  matriz de dados de  $n \times J$ ,  $\mathbf{B}$  é a matriz de coeficiente de regressão ou vetor de parâmetros de  $J \times 1$ , e  $\mathbf{F}$  é o vetor de resíduos de  $J \times 1$ . Então a solução pelo método de mínimos quadrados é dado por

$$\mathbf{B} = (\mathbf{X}^t\mathbf{X})^{-1}\mathbf{X}^t\mathbf{Y} \quad (4.2)$$

Porém, devemos ter em conta que em muitos casos existe o problema de singularidade da matriz  $(\mathbf{X}^t\mathbf{X})$ . PLS-DA resolve esse problema decompondo a matriz de dados  $\mathbf{X}$ , na matriz de *scores* ortogonais  $\mathbf{T}$  ( $n \times P$ ) e a matriz de carga  $\mathbf{P}$  ( $J \times P$ ), e o vetor de função resposta  $\mathbf{Y}$ , também em *scores* ortogonais  $\mathbf{U}$  ( $n \times P$ ) e a matriz de carga  $\mathbf{Q}$  ( $1 \times P$ ). Portanto, teremos duas equações no modelo PLS-DA:

$$\begin{aligned} \mathbf{X} &= \mathbf{TP}^t + \mathbf{E} \\ \mathbf{Y} &= \mathbf{UQ}^t + \mathbf{R} \end{aligned} \quad (4.3)$$

Podemos definir uma matriz de pesos (*weights*)  $\mathbf{W}$  ( $J \times P$ ), assim escrever a matriz de *scores*  $\mathbf{T}$ , como

$$\mathbf{T} = \mathbf{XW}(\mathbf{P}^t\mathbf{W})^{-1} \quad (4.4)$$

substituindo 4.4 na equação 4.1, obtemos o vetor de função resposta  $\mathbf{Y}$

$$\mathbf{Y} = \mathbf{XW}(\mathbf{P}^t\mathbf{W})^{-1}\mathbf{Q}^t + \mathbf{F} \quad (4.5)$$

tendo em conta que o vetor de coeficiente de regressão  $\mathbf{B}$  será dado por

$$\hat{\mathbf{B}} = \mathbf{W}(\mathbf{P}^t\mathbf{W})^{-1}\mathbf{Q}^t \quad (4.6)$$

Então, qualquer valor desconhecido da amostra  $\mathbf{Y}$  pode ser descrito por  $\hat{\mathbf{Y}} = \mathbf{X}\hat{\mathbf{B}}$ [42].

No método PLS-DA, os valores dos *scores* da matriz T são modificados até que o melhor modelo lineal seja determinado, para encontrar a maior covariância entre  $\mathbf{X}$  e  $\mathbf{Y}$  [43], existem diversos algoritmos propostos: NIPALS(*Non-Linear Iterative PLS*)[44], SIMPLS (*Statistically Inspired Modification of Partial Least Squares*) [45], Kernel [46], Wide Kernel [47], etc. No presente trabalho será utilizado O software online MetaboAnalyst [48] para a análise dos gráficos de *scores* e *VIP score*, no qual não tem-se a necessidade de encontrar ou mostrar os algoritmos utilizados.

## 4.2 Test-t ou Test de Student

Em probabilidade e estatística, a distribuição  $t$  ou distribuição  $t$  de **Student** é uma distribuição de probabilidade que surge no problema de estimar a media de uma população normalmente distribuída e quando o tamanho da amostra é pequena.

Seja  $X_1, X_2, X_3, \dots, X_n$  e  $X$ ,  $n+1$  variáveis aleatórias normais com media zero e desvio padrão  $\sigma$  independente entre eles. Então a variável

$$t_n = \frac{X}{\sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n X_i^2}} \quad (4.7)$$

recebe o nome de  $t$  de **Student** com  $n$  graus de liberdade. Podemos reduzir a equação 4.7 dividindo o numerador e denominador pela desvio padrão  $\sigma$

$$t_n = \frac{\frac{X}{\sigma}}{\sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \left(\frac{X_i}{\sigma}\right)^2}} = \frac{Z}{\sqrt{\frac{1}{n} \chi_n^2}} \quad (4.8)$$

$Z$  é uma variável que segue uma distribuição normal estandar  $N(0, 1)$  e  $\chi_n^2$  é uma distribuição Chi ( $\chi^2$ ) com  $n$  graus de liberdade, sendo as duas independentes.

Existe uma função de densidade associada, chamada **distribuição t de Student** [49]

expressada como

$$f(x) = f(t) = \frac{1}{\sqrt{n}\beta(\frac{1}{2}, \frac{n}{2})} \left(1 + \frac{t^2}{n}\right)^{-\frac{n+1}{2}} \quad (4.9)$$

Onde o campo de variabilidade da variável  $t$  de Student será de  $-\infty$  a  $\infty$  e  $\beta$  é a função beta, definida como

$$\beta(p, q) = \frac{\Gamma(p)\Gamma(q)}{\Gamma(p+q)}$$

notemos que a equação 4.9 depende dos graus de liberdade,  $n$  e  $t^2$ , ao ser uma equação quadrática esta será simétrica ao redor de  $t = 0$ .

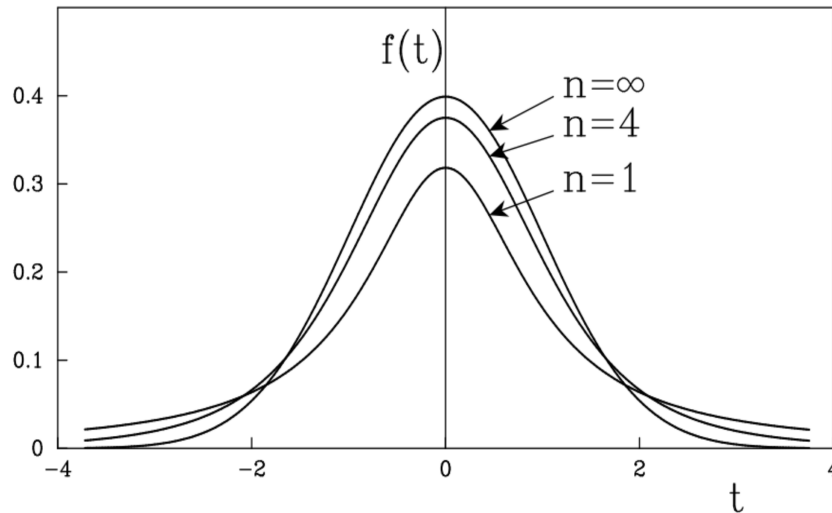


Figura 4.1: Distribuição  $t$  de Student. quando  $n \rightarrow \infty$  a distribuição  $t$  tende a distribuição normal

A média e a variância da distribuição  $t$  vem dadas por  $\mu = 0$  e  $\sigma^2 = \frac{n}{n-2}$ ,  $n > 2$ . Quando  $n$  é grande observamos que  $\sigma \rightarrow 1$  e, portanto, a distribuição  $t$  tende a distribuição normal estândar.

Para calcular áreas sob a função  $t$  é recomendável o uso de tabelas, denotadas por  $t_{\alpha,n}$ , que outorgam valores de áreas (probabilidade) sob a função de densidade de certo valor  $\alpha$ , chamado nível de significação [49], isto é,

$$P(t_n > t_{\alpha,n}) = \alpha$$

$$P(t_n < t_{\alpha,n}) = 1 - \alpha$$

Para valores de  $t$  negativos, por ser a distribuição  $t$  simétrica, temos

$$\begin{aligned}
 P(t_n > -t_{\alpha,n}) &= 1 - P(t_n < -t_{\alpha,n}) \\
 &= 1 - P(t_n > t_{\alpha,n}) \\
 &= 1 - \alpha
 \end{aligned}$$

$$P(t_n < -t_{\alpha,n}) = \alpha$$

Além disso

$$t_{\alpha,n} = -t_{1-\alpha,n}$$

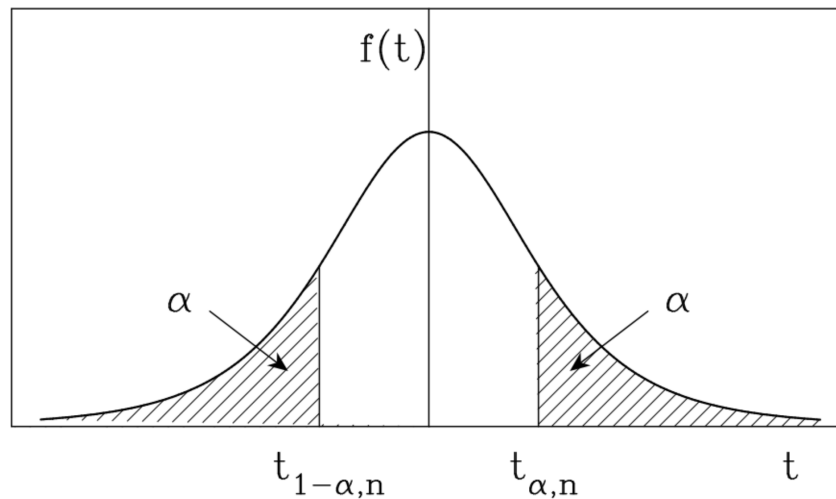


Figura 4.2: Distribuição  $t$  de Student. Simetria,  $P(t_n > t_{\alpha,n}) = \alpha$  e  $t_{\alpha,n} = -t_{1-\alpha,n}$

A distribuição  $t$  de Student é importante para a estimação e o contraste de hipóteses sobre a média de uma população, isto é, se existir uma população que segue uma distribuição normal com média  $\mu$  e desvio padrão  $\sigma$   $N(\mu, \sigma)$ , pode ser extraída uma amostra aleatória de tamanho  $n$  de media  $\bar{x}$  e desvio padrão  $s$ , cuja variável aleatória dada por

$$t_{n-1} = \frac{\bar{x} - \mu}{s/\sqrt{n}} \quad (4.10)$$

será uma distribuição  $t$  de Student com  $(n - 1)$  graus de liberdade.

# Capítulo 5

## Métodos e Materiais

### 5.1 Construção da Incubadora Hipoxia

O primeiro passo para a realização deste projeto foi desenhar e construir uma Incubadora celular denominada Incubadora Hipoxia (IH), que tem como objetivo realizar a reprodução e/ou o pré-condicionamento das células. IH foi construída de material acrílico de dimensões: Altura, 35cm, largura, 35cm, comprimento, 35cm e uma espessura do acrílico de 6mm, contendo aproximadamente 39L, permite conter ao redor de 4-5 garrafas do tipo T25 ( $25\text{cm}^2$  de área de adesão celular) de meio de cultura necessárias para a reprodução das células. No interior da IH existe fluxo de gases constante.

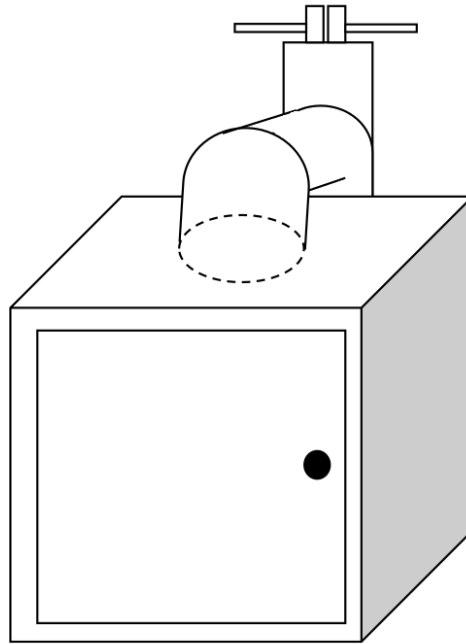


Figura 5.1: Vista frontal da IH

O controle da IH é realizado através de um painel LCD (*display*) interativo, o qual pode ser programado para uso personalizado da pesquisa a realizar-se. A incubadora tem a capacidade de cultivar células de forma normal (modo normóxia) e modo de pré-condicionamento (modo hipóxia). No modo normóxia o usuário apenas escolhe no menu do painel LED, pois os parâmetros estabelecidos para este modo estão pré-programados no código do software de Arduino. Para o modo hipóxia o usuário precisa inserir os seguintes parâmetros: Tempo de hipóxia, Tempo de normóxia e Numero total de ciclos (normóxia + hipóxia).

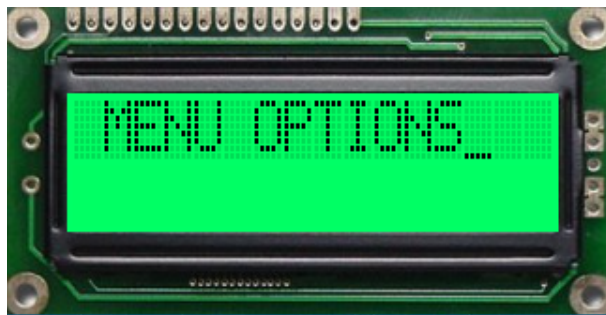


Figura 5.2: Display LCD 16x2 interativo, o usuário é capaz de inserir os parâmetros da experiência.

Todos os componentes eletrônicos utilizados na realização e desenvolvimento da IH podem-se encontrar no mercado por preços acessíveis, e a maioria são controlados pelo microcontrolador Arduino Mega (AM), software de livre acesso.

Dentro da IH é necessário um monitoramento do meio ambiente, isto é, necessitamos conhecer os parâmetros cada instante para que a reprodução das células seja ótima. Esses parâmetros são temperatura ( $T$ ) e a quantidade de  $CO_2$ (%). Podemos conseguir isso através do painel LCD que mostrará os parâmetros requeridos.

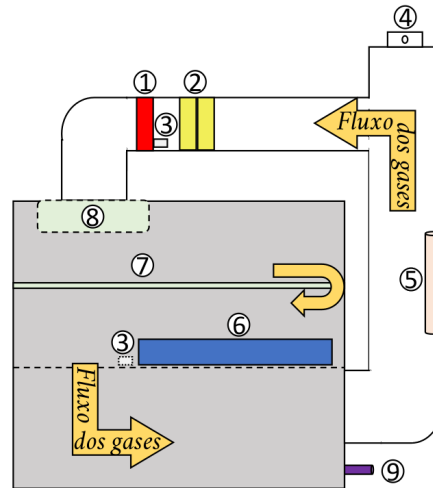


Figura 5.3: Vista lateral da IH. Componentes: 1. Aquecedor; 2. *Coolers*; 3. Sensores de temperatura; 4. Eletroválvulas (ingresso de gases  $CO_2$  ou  $N_2$ ); 5. Lampada UV; 6. Garrafas de cultivo; 7. Lamina de acrílico; 8. Filtro de ar; 9. Ingresso de ar.

O monitoramento da temperatura é realizado por sensores tipo termistor NTC de 2 pinos. O calor fornecido para obter a temperatura desejada é gerado através de um aquecedor de ar incubadora AC 500W,  $140 \times 50$ mm, o fluxo do ar quente é devido a *coolers* colocados transversalmente nos tubos que permitem a circulação do ar e gases, de maneira contínua. O aquecedor esta controlado por Arduino, AM que ajusta o tempo de ligado e desligado, se a temperatura do aquecedor excede a uma temperatura máxima, AM desliga, após um intervalo de tempo voltará a ligar o aquecedor, dessa forma manterá a temperatura adequada para a reprodução das células. O sensor de temperatura posicionado próximo as garrafas de cultivos celulares é o encarregado de fornecer o parâmetro de temperatura dentro da IH.

Para o controle de ingresso do gás  $CO_2$ , foi necessário colocar eletroválvulas na IH, essas válvulas estão conectadas nos tubos de circulação de ar, e o controle delas é feito por AM. O ingresso do gás  $CO_2$  ocorre quando a IH é ligada, e o tempo determinado de abertura da válvula desse gás foi de 5s, necessário para preencher aproximadamente 5% do volumen total de IH com  $CO_2$ , após 7m 30s, a válvula reabrirá para o ingresso de  $CO_2$ , sendo assim um ciclo (ligado e desligado) repetido varias vezes em intervalos



de 7m 30s aproximadamente. Esses parâmetros foram obtidos após várias calibrações experimentais com células vivas para o modo normóxia da IH e certificados posteriormente por meio de uma aferição comercial de gases (Inmetro, Technolab Soluções) revelando que a concentração real média nesse período de tempo era de 3%. Também realizamos o monitoramento de pH de meios de cultura puros incubados nas mesmas condições das células, que mostrou um aumento de 5% no pH resultante em IH em relação ao obtido em uma incubadora comercial.

No modo Hipóxia, a IH deve ser preenchida com gás nitrogênio ( $N_2$ ), o que também é conseguido com o controle das eletroválvulas. Quando o modo Hipóxia inicia, o ingresso de  $N_2$  é constante durante o tempo estabelecido para o pré-condicionamento das células.

Para evitar casos de contaminação dentro da incubadora, existe uma lampada de ultravioleta (UV) que está posicionada na tubulação externa da IH, permitindo esterilizar o ambiente e dessa forma evitamos qualquer contaminação. Como mostra a figura 5.3, o fluxo de calor está na direção as garrafas de cultivo de células, e para aumentar o grau de pureza dos gases circulantes (ar,  $CO_2$  ou  $N_2$ ) colocamos um filtro de ar (modelo RYX-760175 HEPA ) e uma placa de acrílico entre as garrafas e aquecedor para que o fluxo ar seja laminar e conseguir um ambiente homogêneo de aquecimento ao redor das garrafas.

Como toda as incubadoras comerciais, IH deve ter um tempo ligado para criar o ambiente necessário para a cultura de células, o tempo necessário para encontrar esses parâmetros de  $T$  e  $CO_2$  é de aproximadamente duas horas.

Tudo isso não seria possível sem o controle automatizado que brinda o software de programação Arduino, o código do controle e monitorização para todos esses componentes esta baseado em Arduino Mega, esse código consta de aproximadamente mil linhas e ainda está aberto para qualquer mudança que seja necessária.



Figura 5.4: Partes do código criado para o controle e manipulação da IH no Software Arduino Mega

## 5.2 Calibração da Incubadora Hipóxia

Depois da construção da incubadora encarregada de fazer o condicionamento (PC) das células, temos que garantir uma boa reprodutibilidade e/ou uma boa viabilidade para o cultivo das mesmas, isto é, temos que conseguir que as células cultivadas na IH tenham desenvolvimento normal dentro dela. Desta forma, podemos testar a eficiência da IH comparando as células cultivadas na IH com células cultivadas em uma Incubadora Comercial (IC), destinada apenas para células não pre-condicionadas (NPC).

Quando é colocado uma determinada quantidade de células em uma placa ou garrafa de cultivo dentro da IC, esta mantém uma temperatura de 37°C e libera gás  $CO_2$  para manter o ambiente em seu interior a 5% de concentração em volume desse gás. A temperatura dentro da IC é monitorada com um sensor, de igual forma para o gás  $CO_2$  e um sensor correspondente. Nossa IH reproduz também essas condições com sensores usados em sua construção, o objetivo então é ter um mesmo desenvolvimento das células

em ambas incubadoras. Os experimentos realizados para este fim constam: colocar uma mesma quantidade e mesma linhagem de células dentro das incubadoras com uma mesma temperatura, um adequado ambiente de gases ( $CO_2$  e ar) e um mesmo intervalo de tempo de funcionamento das incubadoras. As experiências foram feitas com dois tipos de células RASM (do inglês, *rabbit aortic smooth muscle cells*) e fibroblastos humanos FN1, ambas as linhagens fornecidas em colaboração pelo Instituto Butantan.

Realizamos três etapas de calibração para chegar nas mesmas condições na IH da IC, ajustando a abertura e fechamento da válvula do gás  $CO_2$  em intervalos de tempos iguais durante todo o tempo de cultivo das células para conseguir um ambiente próximo a 5% de  $CO_2$ , além de monitorar a temperatura de cultivo das células de  $37^\circ C$  através dos sensores em seu interior.

Para conhecer a quantidade de células vivas e células mortas durante a calibração da IH é necessário fazer contagem de células, por meio da "Câmara de Neubauer" um instrumento utilizado frequentemente nos laboratórios de Ciências Biológicas,

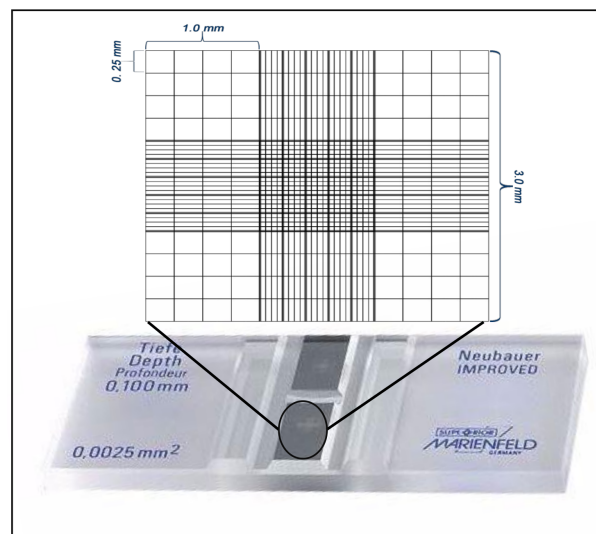


Figura 5.5: Câmara Neubauer, instrumento típico para uso em Ciências Biológicas.

O método para a contagem com essa câmara é colocar ao redor de 0,1uL de uma mistura de 100uL de cultivo celular com 100uL de azul de tripano, corante azoico que utiliza-se para ensaios de viabilidade que permitem diferenciar células vivas das mortas, já que o azul de tripano atravessa a membrana celular das células mortas mas não das vivas desta forma pode-se diferenciar as vivas das mortas por contraste de cor no microscópio (células mortas têm aspecto azulado). A câmara de Neubauer conta com duas partes reti-

culadas, parte superior e parte inferior, as quais contam com 4 quadrantes cada, conforme mostrado na figura 5.5. Depois de fazer o contagem dos quadrantes totais o número total de células vivas numa amostra vem dada pela seguinte relação

$$Tot Cel\left(\frac{cel}{mL}\right) = \frac{Cel \times Res \times Dil}{8} \quad (5.1)$$

*Tot Cel* = Número total de células

*Cel* = Células contadas

*Res* = Resolução da câmara =  $1 \times 10^4$

*Dil* = Diluição da amostra

A viabilidade pode ser considerada como uma comparação relativa entre células vivas e mortas, resumida em uma simples relação matemática:

$$Viab = \frac{Cel_v}{Cel_t} \times 100\% \quad (5.2)$$

*Viab* = Viabilidade

*Cel<sub>v</sub>* = Células vivas

*Cel<sub>t</sub>* = Células totais (vivas e mortas)

Conhecendo estes conceitos estamos preparados para as calibrações. Segue tabelas dos dados obtidos na experiência com essas células.

Primeira calibração com tempos de abertura e fechamento da válvula de gás  $CO_2$  em IH em intervalos de 30 min:

<b>Origem</b>	<b>Tipo de células</b>	<b>Total células vivas(x10<sup>6</sup>)</b>	<b>Viabilidade(%)</b>
<b>IC</b>	RASM	3,8	95
<b>IH</b>	RASM	1,9	50
<b>IC</b>	FIBRO	0,018	95
<b>IH</b>	FIBRO	0,004	48

Tabela 5.1: Observamos que a viabilidade para as células RASM e Fibroblasto de origem IH é baixa em comparação com as células que vêm da IC

Segunda calibração com tempos de abertura e fechamento da válvula de gás em intervalos de 15 min:

<b>Origem</b>	<b>Tipo de células</b>	<b>Total células vivas(x10<sup>6</sup>)</b>	<b>Viabilidade(%)</b>
IC	RASM	3,5	94
IH	RASM	2,5	75
IC	FIBRO	0,04	94
IH	FIBRO	0,01	70

Tabela 5.2: Observamos uma viabilidade razoável da IH com respeito a IC

Terceira Calibração com tempos abertura e fechamento da válvula de gás em intervalos de 7 min:

<b>Origem</b>	<b>Tipo de células</b>	<b>Total células vivas(x10<sup>6</sup>)</b>	<b>Viabilidade(%)</b>
IC	RASM	3,61	95
IH	RASM	3,04	94
IC	FIBRO	0,07	95
IH	FIBRO	0,06	93

Tabela 5.3: Observa-se que a viabilidade na terceira calibração é adequada, atingindo quase 95%

Podemos calcular a eficiência da incubadora construída (IH) em relação à Incubadora Comercial (IC). A eficiência pode ser descrita através da comparação da viabilidade, já que elas medem as células que ficam vivas depois do processo de cultivo. Podemos comparar as três calibrações realizadas cada uma delas com tempos diferentes de abertura e fechamento de válvulas.

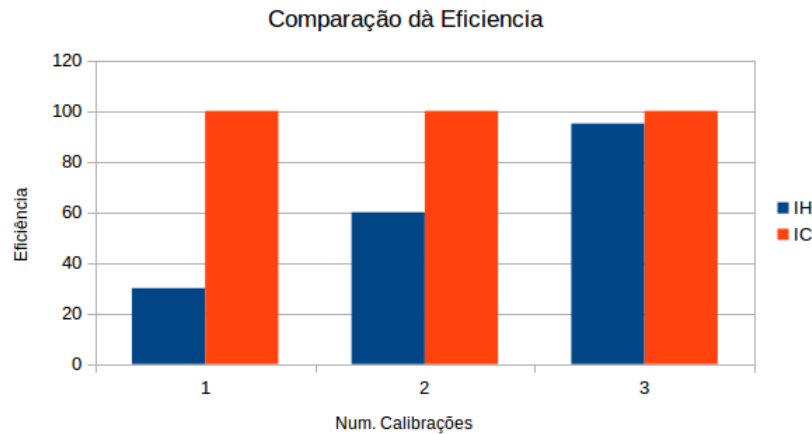


Figura 5.6: O gráfico mostra uma melhora que depende do tempo de abertura da válvula de gás  $CO_2$ .

Com os dados registrados, temos as condições necessárias para assumir que a IH pode ser utilizada para realizar experiências de cultivo e pré-condicionamento celular.

## 5.3 Experiência com cardiomiócitos

### 5.3.1 Condição Normóxia

Depois que as células foram descongeladas de acordo ao protocolo estabelecido, elas estão prontas para a reprodução nas incubadoras, tanto na IC quanto na IH. Antes de semear as células em placas de seis poços, cada placa foi submetida a tratamento com laminina para fazer o revestimento dos poços de cultura (*coating*) facilitando a adesão dos cardiomiócitos. Uma vez realizada este procedimento cada poço das placas foram semeados com meio milhão (500k) de células aproximadamente.

### 5.3.2 Condição Hipóxia

Nesse modo, a IH sofre uma mudança nas condições ambientais, isto é, o ambiente interno é saturado com gás  $N_2$ , mas a temperatura fica ao redor de  $37^\circ C$ . Nesta condição, espera-se que as células sofram de estresse (Hipóxia), resultando em alguma alteração no metabolismo para adaptar-se às novas condições.

### 5.3.3 Condição Normóxia-Hipóxia

Alem da construção da incubadora de hipóxia, o outro objetivo principal de nosso projeto é realizar o pré-condicionamento das células cardiomiócitos na IH, procedimento este que consta de duas partes. Primeiro, condição Normóxia. Segundo, condição Hipóxia, conseguindo dessa forma um ciclo Normóxia-Hipóxia. O tempo nas diferentes condições é importante para não deixar as células morrerem: na condição Normóxia as células terão um tempo de 90 min, na condição Hipóxia tempo de 45 min, sendo um tempo total de 135 min, isto é, um ciclo Normóxia-Hipóxia tem uma duração de 2h 15min.

Experiencia no Modo Normóxia-Hipóxia		
Primeiro Dia	Terceiro Dia	Quinto Dia
Semeado de Células	Substituição e coleta de meio	Coleta de meio e Extração celular

Após o descongelamento e semeado das células nas placas, são inseridas na IH para iniciar o modo pré-condicionamento (Normóxia-Hipóxia), realizado por 96h, com aproximadamente 50 ciclos de Normóxia-Hipóxia. Depois de 48h e 96h de iniciado o pré-condicionamento, as amostras são coletadas conforme explicado na seção apêndice A. Paralelamente na IC foi semeado a mesma quantidade de células para obter amostras controle sobre a eficiência de IH para o desenvolvimento das células.

### 5.3.4 Cultivo Celular realizado com Cardiomiócitos

Os cardiomiócitos foram fornecidas pelo InCor, em parceria com o Prof. Dr. José Eduardo Krieger, Dr. Vinícius Bassaneze e a Dra. Elida Adalgisa Neri, e armazenadas em um tanque com nitrogênio líquido.

Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as normas de conduta ética utilizadas no cuidado de animais e aprovadas pelo conselho de revisão institucional local: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Brasil (#340/12). Os CMs foram descongelados e semeados utilizando-se uma mistura de 4:1 na proporção de meios de cultura DMEM: M199 (Media 199, Gibco) suplementado com 1% (V / V) de soro de cavalo (HRS, Gibco), 5% de soro de bezerro recém-nascido (NBCS, Gibco) e 1% de bromodeoxiuridina (BrdU, Gibco), este último para prevenir o desenvolvimento de não cardiomiócitos semeando  $500 \pm 30k$  células por poço nas placas de múltiplos poços. A

hipóxia foi estabelecida dentro da câmara IH por injeção de gás N<sub>2</sub> na pressão inicial de 20 p.s.i. por todo esse período, mantendo a injeção de CO<sub>2</sub> usada na normóxia. Também foi utilizada para incubação de CMs de normoxia, uma incubadora comercial de CO<sub>2</sub> (IC), *Série II Water Jacket - Thermo Scientific* para avaliar o desempenho da IH.

As experiências de CMs em "normóxia" e "pré-condicionamento" foram repetidas quatro vezes como segue: (experiência 1) normóxia-hipóxia em IH, (experiência 2) normóxia em IC e IH, (experiência 3) normóxia-hipóxia e (experiência 4) normóxia. Para agregar significância estatística aos resultados, bem como contabilizar a variabilidade biológica das células, foi utilizado um esquema específico de repetições obedecendo aos procedimentos a seguir. Em cada estágio da cultura, 2 frascos de CMs, denominados "A" e "B", foram usados para semear uma placa de múltiplos poços onde 3 poços foram semeados com aproximadamente 500k de A e os outros 3 semeados com o mesmo de B, e transferidos para IH para serem cultivados (normóxia e normóxia-hipóxia). No mesmo momento, 2 placas individuais tratadas com cultura também foram semeadas cada uma com  $500 \pm 30$ k de CMs, uma de A e outra de B, e transferidas para IC para serem cultivadas. No final de todas as incubações, geralmente 3 dias, CMs de IH foram misturados dois a dois de tal forma  $[A_{500} + A_{500}] = A$ ,  $[B_{500} + B_{500}] = B$ , e  $[A_{500} + B_{500}] = C$  para obter 3 réplicas de um pool de células usadas em experimentos de ressonância, enquanto as células de IC permaneceram inalteradas para os experimentos, a fim de produzir 2 réplicas extras também com 500k células cada, denominadas  $A_{500}^c$  e  $B_{500}^c$ . Em relação aos meios de cultura, utilizados como amostra de ressonância na análise metabolômica, estes foram coletados 2 vezes a cada 48 h de incubação e combinados da mesma forma que o utilizado para as células de IH, mantendo o meio inalterado do IC. A Figura 5.8 resume o esquema de cultura de CMs apresentado neste parágrafo.

Posteriormente à fase de cultivo, células e meios são coletados para produzir as amostras de ressonância. Na seguinte seção 5.3.5 é detalhado como o procedimento de coleta do meio e células (extração celular). Todos esses procedimentos para cultivo celular foram realizados utilizando-se o protocolo interno do *LabM<sup>2</sup>* (Apêndice A), baseado em *Cultivo Celular* de Emanuele Amorim Alves e Anna Christina Rosa Guimarães (2010), estabelecidos para descongelamento, e repique ou passagem celular.



### 5.3.5 Coleta de Células e meio de Cultura

O planejamento de todas as experiências deste projeto resultou em um total de quatro semanas, duas semanas de experiência Normóxia e duas semanas de experiência Hipóxia. Em cada experiência a coleta de meios e a extração metabólica (para as células) foi planejada da seguinte maneira.

Experiencia no Modo Normóxia		
Primeiro Dia	Terceiro Dia	Quinto Dia
Semeado de Células	Substituição e coleta de meio	Coleta de meio e Extração celular

No terceiro dia, os meios de cultura são coletados em tubos cônicos de centrifuga (falcons de 15mL de capacidade) e centrifugados 2 (duas) vezes a fim de precipitar células que estão aderidas. Após do centrifugado, separam-se as células do meio, colocando as amostras de meio de cultura em tubos de micro-centrifuga de marca *ependorfes* de 2mL próprios para liofilização e armazenados no ultra-freezer (-70°C). As células restantes sendo incubadas até o quinto dia com um novo meio de cultura. A contagem de células dentro da IH e IC serve para ter controle adequado na manutenção celular, e serão comparadas posteriormente para obter o desempenho da IH nas experiências.

Para o quinto dia foi realizada a contagem, coleta de meio e extração celular. As células resultantes são então tripsinizadas para serem removidas das placas de cultura lavadas com PBS para depois passarem pela centrífuga a fim de remover resquícios do meio de cultura. Este processo é executado 3 (três) vezes para garantir que sejam retidas apenas células. Após o processo de purificação por lavagens, adicionam-se 0.5mL de solução 1 : 1 de metanol e água gelada homogenizando levemente. Após, a suspensão de células e fragmentos celulares na mistura de solventes (água e metanol), passarão pelo tratamento com ultrassom que contribui para a lise das mesmas resultando no processo conhecido como "extração metabólica", onde o produto final é um composto de moléculas orgânicas de baixo peso molecular (aproximadamente, 100Da), chamadas metabólitos, que foram os objetos de análise por ressonância magnética. Finalmente, esta solução passou pela centrifugação a 4°C e 2200 r.p.m. durante 90 min, e se coletou os sobrenadantes resultantes que são acondicionados nos tubos de micro centrifuga e armazenados no ultra-freezer.

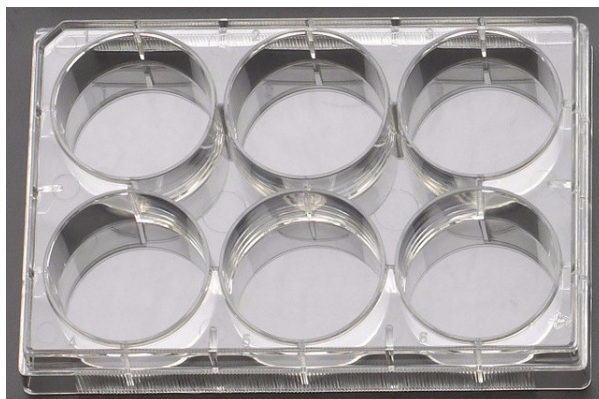


Figura 5.7: Placa para cultivo celular de 6 poços.

No final de cada experiência as amostras denominadas "A", "B" e "C" foram obtidas e liofilizadas no laboratório de Imunobiológicos e Biofármacos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. Após a liofilização, os extratos resultantes das amostras de células e meio de cultura, foram submetidos às experiências de Ressonância Magnética Nuclear.

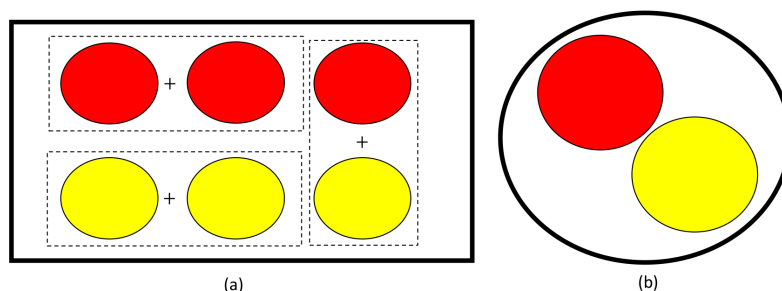


Figura 5.8: Esquema de placas e meio de cultivo celular. (a) Placa de 6 poços inserido na IH, (b) placa de 2 poços inserido na IC, são as amostras controles das células.

### 5.3.6 Experiências de Ressonância Magnética Nuclear

As experiências de RMN foram realizadas no Laboratório de Análises Químicas (LAC) - Centro de Química e Manufaturados (CQuiM) do Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT), através de um espectrômetro Varian (Varian Inc., Palo Alto, CA, EUA) de 400 MHz para amostras líquidas.

Finalizado o processo de liofilização, os extractos resultantes das amostras celulares e meio de cultura, são misturados com soluções TSP (*Trimethylsilyl propionic 2,2,3,3-d4 acid sodium salt*) em  $D_2O$  (água deuterada) à concentração de 0,5mM para as amostras celulares e 5mM para as amostras de meios de cultura. Após a diluição em  $D_2O$ , as

amostras são transferidas para tubos de ressonância (5mm) em um volume de 0.7mL.

Os experimentos de  $^1\text{H}$ -RMN foram realizados utilizando-se uma sonda de ressonância tripla de 5mm ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ) sintonizada em frequência constante de 399,7 MHz para os núcleos de prótons. Os espectros foram convenientemente adquiridos usando a combinação da sequência de pulso NOESY-1D e saturação seletiva de água residual, PRESAT [11]. Algumas condições experimentais foram mantidas constantes entre as aquisições de extratos celulares e meios de cultura: temperaturas de 25 °C, taxas de rotação de 20 Hz, tempo para repetição de 1.0 s, pulsos de excitação de 7.5  $\mu\text{s}$  de largura, tempo de mistura de 150 ms e pulso de saturação seletiva de água de 2.0 s de largura aplicado a aproximadamente 4.7 ppm em relação ao DSS. Para as células foram utilizadas janela espectral de 10 ppm, número de pontos total por aquisição de 32 Kbytes e 3000 transientes por sinal (aproximadamente três horas de aquisição). Para janela espectral de meio de cultura foi utilizado 12 ppm de largura, 64 Kbytes e 192 transientes (aproximadamente vinte minutos de aquisição). Uma transformação de Fourier ponderada com alargamento de linha de 0.3 Hz foi aplicada para todos os espectros (células e meio de cultura), seguida de ajuste de fase e correção de linha de base através de curvas *spline*. A homogeneização do campo magnético através de procedimentos de shimming foi realizada antes de cada aquisição para garantir uma resolução espectral adequada, sendo alcançados valores para "largura de linha a meia altura" (LWHH) do DSS que variaram de 0.5 a 1.5 Hz. As, "razões sinal-ruído" (SNRs) foram calculadas e usadas para determinar o nível de incerteza de nossas medições. Os espectros apresentaram valores que variaram de 40 a 200 para células e 800 a 5000 para meios de cultura resultando, em média, SNRs de  $145.7 \pm 92.9$  e  $2453.1 \pm 1866.3$  respectivamente para células e meios. Foram analisadas mais de 50 amostras no total.

Os espectros de ressonância gerados tiveram seus respectivos eixos de intensidade e de deslocamento químico referenciados internamente pelo TSP ( $\sigma = 0\text{ppm}$ ).

Os arquivos (.fid) gerados no espectrômetro foram processados no software *Chemomx* (2011) de nosso laboratório (*LabM<sub>2</sub>*). Em resumo todo o processo consistia em: (1) *Line Broadening*, Aplicar filtro exponencial na transformada de Fourier, isto é, melhorar a razão sinal/ruído. (2) *Phase Correction*, Ajustar a fase. (3) *Baseline Correction*, correção de linha base. e (4) *Chemical Shift Indicator (CSI)*, definir os parâmetros: posição e área CSI.

A obtenção das matrizes multivariadas, também foi realizada através do software *chemomx* identificando os metabolitos e suas respectivas áreas sob o espectro processado. A extração desses dados (concentrações), é realizada através de ajustes dos sinais por meio de funções do tipo lorentzianas obtendo, desta forma, o metabólito e sua respectiva concentração.

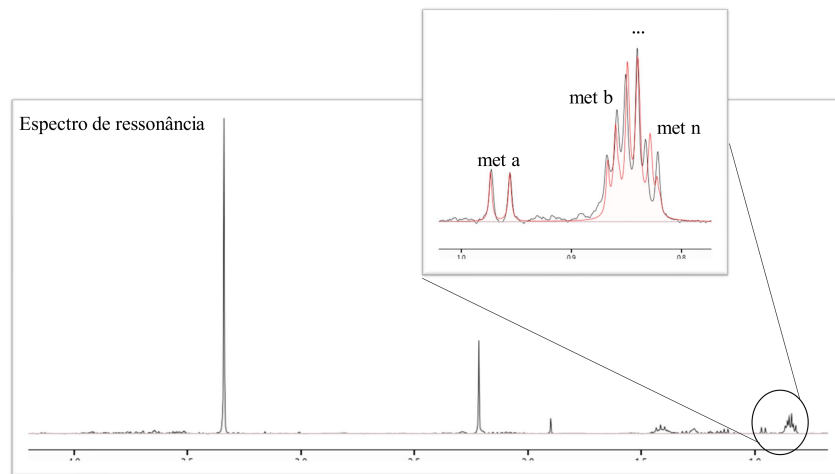


Figura 5.9: A área sob as linhas representam as áreas dos metabolitos identificados nos espectros de RMN

A figura 5.9 mostra um exemplo de como se obtêm os dados para a matriz multivariada no *software* Chemomx.

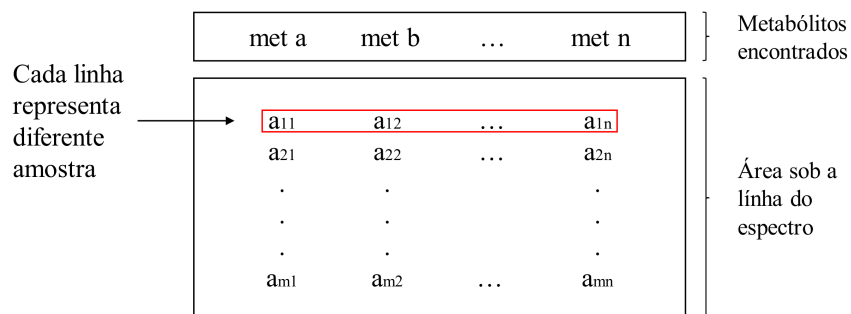


Figura 5.10: Após da obtenção das áreas sob a linha dos espectros se pode construir a matriz multivariada.

A figura 5.10 representa a construção da matriz multivariada após se obter as áreas de um espectro de ressonância de uma amostra.

### 5.3.7 Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA)

O tratamento multivariado dos espectros de RMN foi realizado através de *MetaboAnalyst*, software-online livre, desenvolvido por Wishart, *et al* [48]. responsáveis também pelo site *The Human Metabolome Database* (HMDB), uma base de dados *online* para a consulta de metabolitos e moléculas presentes em espectros de RMN obtidos de amostras biológicas. O principal objetivo de *MetaboAnalyst* é oferecer procedimentos comuns para processar, normalizar e analisar dados em estatística multivariada dirigida a metabolitos.

Este software é usado principalmente para: (1) Identificar características diferentes ou comuns entre dois ou mais grupos de dados que buscam prever alguma correlação existente entre elas. (2) Identificação dos caminhos ou mapeamento de metabolitos significativos.

Obtidas as matrizes multivariadas NPC e PC, estas foram inseridas no software *MetaboAnalyst*, obtendo os gráficos de *scores* e *VIP scores* que serão apresentados no capítulo seguinte.

Os resultados da análise multivariada através de *MetaboAnalyst*, *VIP scores* ou metabolitos classificadores de grupo, foram testados para estabelecer um parâmetro numérico que comprove sua significância estatística ( $\rho < 0,05$ ) utilizando o software *Minitab 17* (análise univariada Test-t ou Kruskal-Wallis). Os metabolitos que foram encontrados nessa análise multivariada são testados para identificar as "vias metabólicas" nos quais são intermediários, esse teste também foi realizado no *MetaboAnalyst* no módulo *Pathway Analysis*.

# Capítulo 6

## Resultados

### 6.1 Contagem de cardiomiócitos

Na primeira e terceira semana foram realizadas as experiências no modo Normóxia, isto é, cultivo celular NPC enquanto na segunda e quarta semanas foram realizadas as experiências no modo hipóxia, isto é, cultivo celular utilizando ciclos de normóxia-hipóxia. A contagem de células para todas as experiências refletem as ultimas 48h de atividade celular.

<b>Semana 1: Experiência Normóxia (NPC)</b>			
<b>Contagem de Células</b>			
<b>Origem</b>	<b>Amostra</b>	<b>Cél. vivas (<math>\times 10^6</math>)</b>	<b>Cél. mortas (<math>\times 10^6</math>)</b>
<b>IH</b>	<b>A</b>	0.09	0.40
	<b>B</b>	0.25	0.39
	<b>C</b>	0.18	0.63
<b>IC</b>	<b>A</b>	0.09	0.18
	<b>B</b>	0.21	0.27

Tabela 6.1: Contagem das células NPC no dia final (dia 5).

<b>Semana 3: Experiência Normóxia (NPC)</b>			
<b>Contagem de Células</b>			
<b>Origem</b>	<b>Amostra</b>	<b>Cél. vivas (<math>\times 10^6</math>)</b>	<b>Cél. mortas (<math>\times 10^6</math>)</b>
<b>IH</b>	<b>A</b>	0.07	0.39
	<b>B</b>	0.07	0.42
	<b>C</b>	0.11	0.55
<b>IC</b>	<b>A</b>	0.20	0.20
	<b>B</b>	0.13	0.16

Tabela 6.2: Contagem das células PC no dia final (dia 5).

Os resultados dessa contagem para as experiências NPC (Tabela 6.1 e 6.2) mostram um desenvolvimento parecido entre as duas incubadoras para as células vivas, porém, existem algumas diferenças entre a quantidade de células mortas, fato este que ocorre porque a IH apresentar uma menor eficiência que a IC.

<b>Semana 2: Experiência Hipóxia (PC)</b>			
<b>Contagem de Células</b>			
<b>Origem</b>	<b>Amostra</b>	<b>Cél. vivas (<math>\times 10^6</math>)</b>	<b>Cél. mortas (<math>\times 10^6</math>)</b>
<b>IH</b>	<b>A</b>	0.02	0.30
	<b>B</b>	0.02	0.16
	<b>C</b>	0.03	0.15
<b>IC</b>	<b>A</b>	0.17	0.23
	<b>B</b>	0.56	0.18

Tabela 6.3: Contagem das células PC no dia final (5to dia). As amostras de origem IC são amostras não pré-condicionadas (NPC).

<b>Semana 4: Experiência Hipóxia (PC)</b>			
<b>Contagem de Células</b>			
<b>Origem</b>	<b>Amostra</b>	<b>Cél. vivas (<math>\times 10^6</math>)</b>	<b>Cél. mortas (<math>\times 10^6</math>)</b>
<b>IH</b>	<b>A</b>	0.02	0.14
	<b>B</b>	0.02	0.25
	<b>C</b>	0.03	0.23
<b>IC</b>	<b>A</b>	0.21	0.20
	<b>B</b>	0.77	0.18

Tabela 6.4: Contagem das células PC no dia final (5to dia). As amostras de origem IC são amostras não pré-condicionadas (NPC).

Esses resultados de contagem para células PC (Tabela 6.3 e 6.4), mostram uma diminuição de células vivas em grande quantidade, o que significa que o PC conseguiu reduzir o número de células em comparação das células NPC, porém, esse estresse provocado ao longo do tempo pelo efeito de pré-condicionamento pode gerar certos mecanismos de adaptação a sobrevivência de algumas células que serão explorados em maior profundidade através de RMN.

## 6.2 Ressonância Magnética Nuclear

Depois de obter as diferentes amostras do cultivo celular, dois grupos de meios de culturas coletadas sempre após 48h e um grupo de extrato de células coletadas após 96h,

estas estão prontas para as experiências de RMN.

Nessa secção apresentaremos os espectros de ressonância das experiências NPC e PC das células e meios de cultura, mostrando os resultados de cada uma delas por separado.

### 6.2.1 Espectros de ressonância de Células - Experiência NPC e PC

Para as amostras na experiência NPC, os espectros obtidos possuem a forma de linha geral apresentada a seguir:

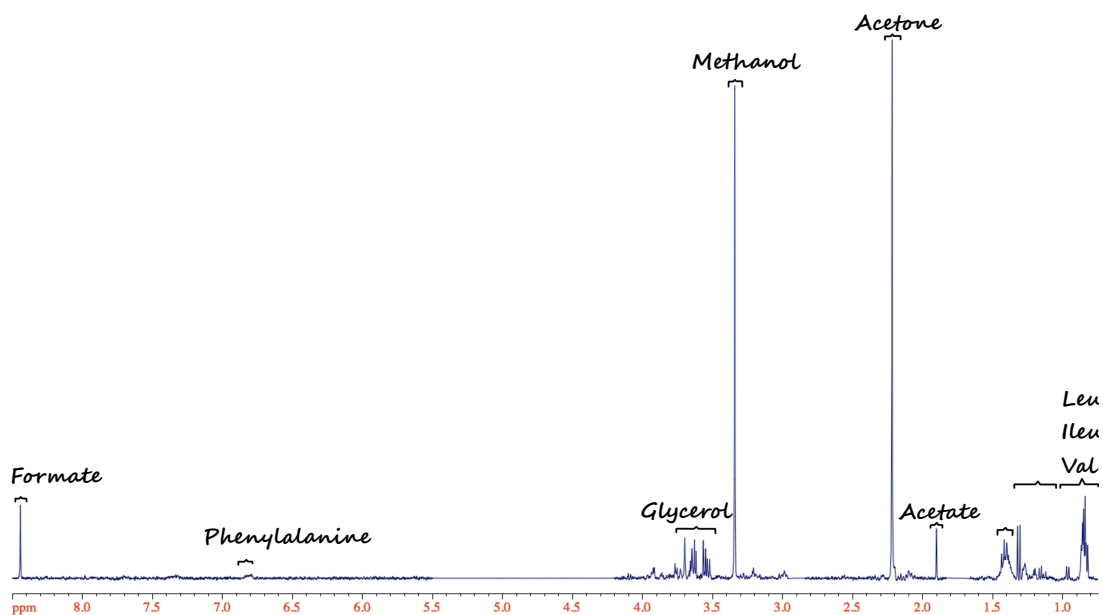


Figura 6.1: Espectro de RMN das amostras não pré-condicionadas, metabólitos identificados no intervalo de 0-8 ppm

Os picos no espectro de ressonância representam os metabólitos presentes na amostras, sendo a identificação dos mesmos realizada com o software *Chenomx*.

Seguindo as mesmas condições que a experiência NPC, os espectros gerados para a experiência PC, possuem a forma de linha geral:



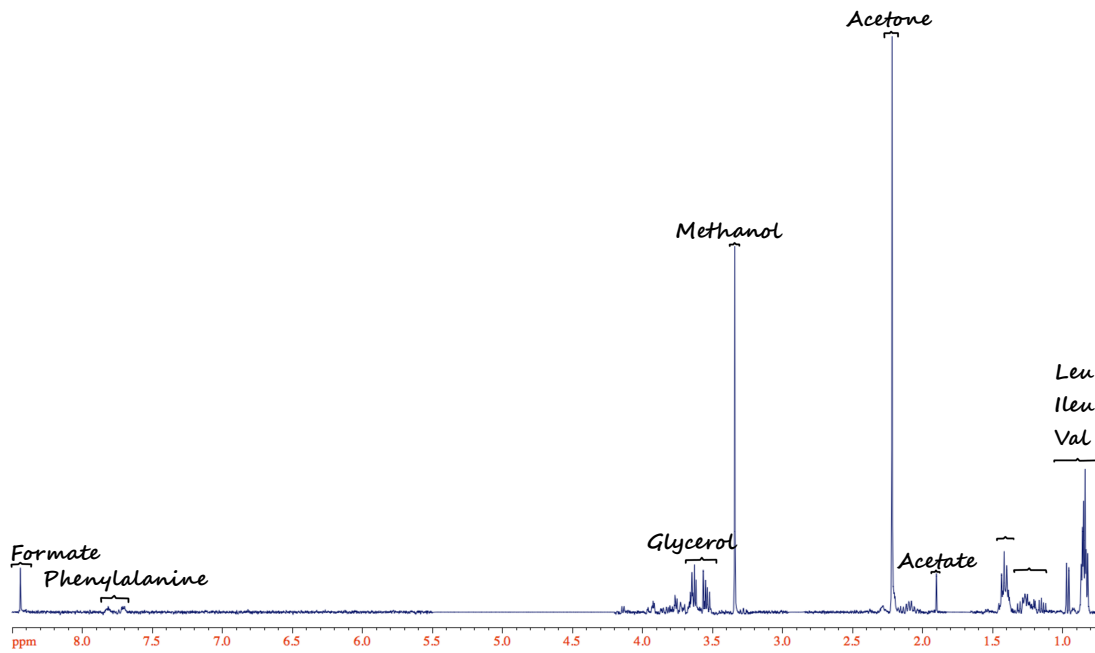


Figura 6.2: Espectro de RMN das amostras pré-condicionadas, metabólitos identificados no intervalo de 0-8 ppm

A primeira vista os gráficos 6.1 e 6.2 parecem não ter diferenças, porém, esses espectros de ressonância das amostras NPC e PC devem ser analisados para identificar e encontrar as concentrações desses metabólitos e construir a matriz multivariada que será analisada pelo *software* MetaboAnalyst, quando tais diferenças podem ser observadas através da análise estatística PLS-DA.

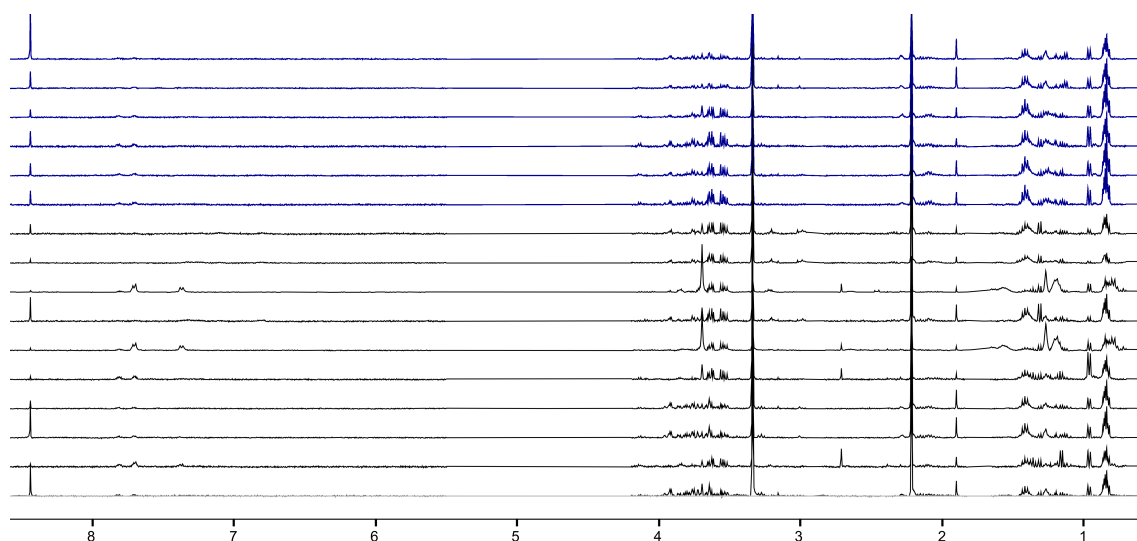


Figura 6.3: Comparação dos diferentes espectros, NPC e PC, linhas de cor azul representam os espectros de ressonância das amostras PC e de cor preta são os espectros NPC.

## Metabólitos identificados nos espectros das amostras de células

Como observamos nos gráficos anteriores foram identificados metabólitos apresentados na seguinte tabela

	Metabólito	Posição/Intervalo (ppm)
1	Isoleucine	0,8
2	Leucine	0,83
3	Valine	0,96
4	Unknow 3	1,31-1,11
5	Lactate	1,31
6	Unknow 2	1,45-1,37
7	Acetate	1,90
8	Unknow 1	2,16-2,04
9	Acetone	2,21
10	Methanol	3,34
11	Glycerol	3,54
12	Phenylalanine	6,9
13	Formate	8,44

Tabela 6.5: Todos os metabólitos presentes nos espectros das amostras NPC e PC e seus respectivos intervalos ou posições de máxima intensidade. 4,6,8 foram metabólitos não encontrados na base de dados do software *Chenomx*

Esses metabólitos foram identificados nos espectros de RMN de NPC e PC. O software *Chenomx*, também fornece uma ferramenta útil para o cálculo das concentrações relativas

de metabólitos presentes nas amostras, as áreas abaixo de cada linha obtidas ou por regiões de integração ou por ajustes lorentzianos e gaussianos. A partir das áreas de cada linha de ressonância, é possível construir a "Matriz Multivariada" contendo as concentrações relativas desses metabólitos conforme mostrado na tabela seguinte.

Formate	Phenylalanine	Glycerol	Methanol	Acetone	Acetate	Valine	Leucine	Isoleucine	Unknow 3	Unknow 2	Unknow 1	Lactate
0.70	2.28	6.76	6.15	9.56	0.65	5.96	13.15	7.52	2.14	7.36	1.69	0.00
0.62	2.40	5.38	5.50	8.39	0.77	5.23	10.63	6.52	3.25	8.48	5.38	0.00
0.76	1.78	6.77	6.39	9.77	0.42	7.73	7.91	4.78	2.23	6.97	7.19	0.00
0.39	1.83	4.63	6.02	6.71	0.51	4.37	11.15	6.94	2.30	6.91	5.97	0.00
0.82	1.04	1.50	23.40	6.68	1.09	3.23	6.72	4.69	1.79	5.05	5.54	0.00
2.84	1.50	1.81	21.79	6.38	1.07	3.53	7.60	3.64	1.59	3.96	5.63	0.00
0.18	3.75	3.41	4.32	1.75	0.21	3.04	4.30	3.30	0.59	1.49	17.17	0.00
1.21	3.03	6.13	8.42	9.10	0.86	1.71	8.43	4.00	1.89	6.50	4.16	2.68
0.08	3.65	3.52	2.67	1.21	0.22	3.24	7.07	4.53	0.53	1.36	14.51	0.94
0.18	3.63	4.06	2.90	7.11	0.33	0.70	2.80	1.28	2.14	5.23	3.16	1.10
0.48	2.47	5.45	10.38	7.99	0.30	1.54	7.29	2.59	2.14	1.33	3.15	1.83
1.53	1.14	2.58	23.32	7.44	0.79	3.77	6.59	3.72	1.98	3.58	4.59	0.60
0.16	3.55	4.05	5.22	3.22	0.52	6.06	4.97	2.81	1.58	4.45	6.03	1.00
1.70	1.81	2.66	8.15	6.11	1.08	4.12	7.92	4.48	2.35	6.19	5.55	0.56
0.37	0.99	2.30	21.49	7.93	0.98	3.82	7.04	3.96	1.89	5.12	4.58	0.42
0.15	3.14	4.90	16.99	3.26	0.32	9.80	5.73	3.53	1.98	4.34	4.90	0.71

Tabela 6.6: Matriz multivariada para todos os metabólitos identificados nos espectros de ressonância das amostras de células NPC e PC

Logo após obter a Tabela 6.6, o uso do software online MetaboAnalyst é necessário para obter informação sobre os metabolitos responsáveis pelas diferenças nas amostras NPC vs PC.

## 6.2.2 Espectros de ressonância de meios de cultura - Experiência NPC e NP

Os espectros de ressonância para o meio de cultura NPC e PC, estão representados abaixo nas figuras número 6.4 e 6.5.

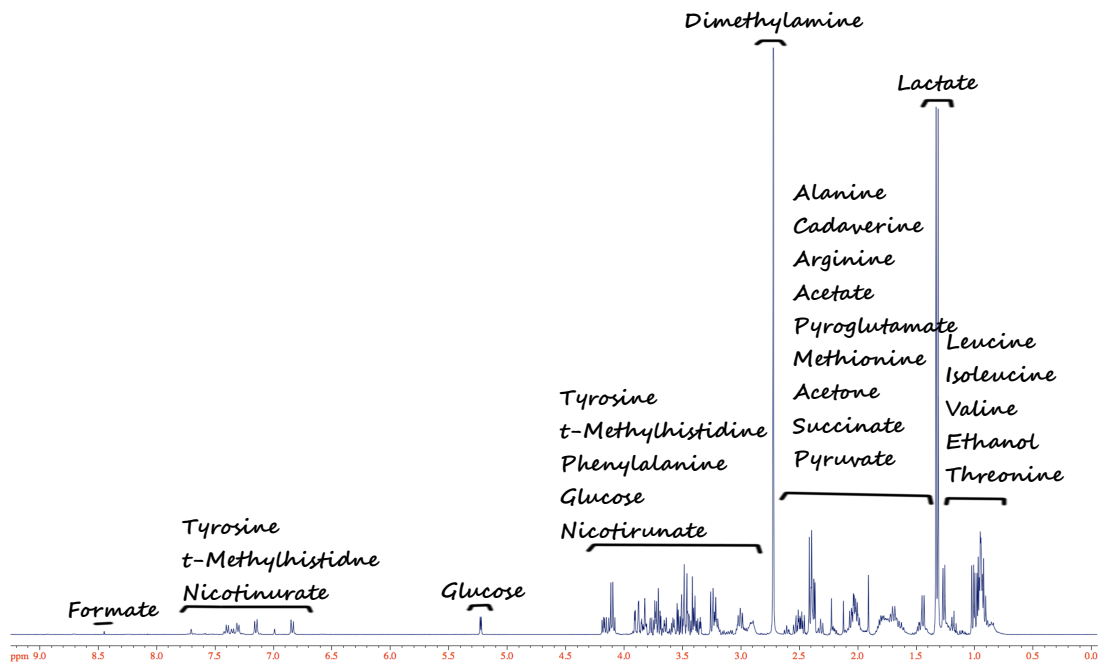


Figura 6.4: Metabólitos identificados no espectro de RMN de meio de cultivo não pré-condicionado

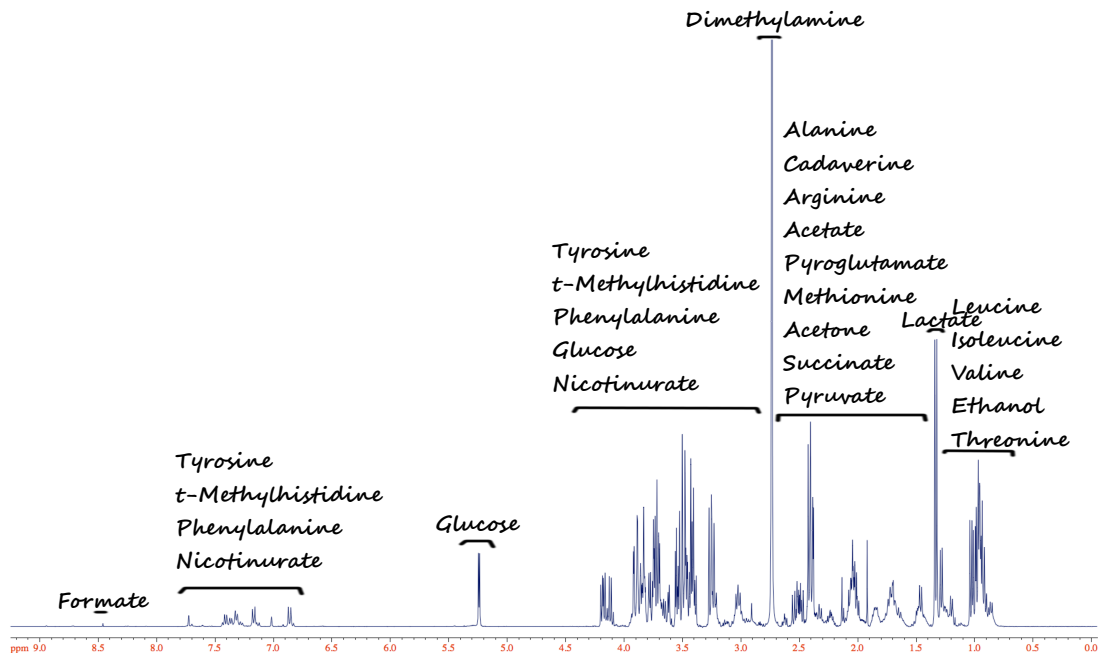


Figura 6.5: Metabólitos identificados no espectro de RMN de meio de cultivo pré-condicionado

Podemos observar que as figuras 6.4 e 6.5 existem diferenças de intensidades dos picos no espectro, porém os metabólitos presentes são idênticos.

1	Metabólito	Posição (ppm)
2	leucine $\diamond$	0.9; 1.0; 1.2 ;1.5 ;2 ;3.7
3	Isoleucine $\diamond$	0.9; 1.0; 1.7; 3.7
4	Valine $\diamond$	1.0; 2.3; 3.6
5	Ethanol	1.2; 3.6
6	Threonine $\diamond$	1.3; 3.6; 4.3
7	Lactate	1.3; 4.1
8	Alanine	1.5; 3.8
9	Cadaverine	1.5; 1.7; 3.0
10	Arginine $\diamond$	1.6; 1.7; 1.9; 3.2; 3.8; 6.7; 7.2
11	Acetate	1.9
12	Pyroglutamate	2.0; 2.4; 2.5; 4.2; 7.7
13	Methionine $\diamond$	2.1; 2.2; 2.6; 3.9
14	Acetone	2.2
15	Succinate	2.4
16	Pyruvate	2.4
17	Dimethylamine	2.7
18	Tyrosine $\diamond$	3.0; 3.2; 3.9; 6.9; 7.2
19	t-Methylhistidine	3.1; 3.2; 3.7; 4.0; 7.0; 7.7
20	Phenylalanine $\diamond$	3.1;3.3; 4.0; 7.3; 7.4
21	Glucose $\diamond$	3.2; 3.4; 3.5; 3.7; 3.8; 3.9; 4.6; 5.2
22	Nicotinurate	4.0; 7.6; 8.2; 8.7; 8.8; 8.9
23	Formate	8.4

Tabela 6.7: Todos os metabólitos identificados no espectros das amostras NPC e PC e seus respectivos intervalos.  $\diamond$ : Metabólitos presentes no meio de cultura.

Tendo os mesmos procedimentos dos espectros das amostras de células, a matriz Multivariada obtida para as amostras de meio de cultura é mostrada no Apêndice C.

### 6.3 Análise Estatística PLS-DA

Nos estudos de metabolômica, todo o processamento estatístico deve realizar-se tomando em conta algumas ações preventivas com respeito a normalização de dados espectroscópicos para evitar erros nos resultados gerados. Nesse trabalho utilizou-se dois métodos de normalização: primeiro, ajusta-se o eixo X dos deslocamentos químicos, colocando a sinal DSS a 0 ppm e reescalando o eixo Y, correlacionando a área do sinal de DSS com a concentração correspondente dessa molécula nas amostras, no caso das amostras de células é 0.5mM e 5.0mM para meios de cultura. A segunda, normalização espectral aplicada para células e meio de cultura, realizou-se com o cálculo da área total de seus respectivos espectros entre 0.7 a 8.6 ppm, sem ter em conta o intervalo de sinal de água

residual (4.2 - 5.5ppm), e dividindo as intensidades pelas áreas totais de cada espectro.

Essas ações corrigem, respectivamente, problemas relativos a alterações no pH da amostra que poderiam deslocar as linhas de alta resolução e ligeiras alterações no espectrômetro de ressonância de ganho que poderiam distorcer as intensidades de sinal (primeira normalização), e mudanças na massa liofilizada de células ou meios dos mesmos, que pode afetar a composição das áreas de metabólitos no espectro (segunda normalização). Além disso, uma terceira normalização dos dados também foi aplicada, desta vez, no método estatístico multivariado utilizado por este trabalho, o "Partial Least Squares-Discriminant Analysis"[50]. A normalização consistiu em redimensionar todas as variáveis de entrada do método, correspondendo aos valores de área encontrados nos espectros atribuídos aos metabólitos, centrando a média e dividindo pelo desvio padrão de seu correspondente evitando que grandes diferenças entre suas magnitudes pudessem resultar em resultados imprecisos.

### 6.3.1 Análise Multivariada PLS-DA Condição Normóxia

Depois de obter as matrizes multivariadas de ambos casos (NPC e PC), o objetivo deste trabalho é explicar as diferenças entre células PC e células NPC, fazendo comparações do tipo NPC vs PC, analisando-as através da técnica estatística PLS-DA, no *software* MetaboAnalyst.

Para iniciar a discussão sobre os metabólitos gerados depois do processo de pré-condicionamento, em primeiro lugar, devemos identificar os metabólitos "basais" no cultivo "normal" (Normóxia) dos cardiomiócitos, isto é, devemos identificar quais metabólitos não são gerados pela consequência do processo de pré-condicionamento celular (Hipóxia - Normóxia). Para desenvolver essa análise, tivemos que cultivar células no modo Normóxia, cultivando-as nas mesmas condições nas duas incubadoras, isto é, colocamos nas incubadoras uma placa de cultivo celular de seis poços com uma quantidade de  $5 \times 10^5$  de células aproximadamente, tanto na IH como IC, após de 96h essas células foram coletadas para analisar e identificar esses metabólitos. Esses metabólitos gerados pela diferença de eficiência das incubadoras não serão tomadas em conta na análise de pré-condicionamento.

Para este caso foram avaliados dois grupos, as amostras de origem IC e de origem IH. Após da obtenção da matriz multivariada para esse caso, obtemos os gráficos de *scores*

plots e *VIP score* fornecidos pelo *software online* MetaboAnalyst.

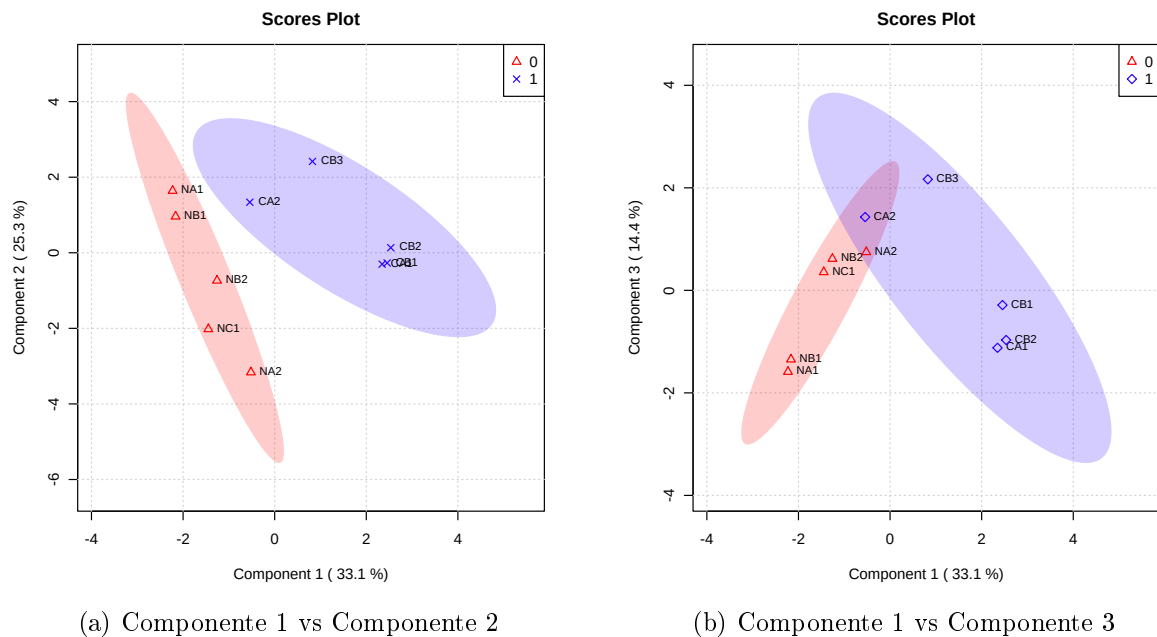


Figura 6.6: Avaliação de dois grupos de amostras de diferentes origens, as amostras de cor vermelha ( $\Delta$ ) são de origem IC e as amostras de cor preta (+) são de origem IH. Foram avaliadas 2 combinações de componentes, comp. 1 vs. comp. 2 e comp. 1 vs. comp. 3. Os valores entre parênteses representam a contribuição de cada componente para explicar o modelo gerado.

É importante descrever os gráficos mostrados acima, já que esses resultados de *scores plots* e também *VIP score* que serão mostrados daqui em diante nos fornecerão os mesmos parâmetros da análise estatística multivariada. Como já foi mencionado, nesse trabalho foi utilizado o método supervisionado PLS-DA que está baseado na teoria de *Principal Components Analysis* (PCA) ou Análise de Componentes Principais (ACP), que utiliza as variáveis originais e transforma-las em outro conjunto de variáveis chamadas componentes principais que carregam a informação estatística e reduzem a dimensionalidade do problema de forma a facilitar a interpretação dos resultados gerados. Cada uma das componentes principais são uma combinação linear de todas as variáveis originais, além de ser independentes entre si. Por consequência o PLS-DA gera representações gráficas em termos de 2 a 5 componentes que podem ser visualizadas num espaço bidimensional ou tridimensional. Estes gráficos são denominados *score plot* e mostram os novos eixos que são construídos pelas componentes principais.

Retomando o gráfico 6.6, observamos nos eixos as duas principais componentes com suas respectivas contribuições (%) para a explicação da covariância total, componente 1 (33.1%) e componente 2 (25.3%), explicando no total um 58.4% da covariância da matriz

de dados. Além, temos basicamente uma leve tendência de agrupamento entre os grupos apresentados, sugerindo uma similaridade entre os resultados obtidos nas duas incubadoras na condição de normóxia. Porém, ainda tendo esse resultado não se pode afirmar qual é a lista de metabólitos que indique alguma diferença entre os grupos avaliados, é por essa razão que devemos observar os resultados de *VIP score* resumidos nos gráficos seguintes

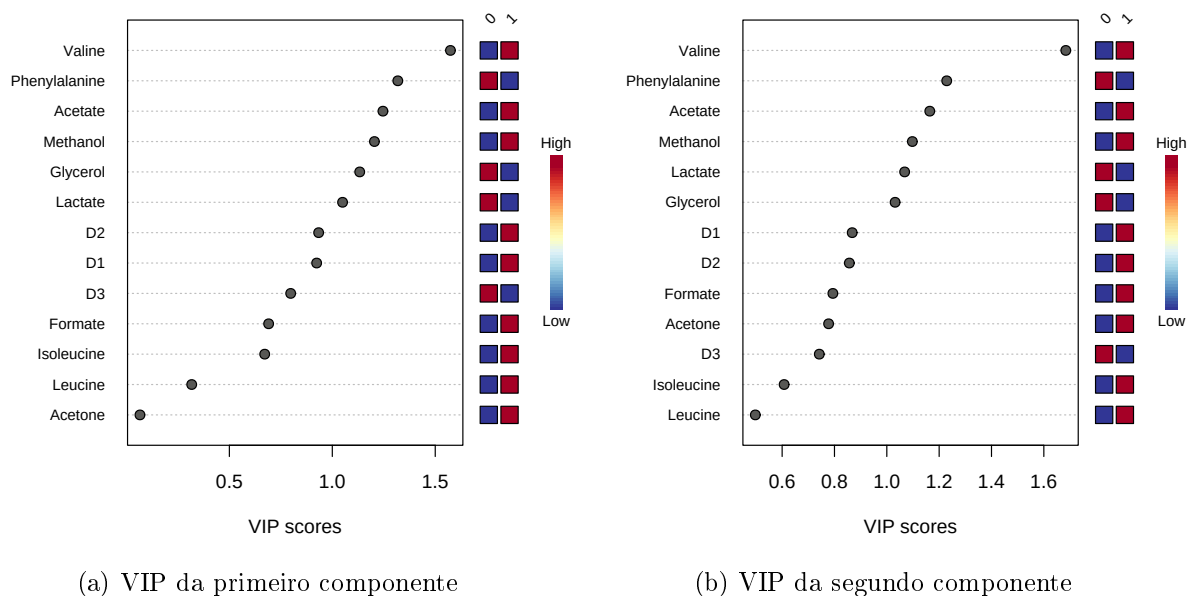


Figura 6.7: Metabólitos identificados como possíveis classificadores de grupo. Os valores de 0 e 1, representam os grupos avaliados, nesse caso 0 é IH e 1 IC, a escala de cores representa a concentração nos grupos.

Chamado VIP do inglês *Variable Influence on Projection*, como indica o nome, as variáveis que apresentam um valor maior a 1 [51], em geral, representam uma maior influência na separação dos grupos e que as caixas coloridas indicam a concentração relativa do metabólito para cada um dos grupos avaliados ou estudados. Por exemplo para o metabólito Glycerol, no grupo IH apresenta maior concentração comparado com IC.

Existem mais dois parâmetros estatísticos,  $R^2$  e  $Q^2$ , que são os coeficientes de determinação da análise de regressão relacionados a qualidade de ajuste e qualidade de predição, respectivamente. O parâmetro  $R^2$  reflete a capacidade do modelo para explicar dados brutos.  $R^2$  varia entre 0 e 1, onde 1 indica modelo perfeito e 0 indica que o modelo não é confiável ou não existe modelagem.  $Q^2$  mede o poder preditivo do modelo, isto é, capacidade do modelo de predição de resultados em amostras desconhecidas. Esses parâmetros



também foram fornecidos pelo MetaboAnalyst e serão apresentados nos diversos casos daqui em diante. Para esse caso  $R^2$  e  $Q^2$  foram 0.8 e 0.4 respectivamente. Finalmente, nesse estudo foram utilizadas apenas as duas primeiras componentes principais já que não existe um ganho significativo na precisão caso adicionássemos a terceira componente, mantendo  $Q^2$  e  $R^2$  próximos a 1. A utilização de um número maior ao necessário pode resultar na inclusão de informações desnecessárias ao modelo, tornando-o superajustado e comprometer sua capacidade preditiva [52].

Retomando o gráfico 6.7, os metabolitos que apresentam valor maior a 1 foram analisados através de análise univariada (Test-t) para garantir que esses metabolitos têm significância estatística ( $\rho < 0.05$ ). A análise univariada está resumida na Tabela 6.8, tabela que oferece informação sobre as área relativas e os valores entre parêntesis são os respectivos desvio padrão para dados de distribuição normal. Daqui em diante serão apresentados apenas o gráfico de VIP da componente 1 devido que os gráficos VIP das diversas componentes apresentam basicamente os mesmos metabolitos com valores maiores a 1, dessa forma evitamos apresentar informação repetitiva.

Teste-t			
	IH	IC	$\rho$
<b>Glycerol</b>	4,52(1.21)	3.30(1,12)	0,142
<b>Valine</b>	2.05(1.07)	5.51(2.57)	0.039
<b>Phenylalanine</b>	3.30(0.54)	2.13(1.16)	0.095
<b>Methanol</b>	7.74(4.23)	15.04(8.03)	0.122
<b>Acetate</b>	0.39(0.27)	0.74(0.31)	0.101
<b>Isoleucine</b>	3.14(1.27)	3.70(0.61)	0.416
<b>Acetone</b>	5.44(3.68)	5.59(2.25)	0.937
<b>Lactate</b>	1.31(1.01)	0.65(0.21)	0.228
<b>D2</b>	3.19(2.49)	4.73(0.97)	0.252
† <b>D1</b>	1.84	1.94	0.602
† <b>D3</b>	4.16	4.09	0.602

Tabela 6.8: Os valores médios e seu respectivo desvio padrão dos metabolitos presentes em ambos grupos. O metabolito destacado apresenta significância estatística. † foi utilizado o Kruskal-Wallis, indicado para distribuições de dados não-normais (não-gaussianas).

Observamos que apenas um desses metabólitos apresenta  $\rho < 0.05$  com incremento de 168.7% no grupo de IC respeito a IH. Para encontrar a porcentagem de incremento ou diminuição foi utilizada a formula:  $\frac{M_2 - M_1}{M_1} \times 100$ , onde  $M_1$  é concentração no primeiro grupo,  $M_2$  concentração no segundo grupo. O metabolito encontrado é importante para descontar a contribuição da valine dos metabólitos que serão encontrados quando as células serão

pré-condicionadas, isto é, se encontramos a valine dentro do gráfico VIP na experiencia de pré-condicionamento, não será tomado em conta devido a que esse metabolito é gerado pela diferencia de eficiência entre as incubadoras.

### 6.3.2 Análise Multivariada PLS-DA Condição Hipóxia-Normóxia

Nessa secção serão apresentadas as análises dos resultados das amostras que foram pré-condicionadas. Os metabólitos que foram encontrados nessa experiencia serão denominados metabólitos de pré-condicionamento *cell's Pre-Conditioning metabolites* (cPCm), tendo como gráficos de *scores plots* e VIP os seguintes.

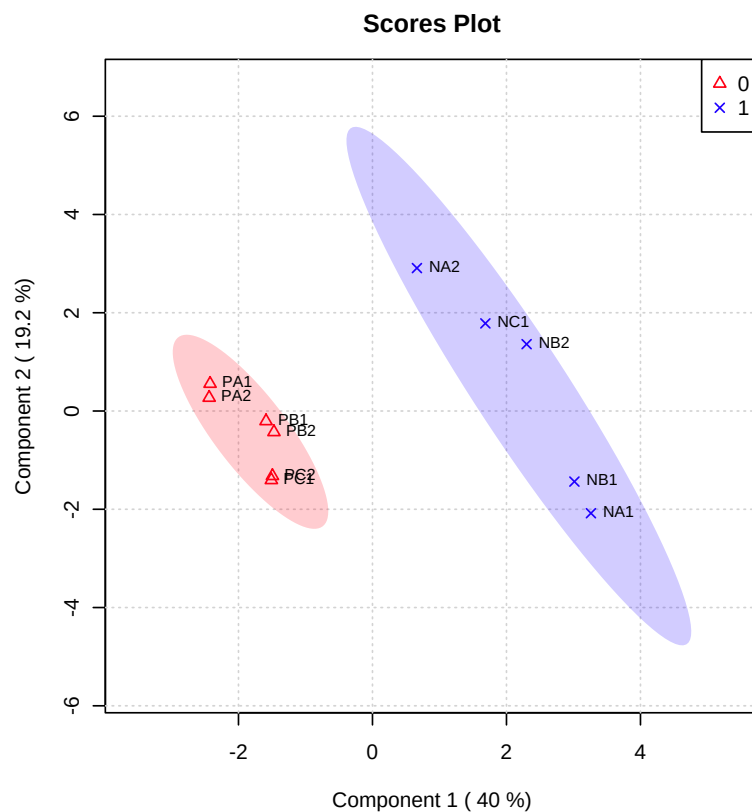


Figura 6.8: Gráfico de *scores* para os grupos pré-condicionados (grupo PC, 0) e não pré-condicionados (grupo NPC, 1).

No gráfico 6.8 pode-se observar, que existe uma tendencia de agrupamento para os grupos PC e NPC, com uma explicação da covariância total de 59.2%, o gráfico de VIP score é mostrado na Figura 6.9.

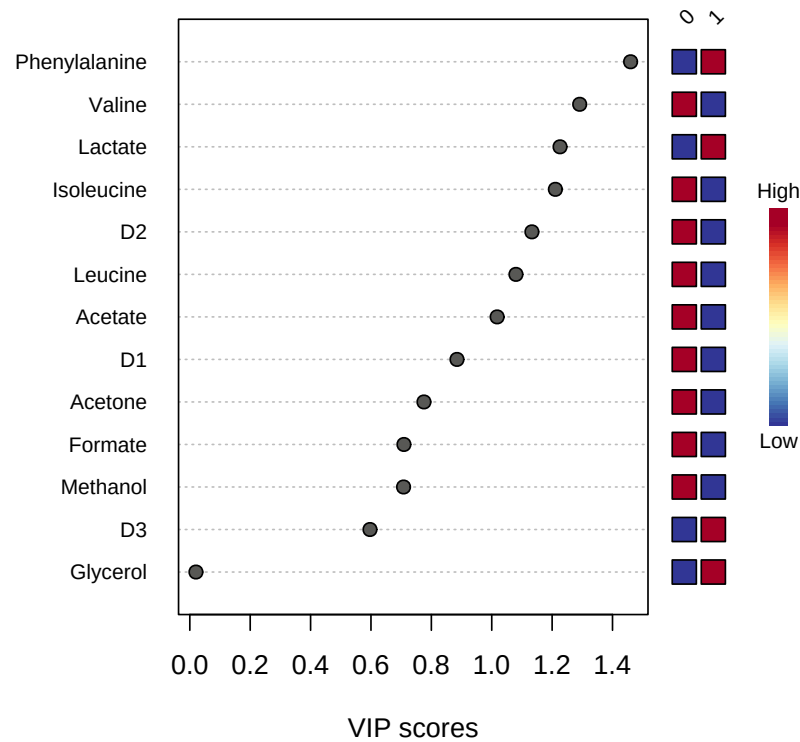


Figura 6.9: Metabólitos identificados como possíveis classificadores de grupo, grupo PC (0) e NPC (1).

O gráfico 6.9 mostra os metabólitos a serem analisados e a concentração relativa em cada grupo de avaliação. Metabólitos com valores maiores a 1, poderiam ser os classificadores de grupo e, por esse motivo, são direcionados para a análise univariada (Test-t) que resulto na seguinte tabela:

Análise univariada <b>Teste-t</b>			
	PC	NPC	$\rho$
<b>Phenylalanine</b>	1.79(0.50)	3.30(0.54)	0.001
<b>Valine</b>	5.01(1.68)	2.05(1.07)	0.008
<b>Leucine</b>	9.53(2.50)	5.98(2.34)	0.041
<b>Isoleucine</b>	5.69(1.53)	3.14(1.27)	0.017
<b>Acetate</b>	0.75(0.28)	0.38(0.27)	0.059
<b>D2</b>	6.46(1.65)	3.18(2.49)	0.046
† <b>Lactate</b>	0.001	1.10	0.011
† <b>Acetone</b>	7.55	7.11	0.830

Tabela 6.9: Valores médios e respectivos desvio padrão dos metabólitos presentes em ambos grupos. Metabólito destacados apresentam significância estatística. † foi utilizado o test Kruskal-Wallis.

A Tabela 6.9 mostra os diferentes metabólitos presentes nos diferentes grupos de ava-

liação, com os metabólitos destacados apresentando significância estatística ( $\rho < 0.05$ ). Observamos que Phenylalanine, Valine, Leucina, Isoleucina e D2, são responsáveis pelo agrupamento no gráfico 6.8. Em termos percentuais, observa-se que na condição de PC comparado com NPC, apresentam um porcentagem de 45.7%, 144.3% 59.1%, 80.2% e 102.8%, respectivamente, com sinal negativo representando uma diminuição na concentração. Então, podemos afirmar que os cinco de seis metabólitos encontrados nesse caso são metabólitos pré-condicionantes ou cPCm. Devido a que o metabólito Valine no caso anterior foi identificado como classificador, devemos descartá-lo porque é gerado pela diferencia de eficiência.

### 6.3.3 Análise Multivariada PLS-DA para Meios de Cultura

Para apresentar uma análise adequada nos meios de cultura de células, também, é necessário identificar os metabólitos "basais" que são gerados pela diferença de eficiência nas incubadoras. Porém, devemos mencionar que, nas amostras de meio de cultura existem amostras que foram coletadas em diferentes tempos (48h e 96h). É por essa razão que devemos ter em conta o tempo na qual as amostras foram coletadas, afim de obtermos uma boa comparação entre essas amostras. No primeiro caso, foram identificados os metabólitos gerados pela diferença de eficiência entre IH e IC, e os metabólitos gerados a partir do desenvolvimento natural das células ao transcorrer o tempo (Normóxia), isto é, existem metabólitos que são gerados naturalmente quando se tem um tempo de cultivo grande, em nosso caso de 96h. Identificaremos a esses metabólitos como "media's Dynamic Basal metabolites" (mDBm). Segundo caso, serão identificados os metabólitos gerados pelo pré-condicionamento com diferentes tempos de coleta, sem ter em conta os metabólitos do caso primeiro. Os metabólitos encontrados nesse caso serão denominados "media's Dynamic Pré-conditioning metabolites"(mDPm). Terceiro caso, além de ter mDPm, ao passar o tempo de cultivo celular, existiram metabólitos que persistiram no tempo na comparação PC com NPC, isto é, metabólitos que apresentam-se tanto em 48h como em 96h. Denominaremos a esses metabólitos como "media's time Persistent Pré-conditioning metabolites-hh", hh=48h ou 96h (mPPm-hh). Analisaremos cada um desses metabólitos que causam o agrupamento nos diferentes casos.

### 6.3.3.1 Primeiro Caso: Condição Normóxia

Em primeiro lugar, serão comparados os grupos IC48h vs IH48h, e a seguir também compararemos IC96h vs IH96h. Essas comparações são necessárias para isolar o efeito relacionado com a diferença de eficiência das incubadoras. Os gráficos gerados pelo MetaboAnalyst de *scores* e VIP estão resumidos, respectivamente nas Figuras 6.10 e 6.11 e Figuras 6.12 e 6.13

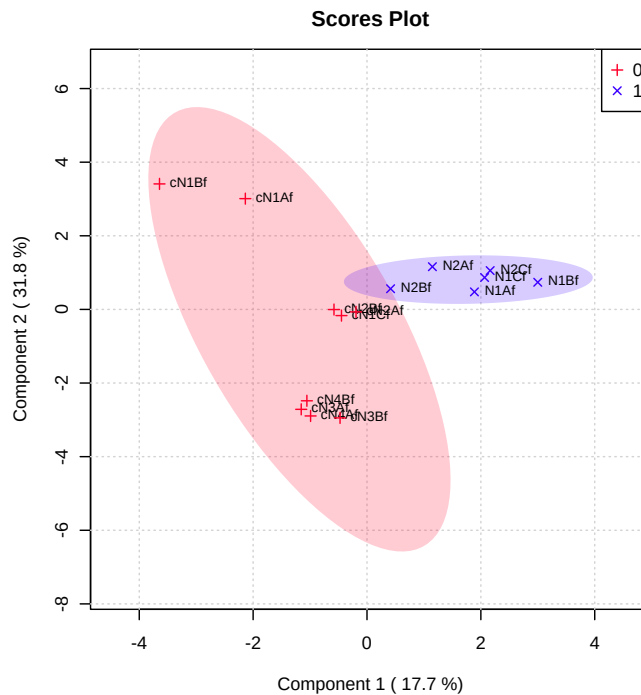


Figura 6.10: Grupos comparados após 48h, 0 representa ao grupo IC e 1 representa ao grupo IH.

No gráfico da figura 6.10, pode ser observado que tendência de agrupamento é quase inexistente, o que seria um resultado até certa forma esperado e desejável, mostrando que nossa incubadora se aproxima muito das características de uma incubadora comercial. As componentes 1 e 2 representa 49.5% de covariância total para 48h, com valores nos parâmetros  $R^2$  e  $Q^2$  de 0.82 e 0.46 respectivamente

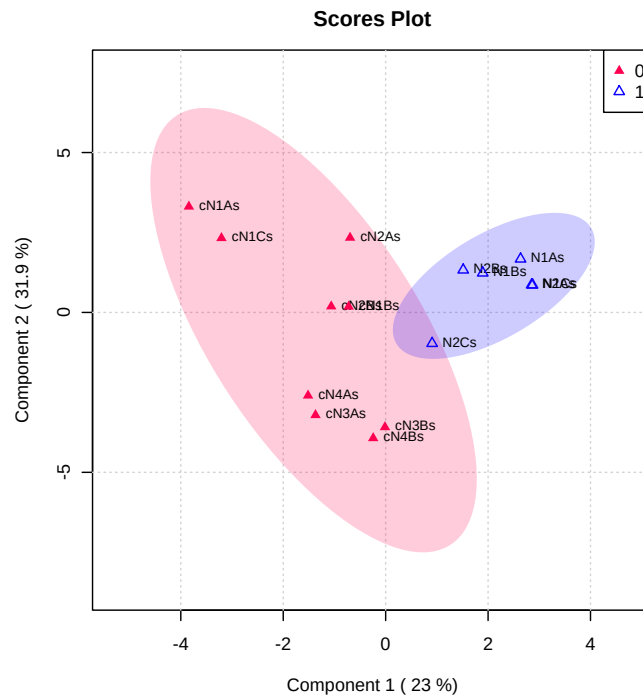


Figura 6.11: Grupos comparados após 96h de desenvolvimento celular, 0 representa ao grupo IC e 1 representa ao grupo IH.

No gráfico da Figura 6.11, após 96h de cultivo dos cardiomiócitos, também é observado que quase não existe tendência de agrupamento, como no resultado anterior. As componentes 1 e 2 representa 54.9% de covariância total para 96h, com valores nos parâmetros  $R^2$  e  $Q^2$  0.81 e 0.47 respectivamente

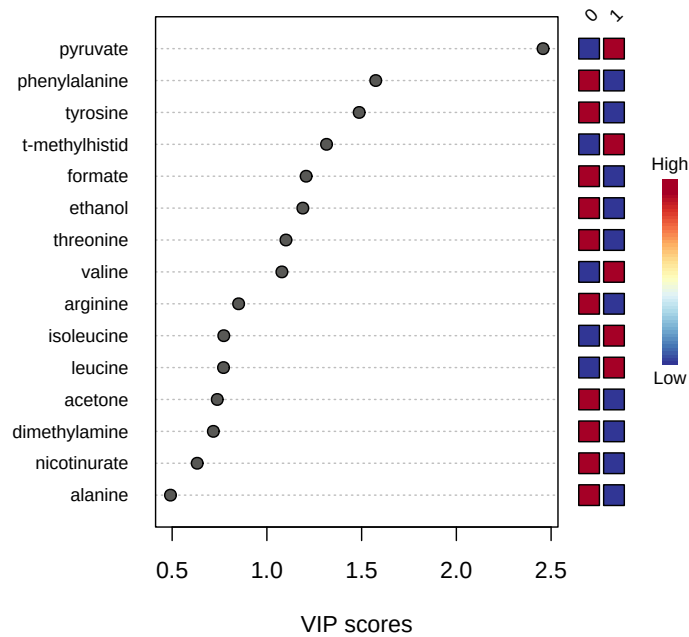


Figura 6.12: Metabólitos identificados como possíveis classificadores de grupo IH vs IC após 48h. 0 e 1 representa IC e IH respectivamente.

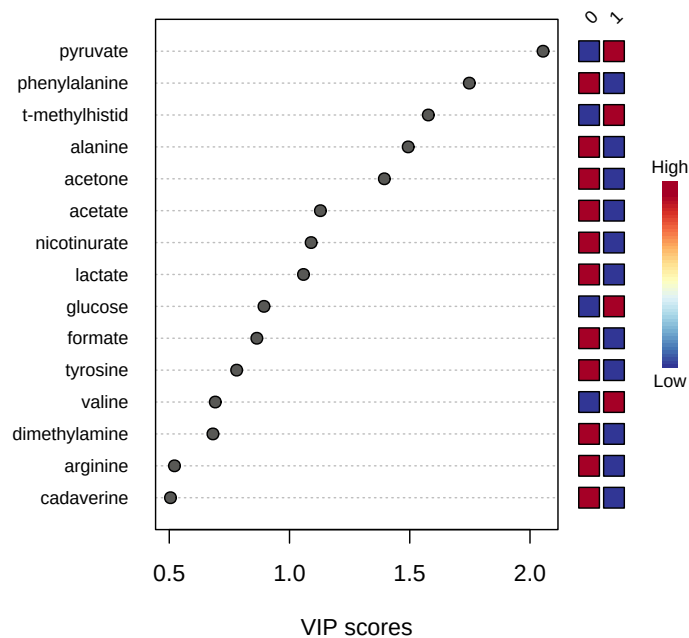


Figura 6.13: Metabólitos identificados como possíveis classificadores de grupo IH vs IC após 96h. 0 e 1 representa IC e IH respectivamente.

O gráficos 6.12 e 6.13 mostrados apresentam aqueles metabólitos que devem ser analisadas através de estatística univariada que resultou na seguinte tabela de Test-t.

Teste T - NPC(48h) IC vs IH			
	IC	IH	$\rho$
<b>Pyruvate</b>	0.68(0.13)	1.03(0.15)	0.002
<b>Phenylalanine</b>	0.66(0.09)	0.56(0.08)	0.057
<b>t-methylhistidine</b>	0.66(0.08)	0.73(0.05)	0.087
<b>Ethanol</b>	0.77(0.24)	0.59(0.19)	0.143
<b>Threonine</b>	1.68(0.40)	1.51(0.08)	0.136
<b>Arginine</b>	2.52(0.61)	2.24(0.29)	0.266
<b>Isoleucine</b>	2.00(0.35)	2.15(0.15)	0.310
<b>Leucine</b>	2.39(0.39)	2.56(0.22)	0.324
<b>Acetone</b>	0.20(0.14)	0.15(0.07)	0.336
† <b>Tyrosine</b>	1.09	0.95	0.236
† <b>Formate</b>	0.13	0.12	0.141
† <b>Valine</b>	2.25	2.24	0.517

Tabela 6.10: Grupos comparados IC vs IH após de 48h de desenvolvimento celular, apresentando um metabólitos com significância estatística ( $\rho < 0.05$ ).

Teste T - NPC (96h) IC vs IH			
	IC	IH	$\rho$
<b>Pyruvate</b>	0.10(0.13)	1.24(0.31)	0.005
<b>Phenylalanine</b>	0.78(0.11)	0.60(0.08)	0.005
<b>Alanine</b>	1.51(0.38)	1.10(0.08)	0.014
<b>Acetone</b>	0.22(0.10)	0.11(0.07)	0.031
<b>Glucose</b>	6.46(3.89)	8.63(1.22)	0.151
<b>lactate</b>	12.48	7.06	0.077
<b>Nicotinurate</b>	0.07	0.07	0.099
<b>Tyrosine</b>	1.21	1.02	0.157
<b>Formate</b>	0.27	0.14	0.022
<b>t-methylhistidine</b>	0.74	0.86	0.028

Tabela 6.11: Grupos comparados IC vs IH após 96h de desenvolvimento celular, apresentando seis metabólitos com significância estatística ( $\rho < 0.05$ ).

Os metabólitos destacados apresentam significância estatística. Então, Pyruvate, Phenylalanine, Alanine, Acetone, formate e t-Methylhistidine serão excluídos quando for analisado o caso de pré-condicionamento celular nos respectivos tempos de 48h e 96h.

Como já foi descrito anteriormente, também devemos descontar os metabólitos que são gerados pela consequência do desenvolvimento natural das células. Então, nessa situação foram comparados os grupos, IC48h vs IC96h e IH48h vs IH96h. Os gráficos gerados pelo MetaboAnalyst de *scores* e VIP estão resumidos, respectivamente, nas Figuras 6.14 e 6.15 e Figuras 6.16 e 6.17



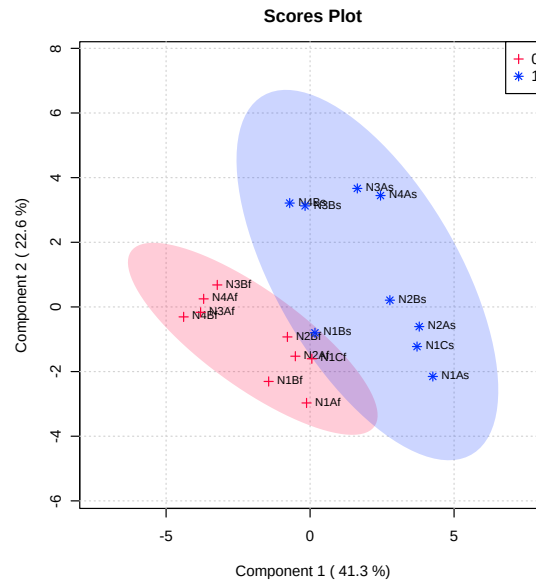


Figura 6.14: Grupos comparados IC48h vs IC96h. 0 representa o grupo IC48h e 1 representa IC96h.

Na Figura 6.14, pode ser observado que o agrupamento não é destacável, porém devemos analisar o gráfico de VIP. As componentes 1 e 2 representam 63.9% da covariância total do problema. Os parâmetros  $R^2$  e  $Q^2$  com valores de 0.80 e 0.59 respectivamente.

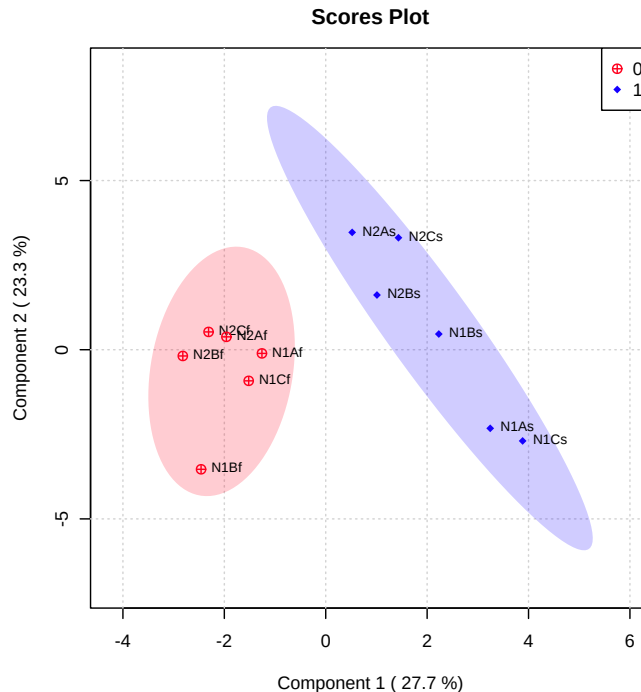


Figura 6.15: Grupos comparados IH48h vs IH96h. 0 representa o grupo IH48h e 1 representa IH96h.

O gráfico da Figura 6.15 mostra que existem uma tendencia de agrupamento, os componentes 1 e 2 representam 61% da covariância total do problema. Os parâmetros  $R^2$  e

$Q^2$  com valores de 0.92 e 0.54 respectivamente, e os gráficos de VIP

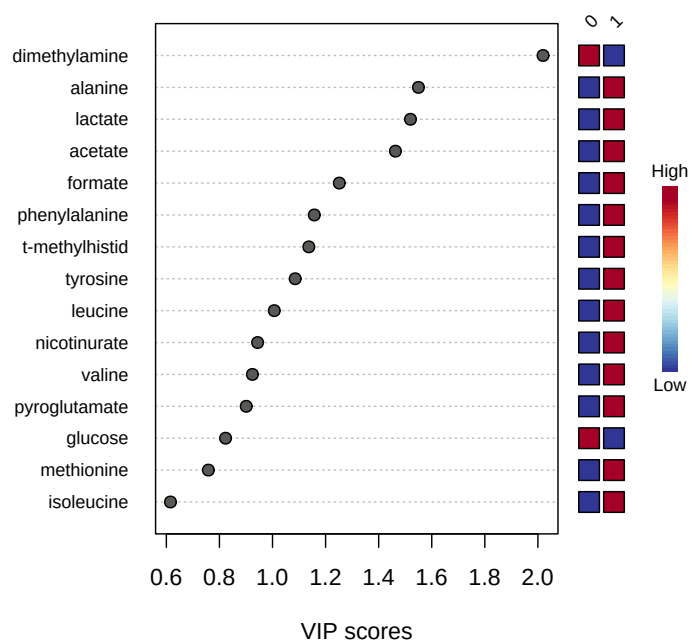


Figura 6.16: Metabólitos identificados como possíveis classificadores de grupo. 0 e 1 representam aos grupos IC48h e IC96h respectivamente.

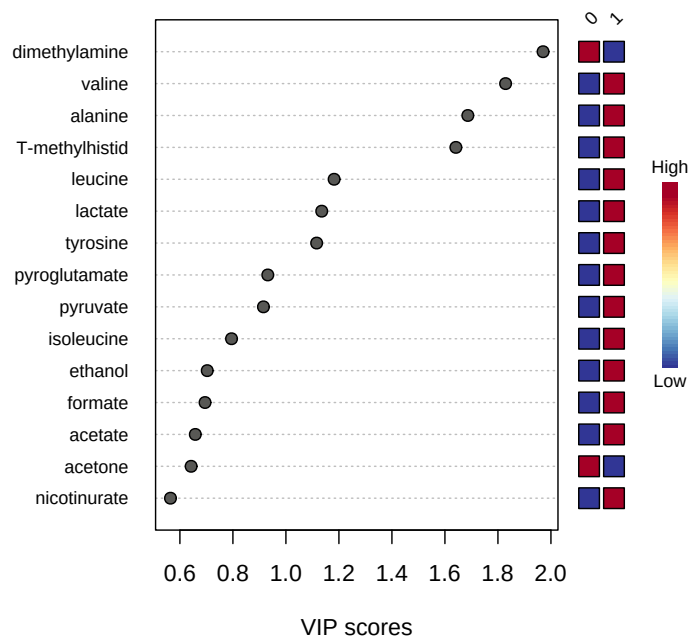


Figura 6.17: Metabólitos identificados como possíveis classificadores de grupo. 0 e 1 representam aos grupos IH48h e IH96h respectivamente.

Nas Figuras 6.16 e 6.17, observamos a existência de diversos metabólitos classificadores

de grupo, analisados pela estatística univariada, resultando nas seguintes tabelas.

Teste T - IC(NPC) 48 e 96h			
	48h	96h	$\rho$
<b>Alanine</b>	0.98(0.39)	1.51(0.38)	0.004
<b>Acetate</b>	0.84(0.12)	1.03(0.11)	0.005
<b>Phenylalanine</b>	0.66(0.09)	0.78(0.11)	0.034
<b>t-Methylhistidine</b>	0.66(0.08)	0.75(0.07)	0.037
<b>Tyrosine</b>	1.05(0.13)	1.21(0.17)	0.048
<b>Leucine</b>	2.39(0.39)	2.82(0.53)	0.071
<b>Valine</b>	2.10(0.24)	2.34(0.32)	0.100
<b>Pyroglutamate</b>	5.59(0.95)	6.44(1.12)	0.108
† <b>Dimethylamine</b>	10.64	0.36	0.001
† <b>Lactate</b>	5.56	12.48	0.012
† <b>Formate</b>	0.13	0.27	0.008
† <b>Nicotinurate</b>	0.06	0.07	0.078

Tabela 6.12: Diferentes metabólitos classificadores de grupo com significância estatística para o grupo IC48h vs IC96h. † : utilizado test Kruskal-Wallis

Teste T - IH(NPC) 48h e 96h			
	48h	96h	$\rho$
<b>Valine</b>	2.24(0.05)	2.48(0.10)	0.002
<b>Alanine</b>	0.94(0.05)	1.10(0.08)	0.005
<b>T-Methylhistidine</b>	0.73(0.05)	0.84(0.05)	0.006
<b>Leucine</b>	2.56(0.22)	2.82(0.22)	0.073
<b>Pyruvate</b>	1.03(0.15)	1.24(0.31)	0.188
<b>Isoleucine</b>	2.15(0.15)	2.32(0.31)	0.257
† <b>Dimethylamine</b>	9.93	0.26	0.004
† <b>Lactate</b>	4.93	7.06	0.055
† <b>Tyrosine</b>	0.95	1.02	0.013
† <b>Pyroglutamate</b>	5.37	5.59	0.055

Tabela 6.13: Diferentes metabólitos classificadores de grupo com significância estatística para o grupo IH48h vs IH96h. † : utilizado test Kruskal-Wallis

As Tabelas 6.12 e 6.13 mostram os diferentes metabólitos classificadores de grupo, sendo aqueles destacados apresentando significância estatística. Observamos que Valine, Alanine, t-Methylhistidine, Dimethylamine e Tyrosine, apresentam 10.7%, 17.1%, 15.0%, -97.3% e 7.3% respectivamente, quando comparamos 96h com 48h sobre os metabólitos identificados na Tabela 6.13. Conforme mencionado anteriormente o sinal negativo significa uma diminuição na concentração, os demais casos experimentam um aumento na concentração. Os metabólitos destacados em azul na Tabela 6.12 são então comparados com os da Tabela 6.13 para serem descontados dos metabólitos do grupo mDBm.

Esse processo de exclusão foi planejado uma vez que estamos utilizando a incubadora de hipóxia no modo normal para gerar a condição basal das células, condição esta que foi posteriormente comparada com a condição de pré-condicionamento.

### 6.3.3.2 Segundo Caso: Condição Pré-condicionamento Dinâmico

Aqui teremos comparação de dois grupos, ambos coletados com tempos diferentes de pré-condicionamento. O primeiro grupo foi coletado após 48h de pré-condicionamento, o segundo grupo coletado 48h depois da primeira coleta. O gráfico de *scores* está resumido pela Figura 6.18 abaixo

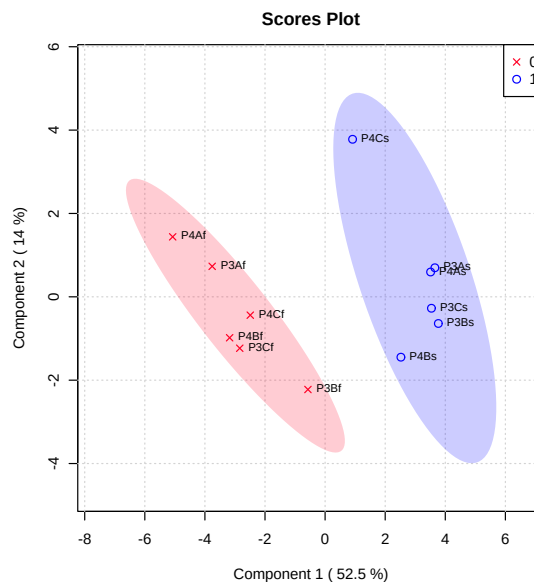


Figura 6.18: Grupo PC 48h (0) e grupo PC 96h (1).

O gráfico 6.18 mostra tendência de dois agrupamentos separados, resultado esperado por representar amostras coletadas em diferentes momentos do desenvolvimento celular, 66.5% da covariância total explicada pelas duas primeiras componentes principais. Os valores dos parâmetros  $Q^2$  e  $R^2$  foram 0.80 e 0.94 respectivamente. Gráfico VIP está resumido pela Figura 6.19 abaixo

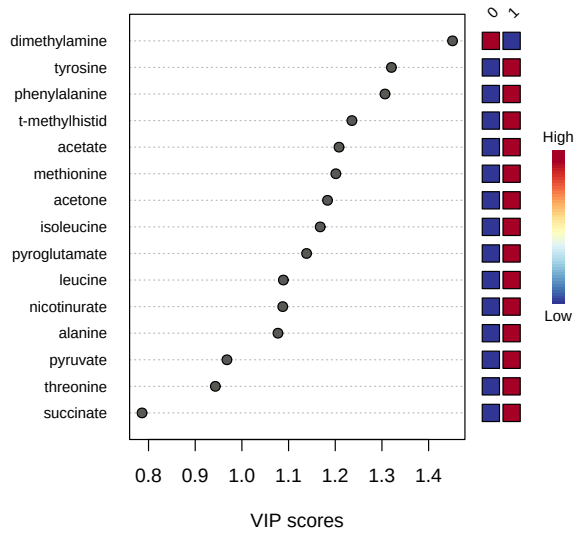


Figura 6.19: Metabólitos identificados como possíveis classificadores de grupo. 0 representa a PC48 e 1 representa a PC96.

O gráfico 6.19 mostra esses possíveis metabólitos que representam classificadores de grupo. A estatística univariada Test-t resultou na seguinte tabela

Teste T - IH(PC) 48h e 96h			
	PC48h	PC96h	$\rho$
<b>Tyrosine</b>	0.75(0.03)	0.96(0.08)	0.001
<b>Phenylalanine</b>	0.50(0.03)	0.62(0.04)	0.001
<b>t-Methylhistidine</b>	0.58(0.05)	0.70(0.03)	0.002
<b>Acetate</b>	0.68(0.07)	0.84(0.05)	0.003
<b>Methionine</b>	0.37(0.03)	0.48(0.05)	0.002
<b>Acetone</b>	0.06(0.01)	0.09(0.01)	0.003
<b>isoleucine</b>	1.61(0.16)	2.02(0.19)	0.079
<b>Pyroglutamate</b>	6.63(0.67)	8.12(0.73)	0.005
<b>Leucine</b>	2.05(0.31)	2.53(0.17)	0.013
<b>Pyruvate</b>	0.95(0.13)	1.17(0.15)	0.026
<b>Threonine</b>	1.11(0.08)	1.29(0.15)	0.038
† <b>Dimethylamine</b>	15.85	0.37	0.004
† <b>Nicotinurate</b>	0.05	0.07	0.020
† <b>Alanine</b>	0.65	0.87	0.010

Tabela 6.14: Diferentes metabólitos classificadores de grupo com significância estatística para o grupo PC48h vs PC96h. † : utilizado test Kruskal-Wallis

A Tabela 6.14 mostra os metabólitos com significância estatística, porém, observamos que existem metabólitos mDBm que foram descritos no caso anterior, e por esta razão não iremos considerá-los. Então teremos os seguintes metabólitos: Pyruvate, Methionine,

Acetone, Isoleucine, Pyroglutamate, Leucine, Threonine, e Nicotirunate que apresentam um aumento de 28.0%, 29.7%, 50.0%, 25.4%, 22.4%, 23.4%, 16.3% e 40.0% respectivamente, quando comparamos 96h com 48h. Obtemos dessa forma os metabólitos *media's Dinamyc Pre-conditioning metabolites* (mDPM).

### 6.3.3.3 Terceiro Caso: Condição Pré-condicionamento Persistente

Nesse caso serão comparados os grupos principais de nosso estudo, o grupo NPC vs PC após 48h e NPC vs PC após mais um ciclo de cultivo de 48h da primeira coleta. Os gráficos *scores* gerados pelo MetaboAnalyst estão resumidos pelas Figuras 6.20 e 6.21

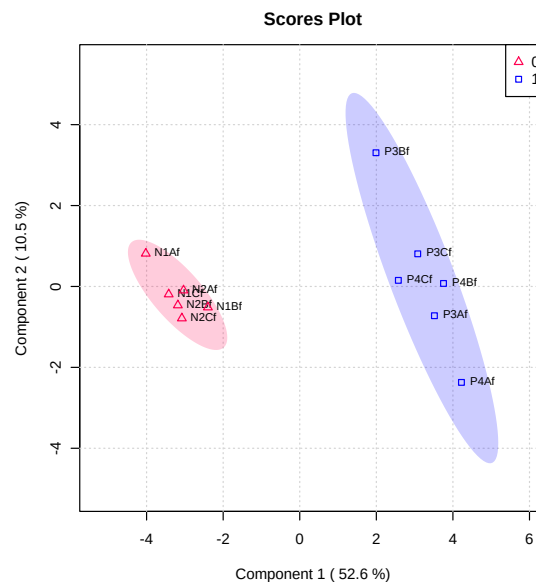


Figura 6.20: Grupos NPC vs PC nas primeiras 48 horas de atividade celular, 0 representa NPC e 1 representa PC, mais de 60% da covariância explicada pelas duas componentes 1 e 2.

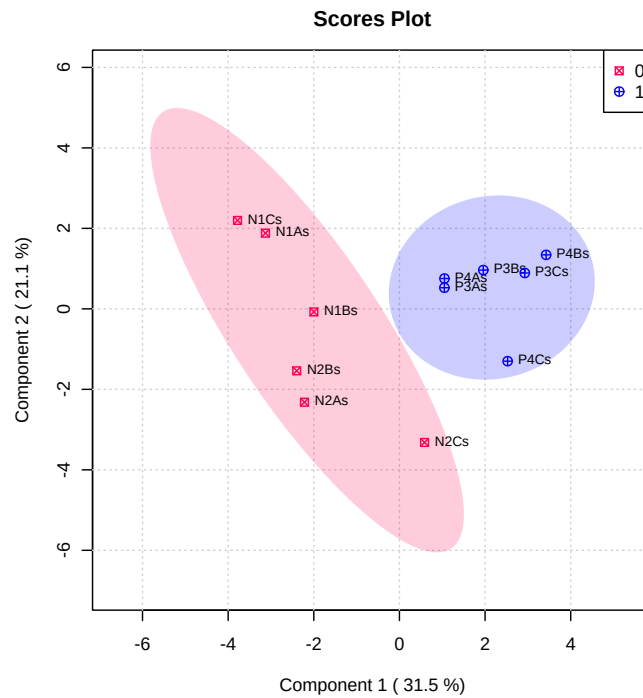


Figura 6.21: Grupos NPC vs PC nas ultimas 48 horas de atividade celular (96h no total), 0 representa NPC e 1 representa PC, mais de 50% da covariância explica pelas duas componentes 1 e 2.

Os gráficos das Figuras 6.20 e 6.21 mostram uma tendencia já observada em amostras de células, mas agora detectada em meios de cultura e por dois instantes de tempo diferentes, 48h e 96h de metabolismo acumulado nos Cardiomiócitos. O pré-condicionamento celular parece afetar a condição basal dos CMs nas primeiras 48h de forma mais severa, conforme revelado por uma tendencia bastante legível de separação de pontos para as primeiras 48h que diminui após mais um ciclo de 48h, conforme mostrado nas figuras acima. O resultado mostrado na Figura 6.20 esta acompanhado por altos valores de  $R^2 = 0.98$  e  $Q^2 = 0.92$ .

No gráfico da Figura 6.21 observa-se que a tendencia parece persistir, porém com menor intensidade do que observado na figura anterior. Como pode ser observado nesta figura, o centro de distribuição dos pontos de ambos os grupos estão mais próximos que no caso anterior. Além disso, a previsibilidade  $Q^2 = 0.51$  nesta comparação é ligeiramente menor do que a última, mas manter o valor  $R^2 = 0.87$ . Estes fatos sugerem que, ao longo do tempo de pré-condicionamento, CMs tendem a regularizar seu metabolismo em relação aos não pré-condicionados, sinalizando um possível processo de homeostase que sera tratado mais adiante.

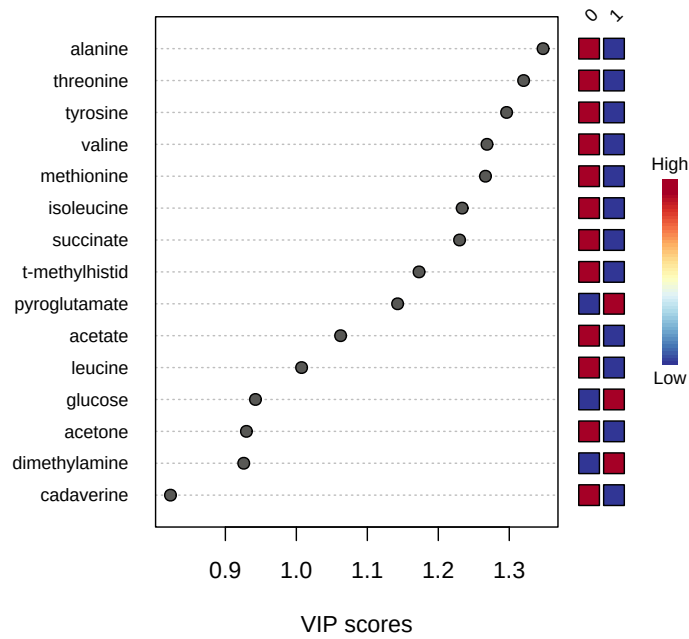


Figura 6.22: Metabólitos identificados como possíveis classificadores de grupo NPC (0) vs PC (1) nas primeiras 48h de atividade celular .

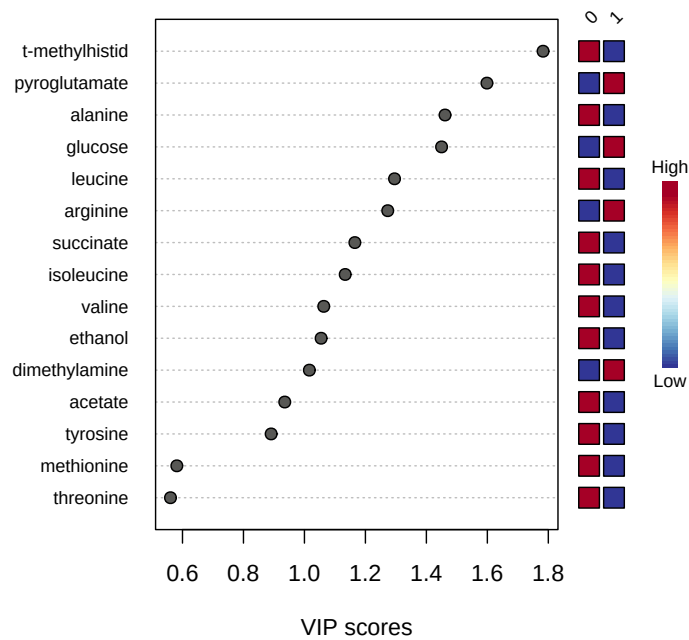


Figura 6.23: Metabólitos identificados como possíveis classificadores de grupo NPC (0) vs PC (1) nas últimas 48h de atividade celular.

Para completar esta análise, os resultados VIP foram processados estatisticamente pelo Test-t, obtendo a seguinte tabela



Teste T 48h			
	(IH)NPC48h	(IH)PC48h	$\rho$
<b>Threonine</b>	1.51(0.08)	1.11(0.08)	0.001
<b>Tyrosine</b>	0.93(0.04)	0.75(0.03)	0.001
<b>Valine</b>	2.24(0.05)	1.17(0.18)	0.001
<b>Methionine</b>	0.49(0.02)	0.37(0.03)	0.001
<b>Isoleucine</b>	2.15(0.15)	1.61(0.16)	0.001
<b>Succinate</b>	0.61(0.03)	0.43(0.06)	0.001
<b>t-Methylhistidine</b>	0.73(0.05)	0.58(0.05)	0.001
<b>Acetate</b>	0.86(0.09)	0.68(0.07)	0.005
<b>Leucine</b>	2.56(0.22)	2.05(0.31)	0.010
<b>Glucose</b>	8.48(0.48)	10.53(1.70)	0.036
<b>Acetone</b>	0.15(0.07)	0.06(0.01)	0.039
<b>Dimethylamine</b>	9.83(3.56)	15.18(3.13)	0.022
<b>†Alanine</b>	0.91	0.65	0.004
<b>†Pyroglutamate</b>	5.37	6.75	0.010

Tabela 6.15: Análise univariada ou Test-t para os grupos NPC48h vs PC48h. †: foi utilizado test Kruskal-Wallis

A Tabela 6.15, apresenta metabólitos destacados com significância estatística. Porém, devemos descartar os metabólitos gerados ao comparar IH48h vs IC48h, dessa forma evitamos os metabólitos gerados pela diferença de eficiência entre as incubadoras nesse tempo (48h). Segundo a Tabela 6.10 o metabólito para desconsiderar-lo: Pyruvate. Porém o pyruvate não foi encontrado na Tabela 6.15. Então, obtemos os metabólitos mPPm-48h os quais são: Threonine, tyrosine, Valine, Methionine, Isoleucine, succinate, t-Mehtylhistidine, Acetate, Leucine, Glucose, Acetone, Dimethylamine, Alanine e Pyroglutamate, apresentando -26.4%, -19.3%, -47.7%, -24.4%, -34.2%, -29.5%, -20.5%, -20.9%, -19.9%, 24.1%, -60.0%, 54.4%, -28.5% e 25.6% respectivamente, ao compararmos o grupo PC com o grupo NPC. Lembrando que o sinal negativo representa uma diminuição na concentração.

Teste T - 96h			
	(IH) NPC	(IH) PC	$\rho$
<b>t-Methylhistidine</b>	0.84(0.05)	0.70(0.03)	0.001
<b>Pyroglutamate</b>	6.06(1.12)	8.12(0.73)	0.005
<b>Alanine</b>	1.10(0.08)	0.87(0.16)	0.017
<b>Glucose</b>	8.63(1.22)	11.32(1.77)	0.015
<b>Leucine</b>	2.82(0.22)	2.53(0.17)	0.033
<b>Arginine</b>	2.14(0.47)	2.78(0.42)	0.037
<b>Succinate</b>	0.63(0.07)	0.52(0.09)	0.062
<b>Isoleucine</b>	2.32(0.31)	2.02(0.19)	0.074
<b>Dimethylamine</b>	0.26(0.11)	0.37(0.09)	0.111
<b>Acetate</b>	0.92(0.11)	0.84(0.05)	0.163
<b>†Valine</b>	2.47	2.18	0.006
<b>†Ethanol</b>	0.66	0.40	0.078
<b>†Tyrosine</b>	1.02	0.97	0.158

Tabela 6.16: Análise univariada para os grupos NPC vs PC - 96h. †: foi utilizado test Kruskal-Wallis

A Tabela 6.16, apresenta metabólitos destacados com significância estatística. Porém, devemos descartar os metabólitos gerados ao comparar IH96h vs IC96h, dessa forma evitamos os metabólitos gerados pela diferença de eficiência entre as incubadoras nesse tempo (96h). Segundo a Tabela 6.11 os metabólitos para desconsiderar: Pyruvate, Phenylalanine, Alanine, Acetone, Formate e t-Methylhistidine. Então, obtemos os metabólitos mPPm-96h os quais são: Valine, Leucine, Glucose, Arginine e Pyroglutamate, apresentando -16.6%, -10.2%, -31.1%, -29.9% e 33.9% respectivamente, novamente ao compararmos o grupo PC com o grupo NPC.

Para apresentar um resumo com todos os casos abordados nesta seção, envolvendo as comparações com amostras de células e de meios de cultura, estamos propondo a seguinte tabela:

Grupos comparados	Metabolitos com VIP > 1	valor- $\rho$	Taxas percentuais (%)
<b>PC vs NPC</b> Avaliação de CMs pré-condicionados (Células)	AcOH	0.059	-
	Val	0.008	144.3
	Phe	0.001	45.7
	Acetone	0.830	-
	Lac	0.011	-99.9
	Leu	0.041	59.1
	Ileu	0.017	80.8
	Unk2	0.046	102.8
<b>NPC96h vs NPC48h</b> Avaliação basal de CMs no meio	Val	0.002	10.7
	Ala	0.005	17.0
	3-MHis	0.006	15.0
	Leu	0.073	-
	BTS	0.188	-
	Ileu	0.257	-
	DMA	0.004	-97.3
	Lac	0.055	-
<b>PC96h vs PC48h</b> Avaliação dinâmica dos CMs pré-condicionados no meio	Tyr	0.001	28.0
	Phe	0.001	24.0
	3-MHis	0.001	20.6
	AcOH	0.003	23.5
	Met	0.002	29.7
	Acetone	0.003	50.0
	Ileu	0.004	25.4
	Pyro	0.005	22.4
	Leu	0.0135	23.4
	BTS	0.026	23.1
	Thr	0.038	16.3
	DMA	0.004	-97.9
	Nicotirunate	0.020	40.0
	Ala	0.010	33.8
<b>PC48h vs NPC48h</b> Dois dias de Avaliação de CMs pré-condicionados no meio	Thr	0.005	-26.4
	Tyr	0.039	-19.3
	Val	0.001	-47.7
	Met	0.022	-24.4
	Ileu	0.036	-34.2
	e363	0.001	-29.5
	3-Mhis	0.010	-20.5
	AcOH	0.001	-20.9
	Leu	0.001	-19.9
	GLC	0.001	24.1
	Acetone	0.001	-60.0
	DMA	0.001	54.4
	Ala	0.001	-28.5
	Pyro	0.001	25.6
<b>PC96h vs NPC96h</b> Quatro dias de Avaliação de CMs pré-condicionados no meio	3-Mhis	0.001	-16.6
	Pyro	0.005	33.9
	Ala	0.017	-20.9
	GLC	0.015	31.1
	Leu	0.033	-10.2
	Arg	0.037	29.9
	e363	0.062	-
	Iso	0.074	-
	DMA	0.111	-
	AcOH	0.163	-
	Val	0.006	-16.6
	EtOH	0.078	-
Tyr	0.158	-	

Tabela 6.17: Resumo da análise estatística mostrando casos comparados (primeira coluna), VIPs obtidos (segunda coluna), valores de  $\rho$  resultantes do Test-t (terceira coluna), taxas de incrementos percentuais (quarta coluna). As taxas percentuais foram comparadas com respeito ao primeiro grupo.

Para resumir a Tabela 6.17 e os casos explicados nos parágrafos anteriores, estamos propondo a seguinte representação esquemática por meio de conceitos topológicos de espaço (conjuntos de elementos, intersecções, etc) a fim de se obter uma melhor visualização dos grupos de metabólitos cPCm, mDBm, mDPm, e mPPm-hh (hh=48h e 96h):

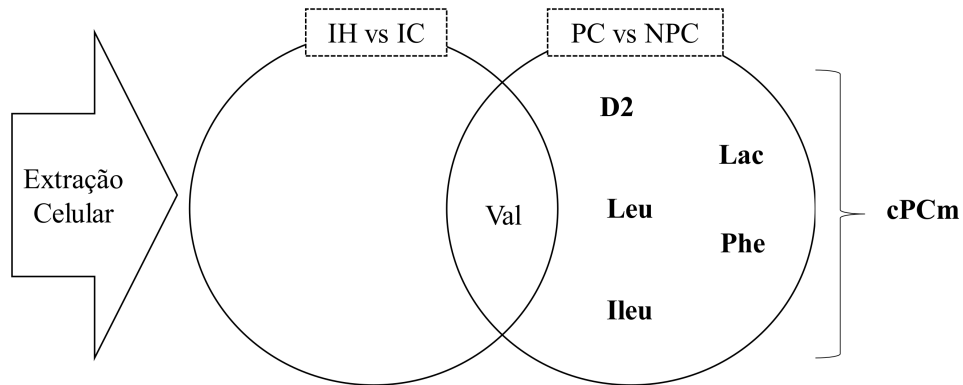


Figura 6.24: Classificação resultante de metabólitos gerados após da análise estatística, ilustrada por meio de conceitos de espaço topológico.

A figura 6.24, resume os casos de análise multivariada e univariada, encontrando ao final das análises os metabólitos pré-condicionantes, denominados como cPCm.

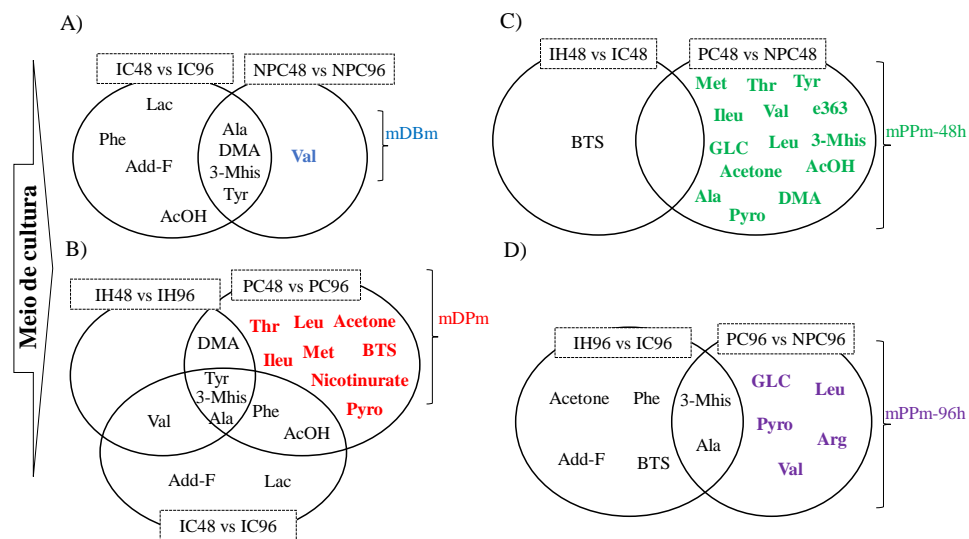


Figura 6.25: Classificação resultante de metabólitos gerados após da análise estatística, ilustrada por meio de conceitos de espaço topológico.

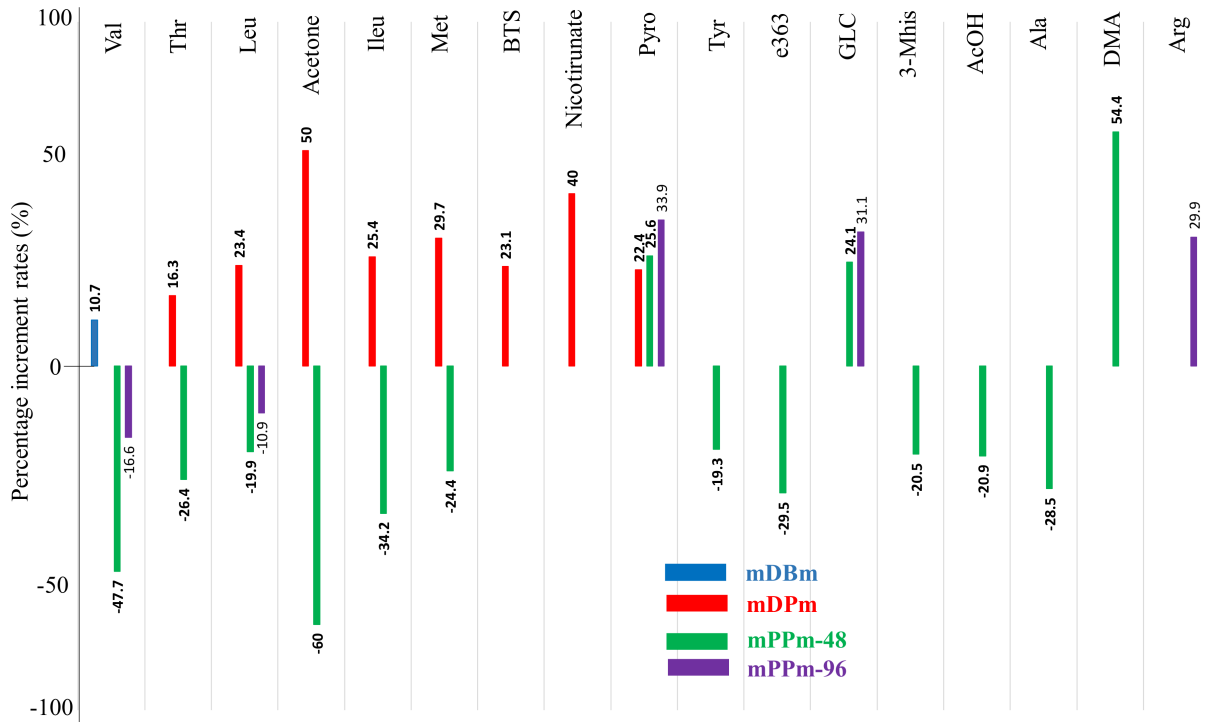


Figura 6.26: Gráfico de da variação de taxas percentuais para uma melhor observação nos diferentes metabólitos encontrados no meio de cultura após do análise multivariada e univariada.

A figura 6.25 mostra os diferentes casos estudados com a análise multivariada e univariada. A) Observamos um único metabólito: a valine que é gerado por consequência da diferença de eficiência entre as incubadoras. B) Os metabólitos gerados naturalmente como consequência do desenvolvimento das células no transcórper do tempo, denominados cDPm. C) Aqueles metabólitos gerados como consequência do pré-condicionamento das células durante as primeiras 48h de desenvolvimento celular, denominados como mPPm-48. D) Metabólitos que persistem nas ultimas 48h de desenvolvimento celular, denominados como mPPm-96. Nesse caso observamos uma considerável diminuição de metabólitos comparados com as primeiras 48h, porém alguns metabólitos encontram-se presentes.

# Capítulo 7

## Discussões

### 7.1 Discussões de Resultados

Neste trabalho escolhemos a abordagem metabolômica utilizando  $^1\text{H}$ -RMN como ferramenta exploratória para investigar células cardiomiócitos obtidos de ratos neonatos submetidos a terapias de pré-condicionamento celular por meio da análise de extratos celulares e amostras de meios de cultura. Apesar de toda a sobreposição de informações gerados neste método, propusemos uma estratégia razoável de estudos fundamentada em isolar os efeitos metabólicos apresentados na seção anterior, abordando aspectos qualitativos dos perfis metabólicos em cada caso analisado, além das tabelas mostradas que abordam dados quantitativos. Uma vez que todo o metabolismo pode ser descrito em termos de reações anabólicas e catabólicas caracterizadas através do contexto metabolito obtido, está sendo proposto aqui um panorama geral de como as células *in vitro* evoluem ao longo do tempo para controlar o estresse induzido por ciclos de normóxia-hipóxia, sua relação com os mecanismos homeostáticos celulares e com os efeitos protetores relatados das terapias de pré-condicionamento. Além de fornecer um melhor entendimento sobre os mecanismos regulatórios das células pré-condicionadas de forma qualitativa, por outro lado os resultados quantitativos têm potencial de determinar as escolhas dos parâmetros de tempo da estratégia que melhor poderiam induzir a homeostases celular em CMs humanos.

Inicialmente, discutiremos os resultados principais obtidos nas amostras de extratos celulares baseando-se em conceitos simples de bioquímica sobre anabolismo celular [53].

Esses resultados referem-se, basicamente, às informações geradas pelas análises estatísticas multivariadas e univariadas que resumem os agrupamentos gerados entre os diferentes grupos analisados e os metabólitos classificadores de grupos, especialmente naqueles relacionados ao efeito de pré-condicionamento celular (cPCm).

Devido ao método de preparação destas amostras, assume-se que as moléculas produzidas (metabólitos) tenham sido geradas a partir do processo de lise celular e dissolução ativa de macromoléculas biológicas, como aquelas provenientes das organelas e membranas das células. No entanto, existem duas outras situações igualmente prováveis em que estes metabólitos poderiam surgir no ambiente celular: (1) por hidrólise intracelular ativa de proteínas (via endógena) ou (2) por internalização dos componentes dos meios de cultura (via exógena). Como o número absoluto de células permanece aproximadamente constante em todos os experimentos para todos os grupos, da mesma forma o volume dos meios de cultura utilizados, podemos argumentar que a origem dessas moléculas, aminoácidos apolares e ácidos carboxílicos, provém de vias metabólicas celulares internas (caso 1). Embora seja um assunto bastante complexo tentar identificar sua origem exata, o software *MetaboAnalyst* pode fornecer pistas importantes quando inserimos a lista dos metabólitos classificadores neste que gera, a seguir, uma outra lista com as vias metabólicas das quais os metabólitos são intermediários químicos. Cabe ao especialista em ciências médicas ou biológicas auxiliar na confirmação e interpretação dessas informações. Por exemplo, quando entramos com os metabólitos leucina e isoleucina, surgem algumas vias metabólicas listadas em uma ordem de importâncias, sendo a primeira a mais importante: "biossíntese de valina, leucina e isoleucina", logo, relacionada a mecanismos anabólicos como sugerimos no início.

Como exemplo de um processo anabólico envolvendo dois dos aminoácidos citados, proteínas são constantemente degradadas e sintetizadas em processos orgânicos com necessidades energéticas que são atendidas a partir de elementos básicos dos meios de cultura. No entanto, independentemente da origem destes elementos nutricionais básicos (endógena ou exógena), poderíamos argumentar sobre seu destino dentro das células em termos de processos de "síntese convergente" (ou direcionada) de alguns compostos importantes [53] que ocorre com os aminoácidos pela quebra de suas cadeias carbônicas através de reações de oxidação para produzir piruvato, acetil-CoA ou outros intermediários do "Ciclo do Ácido Cítrico"(CAC). A leucina, isoleucina e fenilalanina podem convergir para

formar a coenzima acetil-CoA, um substrato de entrada no CAC, enquanto a fenilalanina também poderia convergir para fumarato. Nossos resultados mostraram que os CMs pré-condicionados apresentavam excesso de leucina e isoleucina e falta de fenilalanina, todas moléculas que poderiam ser utilizadas pelas células para sintetizar os substratos utilizados em pontos específicos do CAC, como a coenzima acetil-CoA (fase anaeróbia) e o fumarato (fase aeróbia). É possível que as células ao passarem pelo processo de pré-condicionamento, estão adaptando seu metabolismo energético de maneira a tornarem-se mais preparadas para lidar com o estresse induzido pelos repetidos ciclos de normóxia e hipóxia do tratamento, aumentando a biossíntese de acetil-CoA a partir do estoque de leucina e isoleucina acumulado no ambiente intracelular. No CAC, essa coenzima sofre transformações aeróbicas sucessivas até formar a molécula de fumarato. Porém, diferentemente das células basais, as pré-condicionadas tinham, em média, menos oxigênio disponível, o que poderia influenciar na produção de fumarato. Valina e isoleucina também podem ser utilizadas pelas células para sintetizar succinil-CoA, outra coenzima que é precursora do fumarato, isto é, o fumarato é sintetizado a partir do succinato que, por sua vez, é sintetizado a partir de succinil-CoA [53]. No entanto, como não detectamos diferenças nos níveis de valina entre células pré-condicionadas ou não pré-condicionadas, poderíamos dizer que o ponto mais provável do CAC onde as diferenças induzidas pelo evento de pré-condicionamento deixaram de ocorrer se refere ao processo de conversão de succinil-CoA em fumarato, via succinato. Para sintetizar de maneira resumida a análise das amostras de células, nossa proposta é que cardiomiócitos pré-condicionados estão sinalizando um provável processo homeostático celular, isto é, de manterem seu meio interno com certa estabilidade em resposta ao estresse induzido pelo tratamento de pré-condicionamento. A sequência de eventos metabólicos a qual correlacionamos a esse processo se resume ao aumento da biossíntese de acetil-CoA a partir dos aminoácidos leucina e isoleucina disponíveis no ambiente intracelular (evento anaeróbico), seguida por uma diminuição na produção de fumarato no CAC (evento aeróbico).

Vamos analisar agora os resultados principais gerados pelas amostras de meio de cultura baseando-se novamente em conceitos simples de bioquímica que, nesse caso específico, acreditamos se tratarem sobre catabolismo celular. O motivo para tal suposição é que o meio de cultura contém os nutrientes essenciais dos quais os cardiomiócitos se utilizam (consomem) para gerar energia e assim se manterem vivos durante o tempo em que es-



tão em cultura. É de se esperar também que os cardiomiócitos estão produzindo outros elementos que não fazem parte da composição original do meio de cultura e, a estes, denominamos de metabólitos excretados. A tabela 6.7 resume a lista dos metabólitos consumidos pelas células que foram identificados nos espectros de ressonância magnética. A diferenciação entre as duas classes de metabólitos foi realizada verificando-se a composição de elementos do meio de cultura que pode ser facilmente encontrada em sua descrição comercial.

Antes de iniciar a discussão sobre as modificações do metabolismo celular devido ao efeito de pré-condicionamento "dinâmico" (comparações entre os grupos de 48h e 96h) e "persistente" (comparações isoladas entre os grupos de 48h ou de 96h), precisamos avaliar os efeitos derivados da (1) diferença de eficiência entre as incubadoras de hipóxia e comercial e também aqueles relacionados ao (2) comportamento basal (ou natural) das células. Desta forma, podemos discriminar os efeitos e obter uma argumentação mais realística sobre o pré-condicionamento celular e os metabólitos envolvidos nesse processo.

Iniciando pela análise de eficiência das incubadoras (IH e IC) tomada em dois instantes de tempo distintos, encontramos que o piruvato, um metabólito produzido pelas células no final do metabolismo glicolítico, persiste em se manter aumentado na IH em comparação com a IC para os dois tempos pesquisado (ver Tabelas 6.10 e 6.11 os metabólitos destacados em azul com  $\rho < 0.05$ ), sendo dessa forma um metabólito que diferencia ambas as incubadoras e que, portanto, não será considerado na análise do pré-condicionamento. Outros metabólitos também atuam para diferenciar as incubadoras, porém não de forma tão efetiva quanto o piruvato que se modificou persistentemente em ambos os tempos analisados.

Passando para análise da situação basal das células, desta vez analisando como ela se modifica com a evolução do tempo de 48h para 96h nas duas incubadoras (Tabela 6.12 para IC e Tabela 6.13 para IH), observamos agora um padrão interessante onde alguns metabólitos se repetem em ambas às incubadoras como alanina, dimetilamina e metil-histidina, os quais poderiam ser considerados como basais, e outros que não se repetem como acetato, ácido fórmico (formate), fenilalanina, lactato, metil-histidina, tirosina e valina (ver respectivas tabelas). Para facilitar a interpretação desse panorama metabólico, propusemos a Figura 6.25, letras A até D, sendo na letra A apresentado o resumo geral desse panorama onde a valina, em destaque na cor azul, foi selecionada como metabólito

basal (mDBm) que evolui dinamicamente com o tempo, de 48h para 96h, sofrendo um leve aumento nesse último período (aproximadamente 11%). De maneira análoga ao resultado encontrado nas amostras de células esse metabólito, em conjunto com a leucina e a isoleucina, pode ser utilizado pelas células no processo de biossíntese celular para formar a coenzima succinil-CoA no CAC aeróbico sob a condição basal com a diferença de que sua origem seria exógena, isto é, proveniente do meio de cultura. Em relação aos metabólitos pré-condicionastes dinâmicos (mDPM), estes podem ser facilmente identificados na Figura 6.25 letra B em destaque na cor vermelha: Leu, Ile, Met, Pyro, Acetone, e Nicotinurate. Dentre esses, leucina, isoleucina, e metionina são todos metabólitos consumidos pelas células, isto é, estavam presentes na composição original do meio de cultura. Sendo assim, podemos constatar que houve um maior consumo destes nas primeiras 48h de cultivo por se apresentarem menos concentrados nas amostras, seguido por uma diminuição para outro ciclo de 48h em cerca de 30%, fato este que poderia sugerir a ocorrência de um mecanismo de adaptação celular ou homeostático. Os metabólitos (aminoácidos) citados também podem estar envolvidos em processos de biossíntese celular de moléculas mais complexas via degradação de suas respectivas cadeias carbônicas como aquelas processadas na glicólise ou CAC. A Figura 7.1, extraída da referência [53], demonstra os possíveis destinos destes metabólitos que se degradam para formar acetil-CoA (Figura 7.1, bloco de aminoácidos 6) e succinil-CoA (Figura 7.1, bloco de aminoácidos 4). Podemos observar novamente uma convergência entre os resultados obtidos nas amostras de extratos de células, *informação direta*, e de meios de cultura, *informação indireta*, relacionada aos metabólitos identificados ao efeito de pré-condicionamento que se equivalem e se complementam (caso da metionina nas amostras de meio de cultura). Cabe lembrar ainda que no caso das células, as informações geradas são resultantes do metabolismo acumulado em 96h, enquanto para os meios de cultura temos as informações em 96h, convergentes com às das células, e também em 48h. Este é um "panorama metabólico" particularmente interessante, pois demonstra que os cardiomiócitos estão regulando dinamicamente uma parte de seu metabolismo que identificamos acima de maneira mais intensa nas primeiras 48h até se aproximarem de uma situação metabólica mais próxima a basal, reforçando a ideia da ocorrência de um processo homeostático que se dá como resposta ao estresse induzido pela terapia de pré-condicionamento.

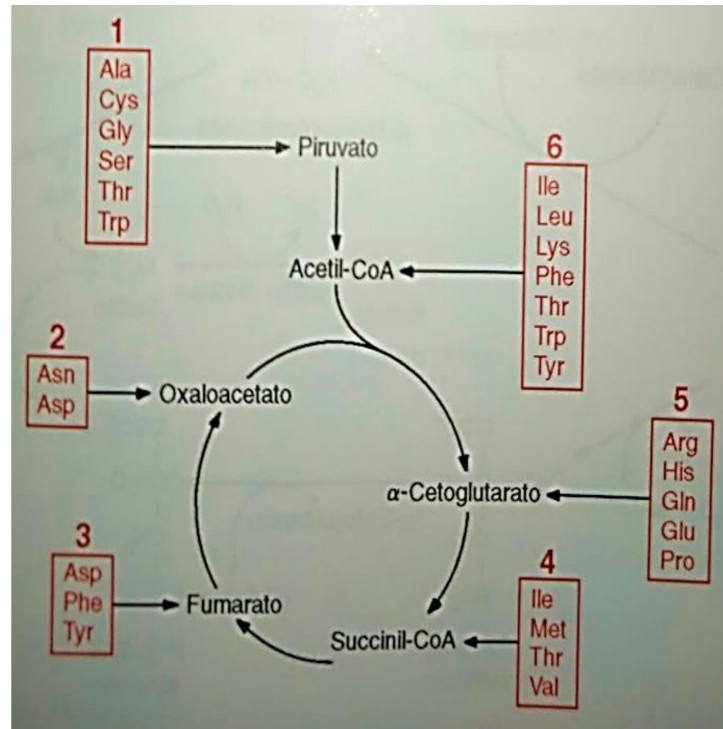


Figura 7.1: Destino da cadeia carbônica dos aminoácidos, que foram reunidos em seis grupos (1 a 6), de acordo com o composto formado. Figura e legenda extraídas do livro Bioquímica Básica de Anita Marzzoco e Bayardo Baptista Torres.

Vamos abordar agora o caso mais interessante onde comparamos diretamente amostras de meios de cultura com células pré-condicionadas e não pré-condicionadas (basais) em dois instantes de tempo distintos, 48h e 96h. De maneira análoga ao que fizemos quando comparamos o caso basal e pré-condicionado isoladamente nos dois instantes de tempo, precisamos avaliar o efeito da diferença de desempenho entre as incubadoras a fim de selecionar somente metabólitos relacionados com o efeito de pré-condicionamento que persistem em se alterar nos tempos pesquisados, chamados neste trabalho de pré-condicionantes persistentes nos tempos de 48 e 96h (mPPm-48 e mPPm-96). A Figura 6.25, letras C e D, resumem essa análise.

Conforme podemos verificar para o tempo de 48h, letra C da referida figura, existem 14 metabólitos desse tipo: Met, Thr, Tyr, Ile, Leu, Val, GLC, Ala, Pyro, Succinate, Acetone, 3-MHis, DMA, e AcOH, sendo os 7 primeiros consumidos pelos CMs e os 7 últimos excretados. Já para o tempo de 96h, letra D da figura esse número é reduzido para 5 metabólitos sendo leucina, arginina, valina e glicose (principal substrato energético utilizado pelas células) aqueles consumidos, enquanto o ácido piroglutâmico (pyroglutamate) é o único excretado. Constatamos novamente que o período de tempo onde ocorrem as mai-

ores variações nas concentrações dos metabólitos consumidos pelas células em resposta ao efeito de pré-condicionamento se dá durante o primeiro ciclo de 48h de cultivo quando então sucedesse uma diminuição geral nesse ritmo durante o outro ciclo de 48h de cultivo, tendência que sugere novamente um mecanismo homeostático em desenvolvimento.

A análise da Figura 7.1, que considera a degradação das cadeias carbônicas de aminoácidos para biossíntese de outras moléculas mais complexas, pode ser novamente avaliada para os dois períodos de tempo. Começando em 48h, temos o piruvato (Figura 7.1, bloco de aminoácidos 1) sendo formado a partir da treonina e também da alanina que é um aminoácido não existente na composição original do meio de cultura. Esta provável conversão se dá em meio anaeróbico sendo gasto mais destes aminoácidos pelas células pré-condicionadas do que aquelas basais. De forma semelhante, acetil-CoA (Figura 7.1, bloco de aminoácidos 6) é sintetizado a partir de isoleucina, leucina, treonina e tirosina de forma anaeróbica e gastando-se mais destes aminoácidos pelos meios das células pré-condicionadas. Interessantemente, a coenzima succinil-CoA parece estar sendo sintetizada aerobicamente a partir de todos os metabólitos que identificamos, isto é, isoleucina, metionina, treonina e valina (Figura 7.1, bloco de aminoácidos 4), novamente, gastando-se mais destes aminoácidos pelos meios das células pré-condicionadas. Cabe ressaltar que, conforme deduzimos anteriormente para o caso dos metabólitos dinâmicos, a valina foi identificada como sendo do tipo basal, isto é, durante o pré-condicionamento dinâmico, esta não atua como metabólito classificador. Entretanto, tal observação não é válida no caso dos metabólitos pré-condicionantes persistentes, pois a valina emerge como sendo um diferenciador entre grupos de células basais e pré-condicionadas para ambos os tempos. Se consultarmos os valores de variação percentual acerca deste metabólito, verificamos que para o tempo de 48h este é aproximadamente 20% maior que a média observada para Ile, Met, e Thr (28.3 +- 4.2%), enquanto para o tempo de 96h, este também é cerca de 20% além de não serem observadas variações estatisticamente significativas associadas aos outros 3 aminoácidos (para maiores detalhes, consultar Tabela 6.17). Este excesso de 20% nos níveis da valina encontrado nos CMs pré-condicionados nos dois instantes de tempo investigados, indica um desequilíbrio entre a proporção destas moléculas precursoras da coenzima succinil-CoA de ao menos 20%. Apresentando o dado numérico de outra forma, para cada 5 coenzimas sintetizadas, sobra uma molécula de valina no meio de cultura que não é aproveitada pelas células, sendo esta uma tendência que se mantém para os dois

tempos de cultivo. Este comportamento parece sinalizar que o metabolismo energético dos CMs pré-condicionados tende a elevar a produção de seus respectivos intermediários, via degradação das cadeias carbônicas de aminoácidos, até o ponto onde há formação de succinil-CoA quando então se observa o desequilíbrio na proporção das moléculas envolvidas em sua síntese. Não temos resultados ou argumentos suficientes para assumir que se trata do ponto exato no CAC onde as diferenças ocorrem, mesmo porque a formação do fumarato a partir da tirosina (Figura 7.1, bloco de aminoácidos 3) pode de fato ocorrer já que esse aminoácido é mais consumido pelas células pré-condicionadas, ao menos após 48h em cultivo (ver Tabela 6.17, caso PC48 vs. NPC48). Faltaria para fechar o ciclo (CAC), a síntese de oxaloacetato, porém não detectamos em nossos resultados os aminoácidos que por degradação de cadeias carbônicas, o formariam. Tal panorama bioquímico pode sugerir, portanto, um mecanismo de adaptação celular que não nos parece prudente pensar como sendo absoluto ou bem localizado, mas sim parcial ou superposto, no sentido em que as células pré-condicionadas demandam tempo até se adaptarem a condição de estresse causada pelos ciclos seguidos de hipóxia, regulando de maneira sempre contínua sua produção de energia pela alteração nas proporções de síntese de intermediários do CAC. Entretanto, é importante lembrar que essa análise também concorda com a análise dos resultados de células referente à síntese de fumarato a partir da valina, que mostrou essa etapa como provável ponto de diferença do CAC que é induzida pelo evento de pré-condicionamento.

As análises acima, acerca das amostras de meio de cultura, estão relacionadas com a produção de energia pelas células a partir da degradação das cadeias carbônicas de aminoácidos sejam estes provenientes de proteínas (endógena) ou meio de cultura (exógena). Entretanto, as células também podem produzir sua energia a partir da degradação das cadeias carbônicas de carboidratos como, por exemplo, a glicose um monossacarídeo de função aldeído. De fato, a degradação dos carboidratos na cadeia respiratória celular costuma ser a primeira alternativa de produção de energia pelas células na condição basal. Entretanto, quando a demanda energética aumenta demasiadamente, as reservas de carboidratos são as primeiras a serem consumidas forçando as células a buscarem por alternativas outras como é o caso da degradação de lipídios e de proteínas (ver Figura 7.2).

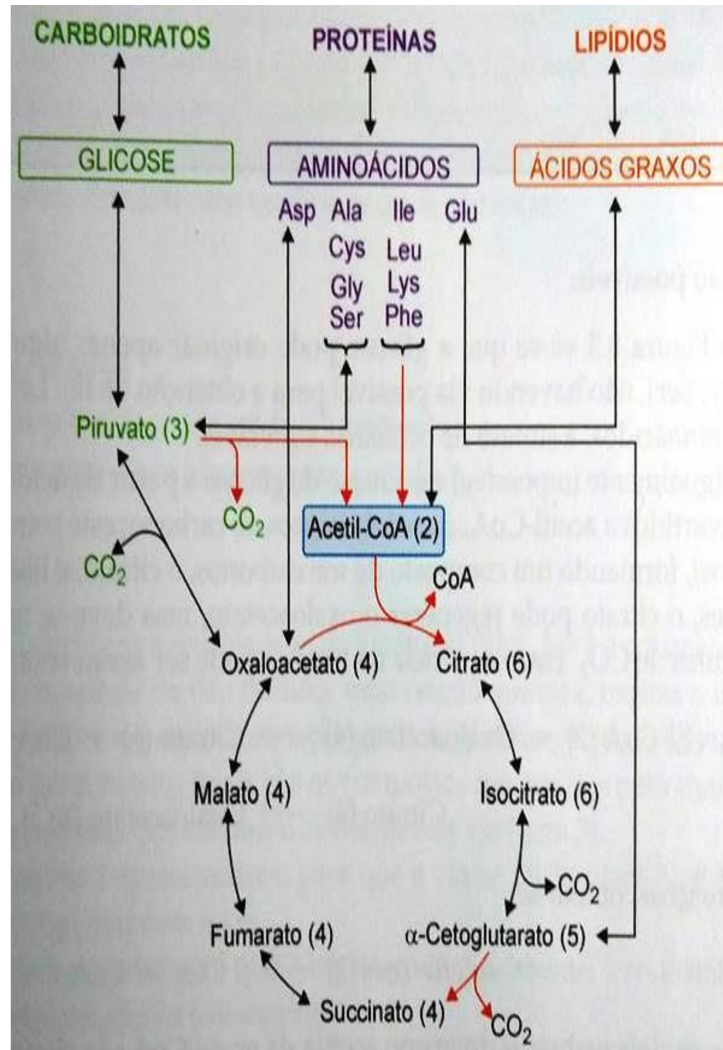


Figura 7.2: Mapa simplificado de parte do metabolismo de carboidratos, lipídios, e proteínas. As setas indicam, em alguns casos, reações e, em outros, etapas de vias metabólicas compostas por várias reações. As reações ou etapas irreversíveis estão assinaladas em vermelho. Figura e legenda extraídas do livro Bioquímica Básica de Anita Marzzoco e Bayardo Baptista Torres.

A partir dos resultados que encontramos nas amostras de células, não é possível afirmar claramente o consumo da molécula de glicose, muito embora a célula possa produzir dois metabólitos que são produtos de seu metabolismo energético: o piruvato, advindo da glicólise anaeróbica, na proporção de duas moléculas para cada molécula de glicose e o lactato, advindo da fermentação láctica, na mesma proporção que o caso anterior. Nossos resultados apenas apontam que CMs pré-condicionados parecem não estarem produzindo moléculas de lactato uma vez que os sinais de ressonância associados têm mediana nula. Este resultado sugere que as células pré-condicionadas parecem não estarem se utilizando do metabolismo láctico para produzir sua energia (ATP) na mesma intensidade que aquelas não pré-condicionadas o que, de certa maneira, concorda com os resultados

que encontramos nas amostras de meio de cultura que demonstraram um consumo mais acentuado por aminoácidos de origens proteicas nas vias de degradação de suas cadeias carbônicas, sejam elas anaeróbica ou aeróbica.

Em relação aos resultados que encontramos nas amostras de meio de cultura para a molécula de glicose, não detectamos que esta tenha sido confirmada como classificadora entre as comparações dinâmicas (48h vs. 96h) dos grupos basais e pré-condicionados conforme pode ser visto na Figura 6.25, letras A e B. Este resultado sugere que ambos os grupos podem estar consumindo glicose na mesma proporção durante todo o período de tempo em que as células são mantidas em cultivo, isto é, às 96h. Finalmente, em relação às comparações persistentes (basal vs. pré-condicionada em 48h e 96h), resumidas na Figura 6.25, letras C e D, a glicose passa a figurar como classificadora entre os meios de cultura dos grupos pré-condicionados e não pré-condicionados, apresentando-se sempre em excesso no primeiro caso. Uma vez que a glicose é um elemento do meio de cultura que está sendo consumido pelas células, quando se detecta seu excesso nas amostras significa que ela sendo menos consumida ou, em outras palavras, que está sobrando no meio de cultura. Logo, CMs pré-condicionados estão se utilizando menos deste recurso energético que aqueles no estado basal, novamente, concordando com a premissa que o efeito do pré-condicionamento celular ativa mecanismos de degradação de cadeias carbônicas de moléculas de origem proteica e que este é um fenômeno que persiste em acontecer nos dois períodos de tempo pesquisado separadamente.

Para concluir esta seção de discussão, cabe ressaltar que devido ao caráter deste trabalho estar focado no desenvolvimento do protótipo da incubadora de hipóxia, bem como na aprendizagem da Metabolômica, da Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de prótons e métodos estatísticos, claramente com enfoque nas ciências exatas, necessitamos do amparo de colaboradores que trabalham nas ciências biológicas que nos auxiliam com na interpretação destes resultados. Por exemplo, são eles que poderão argumentar com propriedade se o contexto metabólico que caracterizamos a partir de nossos resultados para os CMs pré-condicionados são de fato uma resposta homeostática celular e como esta se correlacionaria com as variadas propriedades protetivas reportadas na literatura. Entretanto, ao buscarmos explicações acerca das modificações biológicas induzidas nas células pré-condicionadas, baseando-se em conceitos relativamente simples de bioquímica básica como aqueles encontrados na referência [53], acreditamos estar cumprindo nosso papel

como investigador interdisciplinar capaz de transitar por outras áreas de conhecimento, porém cientes de nossa limitação e da necessidade de buscarmos parcerias estratégicas. Dessa forma, esperamos dar nossa parcela de contribuição para a comunidade científica fornecendo "pistas metabólicas" acerca das terapias envolvendo o pré-condicionamento a nível celular que possam resultar no avanço das terapias médicas em geral.



# Capítulo 8

## Conclusões

Nesse trabalho, concretizamos os objetivos propostos ao iniciar este estudo. Desenhar, construir e testar uma incubadora capaz de realizar cultivo e pré-condicionamento celular, com materiais de baixo custo que são controlados através de microcontrolador Arduino Mega. Devido a característica deste trabalho no que diz respeito a sua parte instrumental, a incubadora pode ser atualizada ou melhorada com materiais de maior precisão e robustez para uma maior eficiência com diferentes tipos de células. Durante seu desenvolvimento, foi necessário estudar conceitos básicos de programação em Arduino que esta baseado em linguagem C++ para o controle da incubadora Hipóxia. No que diz respeito a parte biológica, foi imprescindível aprender técnicas sobre cultivo celular para a realização desse projeto. Da mesma forma, compreender, consolidar e transferir a parte teórica de Ressonância Magnética Nuclear para a parte experimental foi fundamental para compreender a natureza dos espectros de ressonância magnética de alta-resolução. Entender os princípios básicos por trás dos métodos de estatística multivariada e univariada também constituiu outro elemento importante do trabalho, pois forneceu subsídios para saber como aplicá-los corretamente e como interpretar todas as análises e resultados encontrados de células pré-condicionadas.

Por parte dos resultados, a IH apresentou um resultado esperado, já que de fato existe uma diferença quando é comparada com a incubadora comercial devido as componentes das mesmas. Na parte de cultivo celular, foi realizado segundo o plano experimental descrito no cap 5. Após, os resultados estatísticos que foram obtidos através de gráficos de *scores plots* e *VIP scores*, pudemos concluir que existe uma diferença entre

grupos de células/meios não pré-condicionadas comparados com grupos de células/meios pré-condicionadas, identificamos aqueles possíveis metabólitos que ocasionaram a diferença entre esses grupos, e para confirmar a significância estatística desses metabólitos foi utilizado a análise univariada por meio do Teste-t, indicado as distribuições normais, e Kruskal-Wallis, indicado para distribuições não-normais, levando-se em conta o valor " $\rho$ " em ambos os casos. ( $\rho < 0.05$ ). Ao identificar todos os metabólitos encontrados nessa etapa, podemos identificar as vias metabólicas pelas quais são gerados.

Para as amostras de células, ao comparar os grupos NPC vs PC, é possível que as células ao passarem pelo processo de pré-condicionamento adaptem seu metabolismo para tornar-se mais preparada para confrontar o estresse induzido pelos ciclos de normoxia-hipóxia. Para a discussão dos meios de cultura, é necessário e importante ter em conta o parâmetro de tempo para realizar as diferentes comparações. Para amostras NPC vs PC em tempos de 48h e 96h, observamos que existe uma diferença em quantidade de metabólitos encontrados, constatando dessa forma que no período de 48h ocorrem as maiores variações de metabólitos consumidos, porém para o tempo de 96h acontece uma diminuição. As interpretações ainda estão abertas, é necessário o apoio de um profissional da saúde para confirmar esses resultados e discussão.

Acreditamos que as metodologias empregadas nesse projeto poderiam ser replicadas em diferentes laboratórios e, dessa forma, acrescentariam novas informações para discussão sobre pré-condicionamento realizado em células não apenas para cardiomiócitos, mas também extrapolar para outros tipos de células, por exemplo, para células que são modificadas geneticamente ou células cancerígenas. Finalmente, acreditamos que esses estudos e pesquisas acerca de pré-condicionamento celular podem ser o primeiro passo para aliviar e decifrar o impacto de algumas doenças.

# Referências Bibliográficas

- [1] Organização Mundial da Saúde. Programa de câncer. <https://www.who.int/es/newsroom/fact-sheets/detail/cancer>, 2020.
- [2] Instituto Nacional do Câncer. Números de câncer. <https://www.inca.gov.br/>, 2020.
- [3] S. Castle, D. Norman, T. Perls, M. Chang, T. Yoshikawa, and T. Makinodan. Analysis of cutaneous delayed-type hypersensitivity reaction and t-cell proliferative response in elderly nursing-home patients-an-approach to identifying immunodeficient patients. *Gerontology*, 36:217–229, 1990.
- [4] AD. Opera, RR. Russell, KS. Russell, and M. Abu-Khalaf. Chemotherapy Agents With Known Cardiovascular Side Effects and Their Anesthetic Implications. *J. Cardiothorac Vasc Anesth*, 6:2206–2226, 2017.
- [5] Ishiuchi N, Nakashima A, and Doi S. Hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells prevent renal fibrosis and inflammation in ischemia-reperfusion rats. *Stem Cell Research and Therapy*, 11(130), 2020.
- [6] Agnese Gugliandolo, Francesca Diomede, Domenico Scionti, Placido Bramanti, Oriana Trubiani, and Emanuela Mazzon. The role of hypoxia on the neuronal differentiation of gingival mesenchymal stem cells: A transcriptional study. *Cell Transplantation*, 28(5):538–552, 2019. PMID: 30642188.
- [7] Wu X, Wang C, and Wang J. Hypoxia preconditioning protects neuronal cells against traumatic brain injury through stimulation of glucose transport mediated by hif-1alpha / gluts signaling pathway in rat. *Neurosurg Rev*, 2020.
- [8] Zhang W, Chen M, and Li H. Hypoxia preconditioning attenuates lung injury after thoracoscopic lobectomy in patients with lung cancer: a prospective randomized controlled trial. *BMC Anesthesiol*, 19(209), 2019.
- [9] Ma Junxuan, Stefanoska Despina, Grad Sibylle, Alini Mauro, and Peroglio Marianna. Direct and intervertebral disc-mediated sensitization of dorsal root ganglion neurons by hypoxia and low ph. *Neurospine*, 17(1):42–59, 2020.
- [10] Yaru Li, Yue Zhou, Dong Zhang, Wen-Yue Wu, Xiaoxuan Kang, Qiong Wu, Peina Wang, Xiaopeng Liu, Guofen Gao, Yaru Zhou, Guangyou Wang, and Yan-Zhong Chang. Hypobaric hypoxia regulates iron metabolism in rats. *Journal of Cellular Biochemistry*, 120(8):14076–14087, 2019.
- [11] J.C. Lindon, E. Holmes, and J.K. Nicholson. techniques and applications to pharmaceutical research & development. *Pharm Res.*, 23(6):1075–1088, 2006.

- [12] Omics.org. Main page-omics.org. <http://Omics.org>, 2020.
- [13] Area de informatica y salud pública. Instituto carlos iii-proyecto genoma humano. <http://infobiochip.isciii.es>, 2014.
- [14] J. Venter and et al. The sequence of the human genome. *Science*, 291(5507):1304–1351, 2001.
- [15] B. R. Maria. *La Era de las Ciencias Ómicas*. Academia de Farmacia-Reino de Aragón, 2015.
- [16] M. E. Frigolet and Ruth. Gutiérrez-Aguilar. Ciencias Ómicas, ¿como ayudan a las ciencias de la salud? *Resvista Digital Universitaria (RDU)*, 18(7), 2017.
- [17] Juan Enrique Bargalló-Rocha, Fernando Lara-Medina, Victor Pérez-Sánchez, Rafael Vázquez-Romo, Cynthia Villarreal-Garza, Hector Martínez-Said, Robin J. Shaw-Dulin, Alejandro Mohar-Betancourt, Barnaby Hunt, Juliette Plun-Favreau, and William J. Valentine. Cost-effectiveness of the 21-gene breast cancer assay in mexico. *Advances in Therapy*, 32(3):239–253, Mar 2015.
- [18] Ioanna Kosteria, Athanasios K. Anagnostopoulos, Christina Kanaka-Gantenbein, George P. Chrousos, and George T. Tsangaris. The use of proteomics in assisted reproduction. *In Vivo*, 31(3):267–283, 2017.
- [19] Gilbert S. Omenn, Lydie Lane, Emma K. Lundberg, Ronald C. Beavis, Alexey I. Nesvizhskii, and Eric W. Deutsch. Metrics for the human proteome project 2015: Progress on the human proteome and guidelines for high-confidence protein identification. *Journal of Proteome Research*, 14(9):3452–3460, 2015. PMID: 26155816.
- [20] Jeremy K. Nicholson and John C. Lindon. Systems biology: Metabonomics. *Nature*, 455:1054–1056, 2008. PMID: 18948945.
- [21] S. C. Gates and C. C. Sweeley. Quantitative metabolic profiling based on gas chromatography. *Clinical Chemistry*, 24(10):1663–1673, 1978.
- [22] Milos V. Novotny, Helena A. Soini, and Yehia Mechref. Biochemical individuality reflected in chromatographic, electrophoretic and mass-spectrometric profiles. *Journal of Chromatography B*, 866(1):26 – 47, 2008. 50 Years Journal of Chromatography.
- [23] D. I. Hoult, S. J. W. Busby, D. G. Gadian, G. K. Radda, R. E. Richards, and P. J. Seeley. Observation of tissue metabolites using  $^{31}\text{P}$  nuclear magnetic resonance. *nature*, 252:285–287, November 1974.
- [24] C. A. Smith, G. O. Maille, J. Q. Want, S. A. Trauguer, T. R. Brandom, D. E. Custodio, R. Abagyan, and G. Siuzdak. Metlin: A metabolite mass spectral database. *Therapeutic Drug Monitoring*, 27(6):747–751, Dec 2005.
- [25] Steven C. Moore, Charles E. Matthews, Joshua N. Sampson, Rachael Z. Stolzenberg-Solomon, Wei Zheng, Qiuyin Cai, Yu Ting Tan, Wong-Ho Chow, Bu-Tian Ji, Da Ke Liu, Qian Xiao, Simina M. Boca, Michael F. Leitzmann, Gong Yang, Yong Bing Xiang, Rashmi Sinha, Xiao Ou Shu, and Amanda J. Cross. Human metabolic correlates of body mass index. *Metabolomics*, 10(2):259–269, Apr 2014.

- [26] I. I. Rabi, J. R. Zacharias, S. Millman, and P. Kusch. A new method of measuring nuclear magnetic moment. *Phys. Rev.*, 53:318–318, Feb 1938.
- [27] A. Filler. The history, development and impact of computed imaging in neurological diagnosis and neurosurgery: Ct, mri, and dti. *Nat. Prec.*, page 0, May 2009.
- [28] J K Nicholson, M P O’Flynn, P J Sadler, A F Macleod, S M Juul, and P H Sönksen. Proton-nuclear-magnetic-resonance studies of serum, plasma and urine from fasting normal and diabetic subjects. *Biochemical Journal*, 217(2):365–375, 01 1984.
- [29] R. Manuel. Espectroscopia de resonancia magnética nuclear de alta resolución: una herramienta fundamental en química y biología estructural. *An. Quím.*, 107(1):46–57, 2011.
- [30] V.M.S. Gil and C.F.G.C. Geraldes. *Ressonância magnética nuclear: fundamentos, métodos e aplicações*. Fundação Calouste Gulbenkian, 2002.
- [31] Celia M. Tokarski Dieguez, Lecio V. Montanheiro, L. Berbeka Cleto, Marlio J.C. Bonfim, and C.A. Dartora. Os fundamentos quânticos da Ressonância Magnética Nuclear. *Revista Brasileira de Ensino de Física*, 40, 00 2018.
- [32] J.B. Lambert, E.P. Mazzola, and L.N. Holland. *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy: An Introduction to Principles, Applications, and Experimental Methods*. Pearson Education, 2004.
- [33] M. do Rosário Zucchi. *Implementação da técnica de espectroscopia in vivo por RMN e sua aplicação na fisiologia do exercício*. 1997.
- [34] C. Gasquet, R. Ryan, and P. Witomski. *Fourier Analysis and Applications: Filtering, Numerical Computation, Wavelets*. Texts in Applied Mathematics. Springer New York, 1998.
- [35] Scott A. Smith, William E. Palke, and J. T. Gerig. The hamiltonians of nmr. part i. *Concepts in Magnetic Resonance*, 4(2):107–144.
- [36] A. Bathista and J. Nogueira. *Nogueira. Elementos Históricos da Ressonância Magnética Nuclear. in VII Jornada Brasileira de Ressonância Magnética Nuclear*. Maringa PR, 2002.
- [37] P. A. M. Dirac. The quantum theory of the emission and absorption of radiation. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical and Physical Character*, 114(767):243–265, 1927.
- [38] R. McWeeny. *Spins in Chemistry*. Dover Books on Chemistry. Dover Publications, 2004.
- [39] W. E. Lamb. Internal diamagnetic fields. *Phys. Rev.*, 60:817–819, Dec 1941.
- [40] J. Mencias. *Resonancia Magnética Nuclear*. Javier Mencias, 2019.
- [41] C. M. Cuadras. *Nuevos Métodos de análisis multivariante*. CMC Editions, 2019.

- [42] Felipe Bachion de Santana, André Marcelo de Souza, Mariana Ramos Almeida, Márcia Cristina Breitzkreitz, Paulo Roberto Filgueiras, Marcelo Martins Sena, and Ronei Jesus Poppi. Experimento didático de quimiometria para classificação de óleos vegetais comestíveis por espectroscopia no infravermelho médio combinado com análise discriminante por mínimos quadrados parciais: um tutorial, parte V. *Química Nova*, 43:371 – 381, 03 2020.
- [43] A. L. Baddini, A.D. Netto, and V. L. Texeira. Metabolômica baseada em rnm de 1h e no método dos mínimos quadrados parciais discriminante. *Revista virtual de Química*, 6:396 – 415, 2014.
- [44] Paul Geladi and Bruce R. Kowalski. Partial least-squares regression: a tutorial. *Analytica Chimica Acta*, 185:1 – 17, 1986.
- [45] Sijmen de Jong. Simpls: An alternative approach to partial least squares regression. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 18(3):251 – 263, 1993.
- [46] S. D. Bhupinder and F. M. Jhon. Improved pls algorithms. *Journal of Chemometrics*, 11(1):73 – 85, 1997.
- [47] R. Stefan, L. Fredrik, G. Paul, and W. Svante. A pls kernel algorithm for data sets with many variables and fewer objects. part 1: Theory and algorithm. *Journal of Chemometrics*, 8(2):111 – 125, 1994.
- [48] Jasmine Chong, David S. Wishart, and Jianguo Xia. Using metaboanalyst 4.0 for comprehensive and integrative metabolomics data analysis. *Current Protocols in Bioinformatics*, 68(1):e86, 2019.
- [49] J. Gorgas, N. Cardiel, and J. Zamorano. *Estadística básica para estudiantes de ciencias*. Universidade Complutense de Madrid, 2011.
- [50] Rasmus Madsen, Torbjörn Lundstedt, and Johan Trygg. Chemometrics in metabolomics? a review in human disease diagnosis. *Analytica Chimica Acta*, 659(1):23 – 33, 2010.
- [51] Il-Gyo Chong and Chi-Hyuck Jun. Performance of some variable selection methods when multicollinearity is present. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 78(1):103 – 112, 2005.
- [52] K. Varmuza and P. Filzmoser. *Introduction to Multivariate Statistical Analysis in Chemometrics*. CRC Press, 2009.
- [53] Anita. Marzzoco and Bayardo Baptista. Torres. *Bioquímica básica*. Guanabara Koogan, 1999.

# Apêndice A

## Protocolos de cultivo celular

### A.1 Protocolo de descongelamento celular

- Aquecer o meio (DMEM + 10% SFB), PBS e a tripsina no banho a 37° C;
- Ligar o UV do fluxo laminar durante 20 min;
- Limpar todo o fluxo laminar com gaze estéril e álcool 70%;
- Colocar a ponteira de vidro no sugador de material biológico e abrir a válvula de aspiração;
- Separar um tubo falcon de 15 ml estéril e adicionar 8 ml;
- Retirar o vial do nitrogênio líquido (ver a localização das células no mapa das amostras crio-preservadas);
- Levar o vial para o fluxo e descongelar as células na mão;
- Adicionar 1 ml de meio no vial quando as células estiverem descongelando;
- Inverter e verter o vial até as células estarem completamente descongeladas, verter o conteúdo do vial no falcon de 15 ml previamente separado;
- Re-suspender o pool de células + meio (movimentos up/down);
- Levar o tubo falcon 15 ml para a centrifuga por 3 min a 1300 rpm;
- Voltar com o tubo falcon 15 ml cuidadosamente para o fluxo laminar;
- Com o auxílio do sugador de material biológico, aspirar o sobrenadante cuidadosamente para não desmanchar o pellet;
- Adicionar 2 ml de meio no tubo falcon 15 ml;
- Com o auxílio de uma pipeta graduada, re-suspender o pellet e homogeneizar o pool de células + meio (movimentos up/down);
- Retirar 200 ul do pool de células + meio para fazer a contagem celular em câmara de Neubauer;

- Após a contagem, adicionar meio no tubo falcon 15 ml até completar 5 ml e transferir o pool de células + meio para uma garrafa de cultura T25 ou placas que utilizara-se e colocar na incubadora a 37°C.

## A.2 Protocolo de sub-cultivo celular

### **Limpeza do fluxo laminar:**

- Ligar o UV do fluxo laminar durante 20 min;
- Limpar todo o fluxo laminar com gaze estéril e álcool 70%;
- Colocar a ponteira de vidro no sugador de material biológico e abrir a válvula de aspiração;

### **Separar os materiais de trabalho:**

- Aquecer o meio (DMEM + 10% SFB), PBS e a tripsina no banho a 37° C;

### **Separar os materiais a serem utilizados no fluxo:**

- Tubo falcon de 15 ml;
- Garrafa de cultura T25;
- Pipetas descartáveis de 5 ml;
- Ponteiras descartáveis de 1000 ul e 200 ul;
- Microtubo de 2 ml.
- Retirar a garrafa de cultura T25 da incubadora e levar para o fluxo laminar;
- Aspirar o meio da garrafa de cultura T25;
- Acrescentar 5 ml de PBS para lavar a garrafa;
- Com o auxílio do sugador de material biológico, aspirar o PBS;
- Adicionar 1 ml de Tripsina na garrafa de cultura T25 e levar a garrafa para a incubadora a 37°C por aproximadamente 2 min;
- Observar no microscópio se as células se desprenderam do fundo da garrafa;
- Com o auxílio de uma pipeta, adicionar 4 ml de meio na garrafa e transferir o conteúdo para o tubo falcon 15 ml;
- Re-suspender (movimentos up/down) o pool de células + meio;
- Levar o tubo falcon 15 ml para a centrifuga por 3 min a 1300 rpm;
- Voltar com o tubo falcon 15 ml cuidadosamente para o fluxo laminar;
- Com o auxílio do sugador de material biológico, aspirar o sobrenadante cuidadosamente para não desmanchar o pellet de células formado pela centrifugação;
- Adicionar 2 ml de meio no tubo falcon 15 ml;



- Com o auxílio de uma pipeta graduada, re-suspender o pellet e homogeneizar o pool de células + meio (movimentos up/down);
- Retirar 200  $\mu$ l do pool de células + meio para fazer a contagem celular em câmara de Neubauer;
- Após a contagem, adicionar meio no tubo falcon 15 ml até completar 5 ml e transferir o pool de células + meio para uma garrafa de cultura T25 e colocar na incubadora a 37°C.

# Apêndice B

## Matriz multivariada - meios de cultura

acetate	acetone	alanine	arginine	cadaverine	dimethylamine	ethanol	formate	glucose	isoleucine	lactate
0.97	0.43	1.22	3.21	1.11	10.33	1.01	0.15	5.67	2.31	8.35
0.87	0.45	1.04	3.63	0.85	9.55	1.21	0.39	6.78	2.47	4.59
1.11	0.04	1.28	2.21	1.53	11.31	0.75	0.34	8.23	2.37	7.44
0.78	0.26	1.02	1.83	1.14	6.48	0.94	0.12	8.11	2.26	5.56
0.76	0.24	1.02	1.72	0.98	5.72	0.71	0.13	8.23	2.02	4.94
0.77	0.11	0.84	2.34	0.89	16.79	0.57	0.13	9.47	1.59	6.67
0.74	0.11	0.81	2.55	0.81	10.63	0.68	0.12	12.03	1.78	3.84
0.83	0.12	0.92	2.47	0.71	15.52	0.38	0.16	9.33	1.62	6.73
0.73	0.11	0.74	2.78	0.82	19.19	0.71	0.09	10.31	1.66	4.26
1.07	0.36	2.01	3.44	1.56	0.36	0.38	0.27	0.62	2.61	16.81
0.91	0.27	1.31	1.67	1.11	0.33	0.78	0.16	5.71	2.53	6.07
1.11	0.37	1.77	2.06	1.02	0.41	0.28	0.23	2.49	2.79	12.48
0.95	0.21	1.91	1.92	1.16	0.17	0.77	0.27	3.39	2.41	13.89
0.86	0.28	1.72	2.22	1.13	0.16	0.91	0.25	5.89	2.28	9.74
1.21	0.13	1.43	2.09	0.85	0.41	1.17	2.67	8.51	1.77	12.51
1.04	0.12	1.05	2.94	0.76	0.23	1.23	2.42	11.82	1.91	6.28
1.17	0.13	1.52	1.78	0.76	0.42	0.89	2.88	8.29	1.78	13.31
0.97	0.11	0.87	3.25	0.82	0.41	1.17	2.02	11.45	1.79	6.18
0.93	0.21	1.01	1.93	1.05	12.64	0.51	0.12	7.71	1.87	7.47
1.01	0.01	0.91	2.61	1.05	13.83	0.71	0.13	9.12	2.29	4.71
0.88	0.14	1.02	2.12	0.88	12.66	0.93	0.13	8.21	2.25	6.15
0.77	0.17	0.91	2.49	0.91	7.21	0.41	0.08	8.67	2.27	4.78
0.81	0.18	0.92	2.42	1.04	6.16	0.53	0.13	8.43	2.12	5.08
0.78	0.19	0.89	1.92	0.95	6.49	0.48	0.09	8.75	2.11	4.32
0.98	0.03	1.12	2.45	1.11	0.35	1.08	0.12	10.04	2.74	5.79
0.88	0.17	1.01	2.53	0.81	0.34	0.78	0.11	9.65	2.22	5.71
1.13	0.02	1.24	2.23	0.97	0.42	1.99	0.18	8.84	2.61	8.33
0.79	0.15	1.01	1.27	0.74	0.14	0.51	0.11	8.31	2.31	5.54
0.86	0.18	1.15	1.95	1.16	0.15	0.55	0.16	6.58	2.23	8.78
0.91	0.11	1.11	2.44	0.81	0.19	0.33	2.37	8.34	1.86	12.9
0.68	0.06	0.71	2.11	0.83	16.96	0.29	0.11	9.62	1.48	7.33
0.77	0.06	0.66	2.75	0.91	11.71	0.38	0.09	13.13	1.66	3.83
0.73	0.05	0.64	2.64	0.96	14.74	0.65	0.09	11.25	1.72	5.23
0.55	0.08	0.63	2.07	0.83	11.41	0.34	0.09	8.11	1.37	5.66
0.66	0.07	0.62	2.61	0.59	19.15	0.42	0.07	11.01	1.65	3.81
0.71	0.08	0.69	2.38	0.91	17.09	0.68	0.09	10.09	1.82	5.76
0.76	0.09	1.07	2.29	0.81	0.45	0.42	0.15	9.58	1.98	13.43
0.85	0.11	0.71	3.02	1.07	0.22	0.41	0.08	12.93	2.27	4.27
0.87	0.09	0.92	2.99	1.01	0.35	0.35	0.14	11.66	2.02	9.24
0.91	0.09	1.03	2.61	0.81	0.37	0.54	0.13	10.45	2.02	10.31
0.84	0.11	0.69	3.41	0.88	0.48	0.36	0.09	13.76	2.14	3.53
0.82	0.08	0.83	2.39	1.04	0.37	0.39	1.39	9.53	1.69	9.57

leucine	methionine	nicotinurate	phenylalanine	pyroglutamate	pyrovalate	succinate	threonine	tyrosine	valine	T-methylhistidine
2.65	0.54	0.06	0.82	4.61	0.92	0.71	2.12	1.26	2.33	0.64
2.67	0.48	0.07	0.77	3.95	0.61	0.65	2.04	1.21	2.25	0.55
2.43	0.55	0.08	0.61	5.31	0.85	0.69	1.93	1.09	2.33	0.78
2.56	0.61	0.06	0.72	5.66	0.64	0.64	1.71	1.12	2.45	0.79
3.12	0.51	0.08	0.71	5.25	0.57	0.61	1.79	1.11	2.15	0.77
1.97	0.45	0.06	0.58	6.03	0.54	0.65	1.42	0.93	1.82	0.62
2.18	0.45	0.07	0.61	7.13	0.78	0.45	1.38	0.93	1.98	0.64
1.93	0.45	0.06	0.56	6.41	0.62	0.46	1.48	0.91	1.84	0.62
2.04	0.44	0.06	0.63	6.04	0.66	0.58	1.33	0.91	1.83	0.59
3.61	0.61	0.07	0.97	5.27	0.74	0.83	1.98	1.42	2.62	0.74
3.02	0.46	0.06	0.84	4.44	0.54	0.71	1.61	1.21	2.14	0.69
3.29	0.61	0.07	0.96	5.35	0.52	0.92	1.74	1.51	2.67	0.73
2.91	0.64	0.08	0.78	6.69	0.94	0.79	1.81	1.27	2.85	0.89
3.35	0.57	0.11	0.76	7.02	0.82	0.54	1.83	1.21	2.51	0.84
2.41	0.49	0.07	0.73	7.28	0.78	0.44	1.67	1.07	2.03	0.74
2.14	0.49	0.07	0.67	7.13	0.67	0.53	1.57	1.03	2.15	0.69
2.43	0.52	0.08	0.72	7.57	0.79	0.52	1.79	1.18	2.24	0.77
2.28	0.47	0.08	0.63	7.18	0.61	0.64	1.39	0.99	1.92	0.69
2.81	0.51	0.07	0.57	5.64	1.15	0.62	1.47	0.96	2.31	0.76
2.52	0.53	0.05	0.43	5.12	1.24	0.56	1.41	0.91	2.25	0.72
2.81	0.51	0.06	0.52	5.54	1.11	0.66	1.46	0.86	2.22	0.74
2.41	0.49	0.07	0.69	5.34	0.91	0.61	1.57	0.98	2.31	0.73
2.24	0.49	0.07	0.61	5.41	0.83	0.59	1.61	0.98	2.23	0.65
2.57	0.45	0.06	0.59	5.17	0.96	0.66	1.58	0.94	2.16	0.81
2.95	0.56	0.07	0.51	5.47	1.54	0.58	1.92	1.51	2.51	0.87
3.14	0.56	0.07	0.71	5.94	1.22	0.66	1.96	1.09	2.61	0.87
2.76	0.61	0.06	0.51	5.58	1.66	0.63	1.98	1.01	2.59	0.89
2.91	0.48	0.06	0.63	5.45	0.81	0.74	0.17	0.99	2.43	0.85
2.71	0.48	0.07	0.68	5.61	1.15	0.66	2.01	1.04	2.34	0.85
2.48	0.42	0.07	0.58	8.31	1.07	0.51	1.34	0.96	2.42	0.74
1.71	0.34	0.05	0.46	6.65	0.91	0.48	1.05	0.76	1.66	0.59
2.59	0.42	0.07	0.55	7.41	1.11	0.33	1.24	0.82	1.99	0.66
1.99	0.38	0.05	0.47	7.01	1.01	0.48	1.11	0.72	1.73	0.61
1.84	0.31	0.05	0.51	5.43	0.72	0.37	1.01	0.71	1.45	0.49
2.21	0.38	0.05	0.51	6.45	1.02	0.46	1.11	0.76	1.85	0.59
1.97	0.39	0.05	0.51	6.86	0.93	0.49	1.17	0.75	1.73	0.58
2.67	0.51	0.07	0.61	8.62	1.21	0.57	1.46	0.98	2.34	0.76
2.71	0.52	0.08	0.66	7.49	1.17	0.52	1.29	1.05	2.22	0.67
2.61	0.48	0.07	0.58	9.19	1.37	0.46	1.35	0.96	0.27	0.73
2.36	0.53	0.07	0.67	7.51	1.03	0.61	1.39	1.04	2.34	0.71
2.56	0.49	0.06	0.57	8.46	1.29	0.38	1.26	0.93	2.14	0.71
2.29	0.38	0.06	0.63	7.48	0.96	0.61	1.02	0.83	1.88	0.67

Tabela B.1: Matriz multivariada para todos os metabólitos identificados nos espectros de ressonância das amostras de meio de cultura NPC e PC

# Apêndice C

## Equipamentos

Equipamentos utilizados para o desenvolvimento deste trabalho.



(a) Incubadora Hipóxia e circuito elétrico



(b) Interfase para o controle da incubadora hipóxia



(c) Interior da incubadora hipóxia



(d) Máquina de ultrassom utilizado no processo de extração metabólica



(e) Fluxos laminares utilizados para a manipulação de células e meios de cultura



(f) 1. Incubadora comercial para cultivo de células 2. Microscópio óptico 3. Centrifuga citológica 4. Tanque de nitrogênio líquido utilizado para armazenar células congeladas

Figura C.1: Diferentes equipamentos para a realização deste trabalho, os quais podem ser encontrados no *LabM<sup>2</sup>-IFUSP*.