

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**ARQUIMEDES PAIXÃO DE SANTANA FILHO**

**ANÁLISE METABOLÔMICA DE LINHAGENS DE MELANÓCITOS E  
MELANOMAS DE ORIGEM HUMANA E MURINA.**

SANTA

**CURITIBA  
2013**

**ARQUIMEDES PAIXÃO DE SANTANA FILHO**

**ANÁLISE METABOLÔMICA DE LINHAGENS DE MELANÓCITOS E  
MELANOMAS DE ORIGEM HUMANA E MURINA.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências - Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme L. Sasaki

Co-orientadores: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Sheila Maria B. Winnischofer  
Dr. Lauro Mera de Souza

**CURITIBA  
2013**

TERMO DE APROVAÇÃO

ARQUIMEDES PAIXÃO DE SANTANA FILHO

"Análise metabólica de linhagens de melanócitos e melanoma de origem humana e murina"

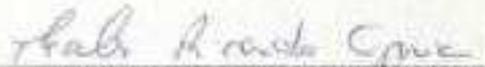
Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica) da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



Prof. Dr. Guilherme Lanzi Sasaki  
Orientador – Departamento de Bioquímica, UFPR.



Prof. Dra. Sheila Maria B. Winnichofer  
Departamento de Bioquímica, UFPR.



Prof. Dr. Thales Ricardo Cipriani  
Departamento de Bioquímica, UFPR.



Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade  
Departamento de Biologia Celular, UFPR.



Prof. Dra. Sueli Miekó Oba Shinjo  
Faculdade de Medicina, USP.



Prof. Dra. Eliana Barreto Bergter  
Departamento de Microbiologia, UFRJ.

Curitiba, 25 de fevereiro de 2013

## AGRADECIMENTOS

À minha família.

Ao indispensável apoio, carinho e compreensão de Ester Mayumi Ninomiya, que sempre demonstrou paciência durante toda a caminhada deste doutorado.

Aos meus orientadores, professor Guilherme L. Sasaki, professora Sheila Maria B. Winnischofer, e Dr. Lauro Mera de Souza, pela paciência, ensinamentos e principalmente pela confiança.

A todos os meus amigos da turma de mestrado e doutorado em Bioquímica.

Aos meus amigos do Departamento de Química.

Aos meus amigos do Laboratório de Cultivo Celular, em especial a Elizabeth Cunha e Thiago Jacomasso, pela constante troca de idéias e auxílio nos experimentos.

Aos meus amigos do Laboratório de Química de Carboidratos, em especial ao Daniel Suss Riter, Rodrigo Serrato e Diego de Araújo pelos momentos de descontração.

Aos meus amigos do curso de Biologia da Universidade Federal de Alagoas.

A todos os funcionários e professores do Departamento de Bioquímica, que contribuíram para minha formação.

Às agências financiadoras CAPES, Fundação Araucária e CNPq.

SANTANA-FILHO 2013 BIOQUÍMICA-  
UFPR

**“Two roads diverged in a wood, and I - I took the one less traveled by,  
And that has made all the difference.”  
The Road Not Taken - Robert Frost**

## RESUMO

Biomarcadores capazes de diferenciar células tumorigênicas de não tumorigênicas são importantes, mas ainda existem em quantidades restritivas. Neste estudo, análises de RMN 2D do tipo HSQC-ed forneceram *fingerprints* dos extratos lipídicos obtidos de linhagens de melanoma humano, representando diferentes estágios de tumorigênese (RGP, VGP e MET), e linhagens de melanócitos e de melanoma de origem murina. Em relação às linhagens murinas, técnicas de análise multivariada demonstraram que o uso de agentes mitogênicos, como ésteres de forbol, podem influenciar significativamente o perfil lipidômico da linhagem de melanócitos, tornando-o mais semelhante ao perfil de linhagens de células mais proliferativas. Extratos aquosos também foram estudados e os metabólitos que mais influenciaram na discriminação entre as linhagens foram quantificados, esses dados, em conjunto com os obtidos da fração lipídica, permitiram caracterizar o metaboloma destas linhagens. A composição de ácidos graxos das linhagens celulares, analisada por GC-MS, foi diferenciada principalmente pelas proporções de ácidos graxos C14:0 e C16:0, em maior quantidade na linhagem de melanoma murino, e C18:1, presente em maior proporção na linhagem de melanócitos murina. Porém, a diferenciação das linhagens foi fortemente influenciada pelos metabólitos de baixo peso molecular creatina e creatinina. Análises de expressão gênica confirmaram que a via bioquímica deste metabólito está alterada entre as linhagens celulares.

O lipidoma das linhagens de melanoma humano revelou que os ácidos graxos C14:0, C16:1, C18:0 e C20:4 aumentaram sua proporção nas linhagens com maior potencial tumorigênico (VGP e MET). Análises de GC-MS e de componentes principais apontaram derivados de inositol como os principais contribuintes para a diferenciação das linhagens, e análises de RMN 2D confirmaram que os níveis de lipídeos da classe dos fosfatidilinositóis possuem uma relação direta com o potencial tumorigênico das 3 linhagens de células de melanoma humanas analisadas.

Os resultados demonstram que perfis lipidômicos podem ser utilizados para diferenciar linhagens de melanócitos de melanoma e também linhagens de melanomas em diferentes estágios de progressão do tumor, e a combinação das técnicas desenvolvidas pode fornecer novos métodos de diagnóstico e classificação deste carcinoma.

## ABSTRACT

Biomarkers that discriminate tumorigenic from normal cells are important but limited. In the present study, 2D HSQC-ed NMR lipid maps from human melanoma cell lines, having distinct tumorigenic potential (RGP, VGP and MET) and mouse melanocytes and melanoma cell lines were obtained. Regarding the mouse cell lines, we revealed through principal component analysis that the use of mitogenic agents, such as phorbol esters, can markedly influence the lipid profile of the melanocyte cell line, resembling the pattern of the most proliferative cell lines. Aqueous extracts were also characterized, and the metabolites that most indicated discrimination between the cell lines were quantified, allowing to characterize the metabolomic profile of the cell lines. The cell lines had different fatty acid compositions, as confirmed through GC-MS analysis, the melanocyte containing a lower proportion of C14:0 and C16:0, the opposite occurring with C18:1, when compared with the melanoma cell line, but the differentiation was mostly influenced to small-molecule metabolites: creatine and creatinine. Gene expression analysis confirmed that the synthetic pathway of these metabolites was altered between the cell lines.

The human melanoma lipidome showed a fatty acid composition with C14:0, C16:1, C18:0 and C20:4 having a higher proportion on the VGP and MET cell lines than in RGP. Multivariate and GC-MS analysis pointed out inositol derivatives as main contributors to the differentiation of the cells, and 2D NMR analysis established that the levels of phosphoinositol derivatives are related to the carcinogenic stage of the 3 cell lines.

These results demonstrate that lipidomic profiles were capable to discriminate melanocytes from melanoma cells and even melanomas on distinct tumorigenic stages. The combination of the applied techniques could be an efficient and convenient tool for early diagnosis and screening of melanoma disease.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características fenotípicas e genéticas das linhagens de melanoma humano utilizadas.....	40
Tabela 2. Características fenotípicas das linhagens murinas utilizadas.....	43
Tabela 3. Características das células das linhagens de melanoma humano em alta confluência (80-100%) e média confluência (40-60%).....	53
Tabela 4. Quantificação dos metabólitos presentes na fase MeOH:H <sub>2</sub> O após metanólise, partição, hidrólise, redução e acetilação dos extratos lipídicos obtidos das linhagens de melanoma humano RGP, VGP e MET.....	59
Tabela 5. Metabólitos e correspondentes deslocamentos químicos assinalados nos espectros de RMN de <sup>1</sup> H obtidos a partir dos extratos lipídicos das linhagens de melanoma humano RGP, VGP e MET.....	62
Tabela 6. Assinalamento das classes lipídicas presentes nos espectros de RMN de <sup>1</sup> H obtidos dos extratos lipídicos das linhagens murinas Melan-a e B16-F10.....	74
Tabela 7. Tempo de retenção ( <i>R<sub>t</sub></i> ) dos ácidos graxos metil e metil- <i>d</i> <sub>3</sub> éster obtidos após reação de esterificação nos extratos lipídicos obtidos da linhagem de melanoma humano SK-MEL-28.....	78
Tabela 8. Valores iniciais e finais dos parâmetros modificados para a otimização das análises através de GC-MS dos ésteres de ácidos graxos obtidos dos extratos lipídicos das linhagens Melan-a e B16-F10.....	78
Tabela 9. Deslocamentos químicos e respectivas contribuições na discriminação dos compostos presentes nos extratos lipídicos das linhagens murinas Melan-a e B16-F10..	82
Tabela 10. Assinalamentos e quantificação relativa dos metabólitos com concentrações alteradas presentes no espectro de RMN de <sup>1</sup> H do extrato aquoso das linhagens murinas Melan-a e B16-F10.....	85
Tabela 11. Deslocamentos químicos e respectivas contribuições na discriminação dos compostos presentes nos extratos lipídicos das linhagens murinas Melan-a e B16-F10..	89

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Papel pleiotrópico dos lipídeos na função celular.....	22
Figura 2. Diagrama com as etapas de progressão do melanoma.....	29
Figura 3. Estratégia de ação que foi utilizada nos experimentos.....	38
Figura 4. Microscopia das linhagens de melanoma humano WM1552 e WM 793.....	41
Figura 4 (continuação). Microscopia da linhagem de melanoma humano 1205 Lu.....	42
Figura 5. Microscopia da linhagem de melanócito murino Melan-a e da linhagem de melanoma murino B16-F10.....	44
Figura 6. Cromatografias desenvolvidas com diferentes sistemas de solventes.....	55
Figura 7. Composição de ácidos graxos presentes na fração apolar (hexano) após metanólise do extrato lipídico obtido das linhagens de melanoma humano.....	57
Figura 8. Curva padrão de mio-inositol.....	60
Figura 9. Espectros de RMN de $^1\text{H}$ dos extratos lipídicos das linhagens de melanoma humano RGP, VGP e MET (A, B e C, respectivamente) com as principais classes lipídicas assinaladas.....	63
Figura 10. Resultados da análise de componentes principais realizada com os espectros de $^1\text{H}$ obtidos dos extratos lipídicos das 3 linhagens humanas (RGP, VGP e MET, em preto, azul e verde na figura, respectivamente). A- <i>Scores plot</i> ; B- <i>Loadings plot</i> ; C- <i>Loadings 1D plot</i> .....	63
Figura 11. Mapa de deslocamento químico parcial do experimento de RMN 2D HSQC-ed realizado no extrato lipídico obtido da linhagem de melanoma humano WM 1552 (RGP).....	65
Figura 12. Mapa de deslocamento químico parcial do experimento de RMN 2D HSQC-ed realizado no extrato lipídico obtido da linhagem de melanoma humano 1205 Lu (MET).....	66
Figura 13. Mapa de deslocamento químico parcial do experimento de RMN 2D (HSQC-ed) realizado com um padrão de mio-inositol (A) dissolvido em clorofórmio:metanol (1:1) e com o extrato lipídico da linhagem de melanoma humano 1205 Lu (B) no mesmo solvente.....	68
Figura 14. Mapa de deslocamento químico parcial do experimento de RMN 2D ( $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$ HMBC sobreposto por HSQC-ed) realizado com padrão de fosfatidilinositol (A) e com o extrato lipídico da linhagem de melanoma humano 1205 Lu (B).....	68
Figura 15. Representação da porção polar da molécula de fosfatidilinositol com os deslocamentos químicos referentes aos hidrogênios do inositol e do resíduo de glicerol. As flechas indicam correlações à longa distância entre $^1\text{H}$ e $^{31}\text{P}$ (HMBC).....	69

Figura 16. Espectros de RMN de $^1\text{H}$ dos extratos lipídicos obtidos das linhagens murinas Melan-a e B16-F10.....	73
Figura 17. Mapa de deslocamento químico parcial do experimento de RMN 2D HSQC-ed realizado no extrato lipídico obtido da linhagem de melanócito murino Melan-a, mostrando os assinalamentos das principais classes de lipídeos encontradas.....	75
Figura 18. Mapa de deslocamento químico parcial do experimento de RMN 2D HSQC-ed realizado no extrato lipídico obtido da linhagem de melanoma murino B16-F10, mostrando os assinalamentos das principais classes de lipídeos encontradas.....	76
Figura 19. Quantificação relativa (%) dos derivados de ácidos graxos metil éster e metil- $d_3$ éster após a reação de metanólise nos extratos lipídicos obtidos das linhagens murinas Melan-a (barras brancas) e B16-F10 (barras negras).....	79
Figura 20. (A) Mecanismo de formação do rearranjo de McLafferty, com os respectivos valores de m/z para os derivados metil éster e metil- $d_3$ éster; (B) estrutura proposta de m/z 81 (cátion ciclohexenil), e (C) m/z 79 (cátion hexadienil).....	79
Figura 21. <i>Scores plot</i> (A) da análise de PCA realizada com os espectros de RMN de $^1\text{H}$ obtidos dos extratos lipídicos das linhagens murinas Melan-a e B16-F10, (B) <i>Loadings plot</i> , (C) <i>1D Loadings plot</i> .....	81
Figura 22. <i>Fingerprints</i> identificados no mapa de deslocamento químico de RMN 2D dos experimentos homo e heteronucleares.....	83
Figura 23. Espectros de RMN de $^1\text{H}$ dos extratos aquosos obtidos das linhagens murinas Melan-a e B16-F10.....	86
Figura 24. Níveis de expressão da enzima GAMT (guanidinoacetato-metiltransferase) nas linhagens murinas Melan-a e B16-F10.....	87
Figura 25. <i>Scores plot</i> (A) da análise de PCA realizada com os espectros de RMN de $^1\text{H}$ obtidos dos extratos lipídicos das linhagens murinas Melan-a (3 diferentes condições de cultivo) e B16-F10, (B) <i>Loadings plot</i> , (C) <i>1D Loadings plot</i> .....	88

## ABREVIATURAS, SÍMBOLOS, SIGLAS e TERMOS:

%: Porcentagem  
°C: graus *celsius*  
<sup>13</sup>C: Núcleo de Carbono  
1D: Unidimensional  
<sup>1</sup>H: Núcleo de hidrogênio  
2D: Bidimensional  
<sup>31</sup>P: Núcleo de Fósforo  
AcCl: Cloreto de acetila  
ACTB: Beta-actina  
AMP: Adenosina Monofosfato  
ATP: Adenosina Trifosfato  
B16-F0: Linhagem de melanoma murino B16-F0  
B16-F10: Linhagem de melanoma murino B16-F10  
BRAF: Proto-oncogene b-Raf (serina-treonina quinase)  
CD<sub>3</sub>OD: Metanol deuterado  
cDNA: DNA complementar  
CHCl<sub>3</sub>: Clorofórmio  
CO<sub>2</sub>: Dióxido de carbono  
COSY: *Correlation spectroscopy*  
CuSO<sub>4</sub>: Sulfato de cobre  
D: Deutério  
Da: Dalton  
DAG: Diacilglicerol  
DMSO: Dimetilsulfóxido  
EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético  
EI: Ionização eletrônica  
ESI: *Eletro Spray Ionization*  
ESI-MS/MS: *Eletro Spray Ionization-Mass Spectrometry in tandem*  
ESI-MS: *Eletro Spray Ionization-Mas Spectrometry*  
FAME: *Fatty acid methyl ester*  
FASN: *fatty acid synthase*  
FBS: Soro fetal bovino  
GAMT: Guanidinoacetato-metiltransferase  
GC-MS: *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*  
GPI: Glicosil fosfatidilinositol  
h: Horas  
H<sub>2</sub>O: Água  
H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: Ácido sulfúrico  
H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>: Ácido fosfórico  
HMBC: *Heteronuclear multi-bond correlation*  
HPLC: *High Performance Liquid Chromatography*  
HSQC: *Heteronuclear correlation via double inept transfer*  
HSQC-ed: HSQC com sequência de edição de multiplicidade  
LDL-R: receptores de lipoproteínas de baixa densidade  
m/z: Relação massa/carga  
M: Molaridade  
MeOH: Metanol  
MeOH-HCl: Metanol:HCl

MET: *Metastatic*  
MHz: Megahertz  
min: Minuto  
mL: Mililitros  
mRNA: RNA mensageiro  
MS: Mass Spectrometry  
N<sub>2</sub>: Gás nitrogênio  
Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: Sulfato de sódio  
NaBH<sub>4</sub>: Borohidreto de sódio  
nM: Nanomolar  
PC1: Primeiro componente principal  
PC2: Segundo componente principal  
PCA: Análise de componentes principais  
pH: Potencial hidrogeniônico  
PKC: Proteína-quinase C  
PMA: Forbol-12-miristato-13-acetato  
ppm: Parte por milhão de hertz  
qRT-PCR: PCR quantitativo em tempo real  
RGP: *Radial Growth Phase*  
RMN: Ressonância Magnética Nuclear  
rpm: Rotações por minuto  
T: Tesla  
TFA: Ácido trifluoroacético  
TLC: *Thin layer chromatography*  
TMS: Tetrametilsilano  
TMSP: Trimetilsililpropionato  
TOCSY: *Total correlation spectroscopy*  
VGP: *Vertical Growth Phase*  
 $\alpha_v\beta_3$ : Receptor integrina  
 $\delta$ : Deslocamento químico  
 $\mu$ L: Microlitro  
 $\mu$ m: Micrômetro

SANTANA-FILHO 2013 BIOQUÍMICA-UFPR

## NOTA SOBRE A NOMENCLATURA UTILIZADA PARA AS CLASSES LIPÍDICAS

Nas tabelas e figuras de RMN que se referem a assinalamentos dos deslocamentos químicos das classes lipídicas, optou-se por utilizar a nomenclatura adaptada de Coen (COEN *et al.*, 2003). Salvo quando indicado, as abreviaturas das classes lipídicas são as seguintes:

<b>Abreviatura</b>	<b>Metabólito/Classe lipídica</b>
Cer-C1	Carbono 1 da molécula de esfingosina
Cer-C2	Carbono 2 da molécula de esfingosina
Cer-C3	Carbono 3 da molécula de esfingosina
Chol	Colesterol
Chol-C <sub>n</sub>	Colesterol (o de <sup>13</sup> C/ <sup>1</sup> H especificado)
CreA	Creatina
CrE	Creatinina
DG	Diácilglicerol
H <sub>α</sub>	Hidrogênio alfa de ácidos graxos
H <sub>β</sub>	Hidrogênio beta de ácidos graxos
Gly-C1	Carbono 1 da molécula de glicerol
Gly-C2	Carbono 2 da molécula de glicerol
Gly-C3	Carbono 3 da molécula de glicerol
Mono-UFA	Ácidos graxos monoinsaturados
PC	Fosfatidilcolina
PE	Fosfatidiletanolamina
PI	Fosfatidilinositol
PLA	Plasmalogênio
Poli-UFA	Ácidos graxos poliinsaturados
PS	Fosfatidilserina
SM	Esfingomielina
TG	Triacilglicerol

Em relação aos glicerofosfolipídeos, as designações -1', -2', etc. referem-se aos grupamentos esterificados no fosfato que, por sua vez, também está ligado na forma de éster ao carbono 3 do resíduo de glicerol, como um guia geral a Figura 15 (molécula de fosfatidilinositol) pode ser utilizada como modelo.

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>18</b>
2.1. Lipídeos .....	18
2.2. Por que estudar lipídeos? .....	19
2.3. Lipidômica .....	20
2.3.1. ESI-MS .....	22
2.3.2. GC-MS .....	24
2.3.3. RMN .....	24
2.4. Lipidômica e câncer .....	27
2.4.1. Melanoma .....	28
2.4.2. Proteínas associadas ao metabolismo lipídico em processos tumorais .....	33
<b>3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS .....</b>	<b>36</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>38</b>
4.1. Estratégia de ação.....	38
4.2. Cultivo e manutenção das linhagens de células de melanoma humano .....	39
4.3. Cultivo e manutenção das linhagens de células murinas de melanoma e melanócitos. ....	42
4.4. Extração dos lipídeos.....	45
4.5. Extração pelo método de Folch .....	45
4.6. Cromatografia em camada delgada.....	45
4.7. Derivatizações.....	46
4.7.1. Derivatização para análise em GC-MS.....	46
4.7.2. Derivatizações utilizando reagentes deuterados.....	47
4.8. Análises por GC-MS.....	48
4.9. Análise por espectroscopia de ressonância magnética nuclear.....	49
4.10. Redução dos dados e pca.....	50
4.11. Ensaios de expressão de gênica.....	51
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>53</b>
5.1. Cultivo e análise das linhagens de melanoma humano.....	53
5.1.1. Cromatografia em camada delgada.....	54
5.1.2. Derivatização e análise por GC-MS .....	55
5.1.3. Análises de RMN.....	61
5.1.4. Discussão .....	67

<b>5.2. Cultivo e análise das linhagens de origem murina.....</b>	<b>72</b>
5.2.1. Análises de RMN.....	72
5.2.2. Derivatizações e análises por GC-MS .....	73
5.2.3. Análise de componentes principais.....	80
5.2.4. Avaliação da expressão gênica .....	85
5.2.5 Efeito do PMA no padrão de expressão lipídica das linhagens de melanócitos .....	87
5.2.6. Discussão .....	89
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>95</b>
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>97</b>
7.1. Análise do lipidoma das linhagens de melano ma humano.....	97
7.2. Análise comparativa do lipidoma das linhagens de origem murina Melan-a e B16-F10 .....	98
<b>8. PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>100</b>
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	
<b>10. ANEXOS .....</b>	<b>110</b>

SANTANA-FILHO 2013 BIOQUÍMICA  
UFPR

## 1. INTRODUÇÃO

A dificuldade de diagnóstico, aumento significativo da ocorrência nos últimos 50 anos na maioria dos países desenvolvidos (OBA-SHINJO *et al.*, 2006), e resistência aos tratamentos disponíveis (SOUSA e ESPREAFICO, 2008) tornam o melanoma um dos maiores desafios dos pesquisadores ligados à área de oncologia. O estudo deste tipo de tumor foi amplamente beneficiado pelo uso de linhagens celulares, que permitem a investigação de mudanças progressivas no metabolismo destas células que possam mostrar correlação com o processo tumorigênico (NOMURA *et al.*, 2010).

Durante o desenvolvimento do melanoma, como em outros tipos de câncer, a célula reprograma suas vias metabólicas para promover o crescimento celular, proliferação, e fontes de energia metabólica. Todos estes processos estão intimamente relacionados ao metabolismo de lipídeos, que se tornam assim excelentes fontes de informação sobre o estado metabólico das células em processo de tumorigênese, tornando a lipidômica um campo promissor na busca de biomarcadores do desenvolvimento do melanoma. Apesar do espetacular progresso na área de análise de biomoléculas nos últimos 15 anos, atualmente não existe nenhuma técnica analítica que permita a caracterização do lipidoma completo de matrizes biológicas com apenas um experimento. Assim, a utilização de uma ou mais técnicas surge como uma estratégia eficaz para se caracterizar e comparar o lipidoma obtido de matrizes das mais diversas origens, como tumores, linhagens celulares e extratos de plantas e microrganismos. Grande parte dos estudos lipidômicos utilizam técnicas analíticas de espectrometria de massas à pressão atmosférica, como ESI-MS (FERNANDIS e WENK, 2009), porém a aplicação conjunta de outras técnicas como GC-MS e RMN pode fornecer possibilidades de caracterizar o lipidoma obtido de matrizes biológicas quando estas estão disponíveis em quantidades limitadas (CANSELL *et al.*, 1997), ou quando é necessário o uso de técnicas não destrutivas,

permitindo a análise do extrato lipídico sem que ocorra diminuição na quantidade ou degradação da amostra, aplicação onde a técnica de RMN se mostra particularmente interessante (LE MOYEC *et al.*, 2000).

A caracterização do lipidoma de extratos obtidos de linhagens celulares, como linhagens de melanoma, pode fornecer evidências de moléculas correlacionadas com o metabolismo modificado destas células, indicando possíveis vias metabólicas alteradas e essas informações podem, então, ser correlacionadas com as obtidas por estudos de análise de expressão gênica (OBA-SHINJO *et al.*, 2005), possibilitando a análise conjunta dos dados e a enumeração de candidatos a biomarcadores, novas estratégias de terapia e, principalmente no caso do melanoma, apontar novas ferramentas para o diagnóstico precoce e a classificação do grau de agressividade dos tumores.

SANTANA-FILHO 2013 BCCQUIMICA-UFPR

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Lipídeos

Uma célula eucariótica contém mais de 1000 diferentes espécies lipídicas, a grande maioria delas são lipídeos que participam da composição das membranas celulares (KOLTER, 2006). Os lipídeos compreendem uma classe heterogênea de compostos, pois eles são definidos em função de uma propriedade física, e não de um grupo funcional específico.

Nos sistemas biológicos, os lipídeos exercem três funções gerais. Podem ser utilizados como armazenadores de energia metabólica, devido ao fato de estarem mais reduzidos que outras moléculas utilizadas para armazenamento de energia, como por exemplo, os carboidratos. Outra importante função exercida pelos lipídeos diz respeito a sua participação na formação das matrizes das membranas celulares, as quais são formadas por lipídeos anfipáticos, que são moléculas com porções hidrofóbicas e hidrofílicas. A capacidade das porções hidrofóbicas de se auto-associarem (conduzidas entropicamente pela água), e a tendência das porções hidrofílicas em interagir com o ambiente aquoso e com elas próprias, é a base física para a formação espontânea das membranas. Por último, os lipídeos podem atuar como segundos-mensageiros em processos de reconhecimento molecular e de transdução de sinal (VAN MEER, VOELKER e FEIGENSON, 2008).

Como citado anteriormente, os lipídeos anfipáticos possuem a propriedade de formar membranas espontaneamente, o que possibilitou às primeiras células separarem os seus constituintes internos do ambiente. O mesmo princípio é utilizado dentro da célula na formação das organelas, possibilitando a existência de um ambiente compartimentalizado onde possam ocorrer reações químicas específicas àquele ambiente, aumentando a eficiência dos processos bioquímicos e restringindo a dispersão dos produtos das reações. Além de exercer a função de barreira entre dois ambientes quase sempre aquosos, os lipídeos

possibilitam que as membranas auxiliem em outras funções como: brotamento, tubulações, fissão e fusão, características que são essenciais para os processos de divisão celular (VAN MEER *et al.*, 2008).

A composição lipídica das membranas é um determinante importante de sua fluidez e de diversas funções da célula, como, por exemplo, transporte mediado por permeases, atividades de enzimas ligadas à membrana, fagocitose, endocitose, produção de prostaglandinas e crescimento celular (SPECTOR e YOREK, 1985), demonstrando assim a importância dos lipídios, não apenas quantitativamente, mas também em sua diversidade de classes, como esteróis, fosfolípidos, e ácidos graxos.

O progresso recente na área de biofísica, química e genética tem chamado a atenção para o papel biológico da grande variedade de lipídeos existente nas membranas. A identificação de genes relacionados a doenças tem cada vez mais revelado o envolvimento de proteínas associadas com lipídeos. Glicolipídeos, balsas lipídicas (*rafts*) e proteínas ancoradas por GPI (Glicosilfosfatidilinositol) estão envolvidos em processos tumorigênicos e de endocitose e sinalização intracelular relacionada e mecanismos de infecção viral (MARSH e HELENIUS, 2006), enfatizando ainda mais a necessidade do estudo integrado dos lipídeos utilizando ferramentas lipidômicas.

## **2.2. Por que estudar lipídeos?**

O uso de lipídeos como em métodos prognósticos e diagnósticos tem se intensificado cada vez mais, dada a conexão entre diversos estados patológicos e alterações nas rotas metabólicas ligadas a lipidologia. O aumento da prevalência da obesidade tem contribuído significativamente para este fenômeno, visto que doenças como diabetes tipo 2, patologias cardiovasculares, osteoartrite e alguns tipos de câncer possuem como causas aspectos relacionados ao aumento da obesidade (DIXON, 2010). Sendo assim, o estudo do

metabolismo dos lipídeos e de sua homeostasia mostra-se importante tanto para se entender as causas como para que novos métodos de tratamento sejam desenvolvidos e implementados. Processos terapêuticos que tem como base moléculas lipídicas ou mesmo enzimas ou proteínas acessórias (transportadoras ou que compõem junto com lipídeos motivos estruturais nas membranas de organelas e células) são hoje considerados viáveis clinicamente (TUCKER e HONN, 2013), e o aumento do número de terapias com focos no metabolismo de lipídeos depende intrinsecamente do aumento do conhecimento sobre a composição, função e comportamento dos lipídeos componentes da célula durante os processos de desenvolvimento destas enfermidades.

### **2.3. Lipidômica**

Entende-se por lipidômica a análise de todos os metabólitos conectados ao estudo de todos os lipídeos da célula (VAN MEER *et al.*, 2007). Assim, pode-se incluir em seu campo de estudo a análise qualitativa e quantitativa de todas as classes de lipídeos, transportadores de lipídeos, enzimas envolvidas no metabolismo e os mecanismos moleculares através dos quais os lipídeos auxiliam nas funções celulares (HAN e GROSS, 2003; HAN e GROSS, 2005). A grande variedade de moléculas lipídicas existentes nas células demanda a existência de uma maquinaria de síntese altamente custosa energeticamente, assim pode-se inferir que há uma vantagem evolutiva em contar com um complexo repertório de lipídeos. Por outro lado, importantes doenças humanas, tais como aterosclerose, doenças infecciosas, doença de Alzheimer e câncer, possuem um componente lipídico em sua epidemiologia (VAN MEER *et al.*, 2008). A compreensão molecular da contribuição dos lipídeos para o processo de estabelecimento da doença possibilitará o desenvolvimento de novas abordagens de prevenção e diagnóstico.

A lipidômica pode ser definida como uma área que estuda a função que cada classe de lipídeos desempenha dentro da célula, entendendo-se por função o papel que determinado lipídeo adquiriu ao longo do processo evolutivo. Como revisado por Gross e Han (GROSS e HAN, 2011), a composição individual das classes lipídicas que formam as bicamadas constituintes das membranas são determinantes essenciais de diversas funções altamente especializadas exercidas pelas membranas celulares, assim alterações tanto na classe, subclasse ou mesma na composição individual (covalente) das moléculas, podem levar a alterações destas funções. O efeito destas alterações fez com que, durante o processo evolutivo, fossem selecionadas aquelas que promovessem um efeito benéfico no metabolismo celular e sinalização, promovendo então a formação de diversas organelas celulares delimitadas por membranas, as quais desempenham papéis altamente especializados essenciais para diversas funções celulares bem como para adaptações às alterações no meio externo (Figura 1).

Os avanços recentes na área de espectrometria de massas, cromatografia e ressonância magnética nuclear tem reforçado o rápido desenvolvimento de análises lipídicas de uma forma holística, com alta sensibilidade e possibilitando análises em larga escala, incluindo os lipídeos no domínio dos estudos da família *ômica*, que já inclui a proteômica e a genômica (SUD *et al.*, 2007). Lipidômica é um novo termo para descrever um campo científico que é muito mais amplo do que lipidologia, a ciência dos lipídios (VAN MEER *et al.*, 2007). Mas, como desenvolver metodologias capazes de detectar, identificar e quantificar as mais de 6000 moléculas (KOLTER, 2006) que são classificadas como lipídeos? A solução é a união de diversas técnicas de análise estrutural, sendo que as três mais importantes são: ESI-MS (Ionização por electroespray acoplada à espectrometria de massas), GC-MS (cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas) e RMN. Descreveremos brevemente estas técnicas, citando alguns exemplos e enfatizando suas vantagens e desvantagens.

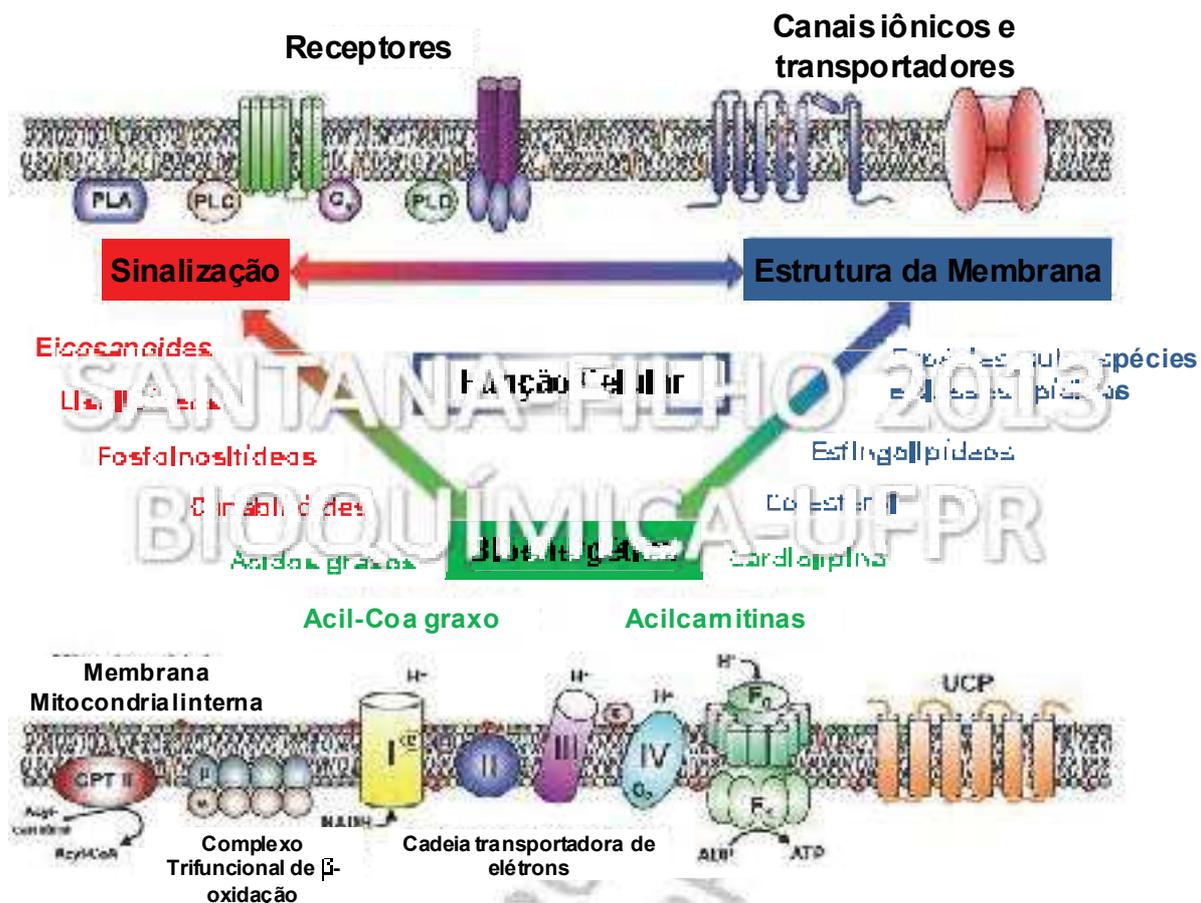


Figura 1. Papel pleiotrópico dos lipídeos na função celular, enfatizando a atuação como sinalizadores, componentes estruturais - principalmente nas membranas - e em processos bioenergéticos. Adaptado de GROSS e HAN (GROSS e HAN, 2011).

### 2.3.1. ESI-MS

O desenvolvimento de técnicas suaves de ionização, como a ionização por *eletrospray* (ESI- *Eletro Spray Ionization*) revolucionou o campo da análise de lipídeos, pois esse tipo de técnica possibilitou a análise de lipídeos polares através da espectrometria de massas (MS), embora a análise direta de extratos lipídicos possa ser prejudicada por efeitos de supressão de sinal provocados por outras classes de lipídeos (VAN MEER *et al.*, 2007). Outro problema é a necessidade de se realizar *scans* em diferentes modos de ionização, pois diversas classes lipídicas apresentam diferentes características de ionização nos modos positivo e negativo, ou mesmo pela perda da especificidade na identificação, na presença de moléculas isobáricas.

Por outro lado, através de uma criteriosa preparação da amostra, algumas classes de lipídios podem ser resolvidas por meio de ESI-MS na fonte de ionização (HAN e GROSS, 2003). Uma forma de aliar estas duas estratégias é realizar uma separação prévia da amostra e analisar as frações obtidas por ESI-MS, permitindo a identificação e quantificação de amostras isobáricas sem o uso de equipamentos de alta resolução, que tornariam a análise altamente custosa (DE SOUZA *et al.*, 2009). Em essência, as classes de lipídios podem ser separadas baseadas num princípio de polaridade, porém, para ser eficaz, essa abordagem muitas vezes requer múltiplas etapas cromatográficas sequenciais. A completa aplicação de técnicas de ESI-MS em análises lipidômicas foge ao objetivo deste trabalho, mas maiores aplicações podem ser encontradas em (CLARK *et al.*, 2011; HAN e GROSS, 2003; MILNE *et al.*, 2006; NAKAYASU *et al.*, 2009). Um exemplo envolvendo a análise de matrizes complexas (tecido hepático de camundongo e células cultivadas de *Schistosoma mansoni*) é o estudo de Retra *et al.* (RETRA *et al.*, 2008), onde o objetivo era a análise dos lipídeos polares. Para isso foi realizado um fracionamento visando separar os lipídeos neutros, utilizando uma coluna de sílica-gel. Após isso, foram realizados experimentos de HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) acoplado à espectrometria de massas do tipo ESI-MS/MS, que permitiu separar as espécies moleculares de todas as classes de fosfolipídeos em uma única corrida cromatográfica, inclusive com a separação de moléculas isobáricas, isoméricas e quantificação dos níveis de lípidos presentes nas amostras, diferenciando-os dos lípidos gerados na fonte de ionização. Por este exemplo, pode-se concluir que uma etapa prévia de separação cromatográfica é essencial no estudo do lipidoma de matrizes complexas por meio de técnicas de ESI-MS. E mesmo sem esta etapa, o uso de técnicas de cromatografia líquida é imprescindível para a completa elucidação das estruturas lipídicas no espectro de massas. Além disso, dependendo da quantidade de amostra disponível, a análise pode se tornar inviável.

### 2.3.2. GC-MS

O uso de GC-MS (*Gas Chromatography-Mass Spectrometry*) em análises lipídômicas implica em algumas limitações, relacionadas com a baixa pressão de vapor e alto peso molecular relativo da maioria das classes lipídicas. Essas características dificultam a análise de lipídios de forma intacta por cromatografia gasosa, sendo necessária, na maioria das vezes, a conversão em derivados mais voláteis antes do processo cromatográfico (LIPSKY e LANDOWNE, 1960), como as descritas no estudo de Sasaki *et al.* (SASSAKI *et al.*, 2008a). Neste trabalho, as estratégias de derivatização química utilizadas permitiram diferenciar todas as classes de monossacarídeos, aminoácidos, glicoconjugados, ramnolipídeos e lipopolissacarídeos. Os padrões e extratos foram submetidos à derivatização e analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS), possibilitando identificar tanto os componentes lipídicos (ácidos graxos, inclusive  $\beta$ -hidroxilados) como os compostos conjugados (ramnose, arabinose, glucose, ácido glucurônico e ácido-3-ceto-desoxioctusolônico). Assim, embora não se possa analisar os lipídeos polares diretamente, o uso de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, aliado a estratégias de hidrólise e derivatização química, permite analisar tanto os componentes lipídicos quanto as moléculas conjugadas associadas, que sejam passíveis de volatilização. A grande vantagem desta técnica é sua alta sensibilidade, permitindo a análise de quantidades que podem chegar a escala de atomol ( $10^{-18}$ ) e a excelente resolução das análises cromatográficas. A desvantagem está no fato de que a amostra necessita passar por processos de derivatizações, que muitas vezes demandam tempo e podem comprometer a reprodutibilidade das análises.

### 2.3.3. RMN

Outra tecnologia importante para a investigação lipídômica é a ressonância magnética nuclear (RMN). O grande benefício da técnica de RMN está relacionado com o pouco tempo

necessário para as análises e o fato de ser uma análise não destrutiva, diferente das técnicas que envolvem espectrometria de massas, permitindo que a amostra seja utilizada posteriormente em outros experimentos (VINAYAVEKHIN, HOMAN e SAGHATELIAN, 2010). A sua grande desvantagem está relacionada à menor sensibilidade se comparada com as técnicas que envolvem espectrometria de massas, particularmente GC-MS e ESI-MS.

Os estudos pioneiros utilizando RMN com foco em análises de extratos lipídicos obtidos de células foram os realizados pelo grupo de Casu *et al.* (CASU *et al.*, 1991), que assinalou a quase totalidade de classes lipídicas em extratos obtidos de fígado de rato utilizando técnicas de RMN 1D de  $^1\text{H}$  e 2D do tipo COSY. Meneses e Glonek (MENESES e GLONEK, 1988) também realizaram análises pioneiras, mas com ênfase nas análises de fosfolípidos por técnicas 1D de RMN do núcleo de  $^{31}\text{P}$ . Estes estudos, embora tenham fornecido informações valiosas sobre os assinalamentos das classes lipídicas, tinham como objetivo estabelecer a RMN como técnica quantitativa, ao comparar os resultados obtidos com análises das mesmas matrizes por técnicas de HPLC. Outros estudos com o mesmo objetivo se sucederam, comparando as quantificações obtidas por RMN com técnicas de HPLC ou TLC (*Thin Layer Chromatography*), mas sempre utilizando espectros de RMN 1D de  $^1\text{H}$  ou  $^{31}\text{P}$  ou 2D homonucleares do tipo COSY (ADOSRAKU *et al.*, 1994; CASU *et al.*, 1992; CHOI, CASU e GIBBONS, 1993; TYAGI *et al.*, 1996). Com o advento de novas sondas, técnicas de detecção inversa e dos equipamentos de campos magnéticos maiores que 14,1 T, Wilker e Leibfritz (WILLKER e LEIBFRITZ, 1998) publicaram um estudo refinado assinalando os deslocamentos de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de ácidos graxos presentes em extratos de tecidos e fluídos corporais. As aplicações na área de metabolômica foram sendo desenvolvidas, destacando-se os estudos de Coen *et al.*, (COEN *et al.*, 2007; COEN *et al.*, 2003) pelo uso de técnicas de análise multivariada, Mahrous *et al.* (MAHROUS, LEE e LEE, 2008), pela aplicação de técnica de HSQC na obtenção de “mapas” das classes lipídicas em

microrganismos e Lutz *et al.* (LUTZ e COZZONE, 2010a; LUTZ e COZZONE, 2010b), que aperfeiçoaram as análises 1D de  $^{31}\text{P}$  aplicadas a extratos de matrizes biológicas. Aplicações envolvendo a análise do comportamento de biomembranas, bem como interações proteína-lípido também vêm sendo descritas (GAWRISCH, ELDHO e POLOZOV, 2002). Uma vantagem adicional dos estudos lipidômicos por técnicas de RMN é que esta técnica também é bastante utilizada em exames diagnósticos de diversas enfermidades na prática clínica, por meio de uma variação da técnica de RMN, chamada de RMI (Ressonância Magnética de Imagem), onde as imagens de tecidos e órgãos podem ser obtidas, e com o mesmo *Hardware* adaptações permitem que se obtenham espectros de  $^1\text{H}$  e  $^{31}\text{P}$  que auxiliem na identificação de distúrbios metabólicos e correlação destas com as imagens obtidas (RAMIN, TOGNOLA e SPOTTI, 2003).

Em resumo, análises lipidômicas requerem métodos que possam caracterizar e quantificar o conteúdo total de lipídios presentes em matrizes biológicas. Estes resultados podem ser correlacionados com os obtidos por outros experimentos de biologia celular e molecular, visando esclarecer quais vias, macromoléculas e metabólitos são relevantes para a síntese, degradação e transporte de lipídios (VAN MEER *et al.*, 2007). Ao mesmo tempo, o estudo do lipidoma permite elucidar qual relação existe entre o metabolismo dos lipídios e as outras áreas da metabolômica, especialmente no que concerne ao tratamento e prevenção de doenças, visando principalmente desenvolver métodos padronizados que possibilitem a aplicação do conhecimento do lipidoma no desenvolvimento de medicamentos, marcadores moleculares, aplicações clínicas e elucidação de rotas metabólicas. A lipidômica abrange também tópicos que não podem ser esclarecidos sem uma compreensão completa da base física dos comportamentos dos lipídios, especialmente as interações lipídeo-lipídeo e lipídeo-proteína.

## 2.4. Lipidômica e câncer

O desenvolvimento do câncer é profundamente ligado à ocorrência de diversas alterações no genoma, que basicamente envolvem mutações que promovem um caráter dominante aos oncogenes, enquanto que outras mutações conferem caráter recessivo aos genes supressores de tumor. A tumorigênese é aceita como um processo que compreende múltiplas etapas, que são consequências das alterações genéticas acima citadas e alterações em vias de sinalização intracelular, seja por aumento da expressão ou atividade dos intermediários celulares, levando a transformação de células consideradas normais em células tumorigênicas. A investigação das origens, diagnósticos e tratamentos para os diversos tipos de câncer gera uma quantidade de informação que sugere uma complexidade cada vez maior para esta doença. Porém, como proposto no início dos anos 2000 por Hanahan e Weinberg (HANAHAN e WEINBERG, 2000b), o desenvolvimento do câncer pode ser entendido como um processo lógico, desde que alguns princípios básicos, como os que determinam a transformação de células normais em tumores malignos, possam ser detectados e caracterizados na maior diversidade de tumores possível. Estes princípios foram enumerados pela primeira vez em 2000 e recentemente revisados (HANAHAN e WEINBERG, 2011), e incluem: manutenção da proliferação através de processos de sinalização, inibição de supressores de crescimento, resistência à morte celular, imortalidade replicativa, indução de angiogênese, e ativação de mecanismos de invasão e metástase. Cada um desses processos representa o avanço da doença sobre um mecanismo de proteção da célula, e essa multiplicidade de mecanismos explica, em parte, porque o câncer é uma ocorrência relativamente rara em relação a outras doenças, se considerarmos a média de tempo de vida de um organismo (HANAHAN e WEINBERG, 2000b).

Ainda assim, mais de 100 tipos diferentes de tumores são conhecidos, com subvariedades dentro de cada tipo (HANAHAN e WEINBERG, 2000b), mostrando a

complexidade e enorme desafio científico desta doença. Estratégias bem sucedidas de tratamento vem sendo desenvolvidas, como as baseadas em imunoterapias que, ao invés de atuar diretamente nas células cancerígenas, tem como alvo os antígenos expressos pelas células malignas, visando auxiliar as respostas do sistema imune contra as células tumorigênicas (WEINER, MURRAY e SHUPTRINE, 2012). Porém, o entendimento do desenvolvimento da doença e, principalmente, o desenvolvimento de novas metodologias de diagnóstico, mostram-se como um passo limitante para que os avanços obtidos na área experimental venham a proporcionar reais benefícios para o diagnóstico e tratamento desta doença.

#### **2.4.1. Melanoma**

O Melanoma é considerado um dos principais desafios atuais da medicina, tendo em consideração as suas dificuldades de diagnóstico, baixa resposta às terapias disponíveis (SOUSA e ESPREAFICO, 2008) e a alta incidência na população ocidental (DUMAZ *et al.*, 2006). Por ter como características uma alta agressividade, alta incidência de metástases e elevada resistência aos tratamentos existentes (SOUSA e ESPREAFICO, 2008), o melanoma é um candidato preferencial para estudos de alterações metabólicas entre os diferentes estágios de evolução de tumores.

Com base em aspectos clínicos e histopatológicos, cinco etapas da progressão de melanoma têm sido propostas: nevos adquiridos e congênitos, estruturalmente semelhantes com melanócitos normais; nevo displásico, que já apresenta diferenças morfológicas; fase de crescimento radial (*Radial Growth Phase* - RGP), onde as células tumorais estão restritas à epiderme; fase de crescimento vertical (*Vertical Growth Phase* - VGP), na qual as células tumorais adquirem a capacidade de penetrar a membrana basal, atingindo a derme e a fase de crescimento metastático (*Metastatic* - MET), onde as células se desprendem do tumor

original, e são capazes de crescer em tecidos mais profundos da pele (GRAY-SCHOPFER, WELLBROCK e MARAIS, 2007; MEIER *et al.*, 1998) (Figura 2).



Figura 2. Diagrama com as etapas de progressão do melanoma de acordo com o modelo de Clark. Adaptado de Miller e Mihm (MILLER e MIHM, 2006).

Grande parte dos estudos que buscam a compreensão dos mecanismos relacionados ao desenvolvimento do melanoma avaliam a caracterização do perfil de expressão gênica de tumores, principalmente de origem humana (HAQQ *et al.*, 2005; WEINER *et al.*, 2012), buscando correlacionar eventos que apontem para conjuntos de genes que forneçam marcadores da progressão do melanoma. Embora estes estudos venham fornecendo resultados esclarecedores, algumas questões ainda necessitam de maiores elucidações, como, por exemplo, o fato de que o perfil de expressão gênica de melanomas no estágio de progressão RGP revelou-se semelhantes ao de alguns melanomas no estágio de progressão MET (HAQQ *et al.*, 2005). Outra dificuldade neste tipo de estudo é a escassez de matriz (tecido/células) do tumor disponível para realização de experimentos, o que impossibilita a aplicação de outros métodos na caracterização destes tumores, visando a confirmação ou uma melhor

compreensão dos resultados obtidos nos ensaios de expressão gênica. Ainda que estratégias fundamentadas em técnicas de imunohistoquímica venham sendo aplicadas com sucesso para contornar este problema (KASHANI-SABET *et al.*, 2009), uma das opções mais viáveis é a utilização de linhagens celulares que mimetizem as diferentes etapas de progressão do melanoma. Hoje, diversas linhagens de melanoma estão disponíveis, destacando-se as linhagens de origem murina da série B16-F (NAKAMURA *et al.*, 2002), e as linhagens de melanoma humano da série WM (*Wistar Melanoma*) (HERLYN, 1990; MANCIANTI *et al.*, 1990; MASTERS *et al.*, 2002), empregadas constantemente em estudos envolvendo testes de agentes terapêuticos, ensaios de invasividade, caracterização metabólica e avaliação de populações de genes diferentemente expressos, tanto das linhagens individuais quanto de várias linhagens de origens diferentes, ou em diferentes estágios de progressão de tumor (SOUSA e ESPREAFICO, 2008). O estabelecimento de linhagens celulares contínuas permitiu, inclusive, o desenvolvimento de linhagens de células não transformadas, inclusive melanócitos (BENNETT, COOPER e HART, 1987). Estas células imortalizadas podem ser utilizadas para se avaliar o efeito de determinado agente terapêutico no metabolismo de células normais, porém o cultivo e manutenção destas linhagens dependem da adição de agentes promotores de crescimento que, em muitos casos, alteram o metabolismo celular e podem contribuir para a aquisição por parte da linhagem de um fenótipo proliferativo. Embora linhagens imortalizadas de melanócitos de origem murina sejam conhecidas desde a década de 80 (BENNETT *et al.*, 1987), a maioria dos estudos com melanócitos de origem humana utilizam culturas primárias (CHAO-HSING e HSIN-SU, 1991; KRASAGAKIS *et al.*, 1993), que necessitam da adição de inúmeros complementos ao meio de cultivo. Recentemente, porém, algumas linhagens imortalizadas de melanoma humano, que vem sendo desenvolvidas desde 2003 (GRAY-SCHOPFER *et al.*, 2006; SCOTT *et al.*, 2002; SVIDERSKAYA *et al.*, 2003), se tornaram disponíveis através do *Wellcome Trust Functional*

*Genomics Cell Bank* (- The Wellcome Trust Functional Genomics Cell Bank: holdings, 2010), que desenvolveu os meios de cultura recomendados para cada linhagem e fornece auxílio para o cultivo e aquisição dos meios e materiais necessários para a manutenção das linhagens.

Estudos envolvendo o uso de linhagens celulares, porém, também possuem suas adversidades. O alto custo envolvido para simular o ambiente de desenvolvimento de tumor nas culturas é um deles. Essa metodologia utiliza células derivadas de culturas primárias, transformadas ou não transformadas, mas em sua grande maioria imortalizadas, que nem sempre podem refletir o metabolismo da mesma forma que tumores de origem clínica (NAKAMURA *et al.*, 2002). Porém, estes modelos fornecem muitas outras vantagens, como a possibilidade de se obter uma maior quantidade de matriz (células), variação das condições de cultivo, como a adição de agentes quimioterápicos ou promotores de tumor, e melhor controle das condições experimentais, propiciando resultados mais reprodutivos com a mesma linhagem celular ou entre linhagens diferentes. Sendo assim, mesmo com as adversidades já citadas, o uso de linhagens celulares apresenta-se como uma ótima alternativa, principalmente para estudos que busquem o desenvolvimento e aplicação de novas metodologias de diagnóstico e caracterização do melanoma, os quais podem fornecer evidências que futuramente serão investigadas em modelos clínicos.

Com o uso de linhagens celulares, outras técnicas complementares podem então ser aplicadas para se caracterizar o perfil metabólico dos melanomas, e assim fornecer informações que complementem ou mesmo direcionem experimentos de expressão gênica, imunohistoquímica, avaliações enzimáticas e até mesmo estudos clínicos. Dentre as diversas ramificações metabolômicas disponíveis, a lipidômica surge como excelente candidata para a aplicação no estudo da evolução do melanoma que, como todo processo tumorigênico, depende de fenômenos envolvidos com sinalização, armazenamento de energia, crescimento e

multiplicação celular, que por sua vez são todos relacionados ao metabolismo lipídico (FERNANDIS e WENK, 2009).

Entretanto, até hoje poucos estudos foram realizados para se caracterizar e comparar o perfil lipídico apresentado por linhagens de células de melanoma de origem humana em diferentes estágios de progressão de tumor. E, mais surpreendente ainda, é o fato de que um número ainda menor de investigações buscou caracterizar e comparar o perfil de expressão lipídica de linhagens de melanoma de qualquer organismo.

Um dos estudos pioneiros a focar a composição lipídica, relacionando-a a um estado metabólico de câncer foi o realizado por Portoukalian *et al.* (PORTOUKALIAN, ZWINGELSTEIN e DORÉ, 1979), onde os autores estudaram a variação lipídica de 30 tumores do tipo melanoma de origem humana, coletados de modo cirúrgico ou por meio de autópsias, porém não foi encontrada nenhuma diferença significativa entre os níveis de fosfolídeos e de colesterol presentes nos extratos estudados.

Devido a sua alta proporção nos extratos lipídicos de todos os tipos celulares, os fosfolídeos e metabólitos associados são candidatos preferenciais em estudos de diferenciação entre linhagens de células de melanoma com diferentes potenciais de agressividade. Utilizando linhagens de melanoma murino com distintos potenciais metastáticos (B16-F1, B16-F10 e BL-6), Trulla *et al.* (LLIGONA TRULLA *et al.*, 1992a) reportaram a diminuição do conteúdo total de fosfolídeos com o aumento da confluência. Os autores também citam que o fosfatidilinositol apresentou um comportamento distinto nas linhagens estudadas, aumentando em quantidade nas células com maior potencial de agressividade, sugerindo assim uma possível ligação entre as rotas metabólicas de síntese de fosfoinosítídeos e o potencial metastático. Em outro estudo, foi verificado que células de melanoma murino B16-F10 (mais agressivas) possuem uma menor razão entre fosfolídeos e colesterol e uma maior razão entre fosfatidilcolina/fosfatidiletanolamina quando comparadas

com B16-F1 (menos agressivas) (SCHROEDER e GARDINER, 1984a). Porém, todos estes estudos não puderam se beneficiar de técnicas modernas de espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear, que permitiriam a identificação e quantificação mais precisa das classes lipídicas presentes nessas amostras.

O desenvolvimento de um fenótipo metastático vem sendo associado com alterações nos níveis de glicolipídeos e fosfolipídeos presentes nas membranas destas células (HAKOMORI, 1985; RUGGIERI *et al.*, 1999). Além disso, o melanoma, assim como qualquer outro processo neoplásico, pode avançar etapas durante o seu desenvolvimento (MEIER *et al.*, 1998), tornando ainda mais importante a caracterização do perfil metabolômico dessas linhagens nas suas diferentes fases de progressão. Estes estudos podem ajudar a desenvolver novas estratégias para o desenvolvimento de terapias e técnicas de diagnóstico e tratamento.

#### **2.4.2. Proteínas associadas ao metabolismo lipídico em processos tumorais**

Entre as vias bioquímicas que tem demonstrado uma influência no metabolismo de lipídeos em células tumorigênicas, podemos destacar as reguladas pela proteína p53. Embora a principal função dessa proteína esteja relacionada a efeitos de supressão de tumores, estudos recentes identificaram que uma enzima envolvida na homeostase de ATP, (guanidinoacetato-metiltransferase - GAMT, que atua na via metabólica de produção/degradação de creatina/fosfocreatina) tem sua atividade regulada positivamente pela proteína p53 durante a oxidação de ácidos graxos na ausência de glucose (IDE *et al.*, 2010). Estas descobertas apontam para funções metabólicas até então não relatadas para p53, e mesmo para a enzima GAMT, que era sabido estar envolvida em alguns processos neoplásicos, como demonstrados em estudos com diferentes modelos tumorigênicos (IDE *et al.*, 2010). Embora o estudo das alterações nestas rotas metabólicas possa ser feito por meio de experimentos a níveis

transcricionais, técnicas modernas de metabolômica permitem visualizar os metabólitos que apontem para as principais alterações nas vias metabólicas, que podem ser então confirmadas por avaliações de níveis de transcrito e atividades enzimáticas específicas.

#### 2.4.2.1 Serina-treonina quinases: Proteína quinase C

Dentre as proteínas pertencentes à classe das serina-treonina quinases, as que constituem a subclasse das proteínas quinases C (PKC) são alvos frequentes de estudos envolvendo processos de desenvolvimento de tumores devido ao fato dessas enzimas possuírem um papel importante nas vias de transdução de sinais, tendo sido inicialmente ligadas a processos pró-mitogênicos, embora esta propriedade venha sendo revelada como isoforma e tecido-dependente, onde se mostra que a PKC possui também uma função anti proliferativa, em geral através da ativação de inibidores do ciclo celular (BROOKS *et al.*, 1993; GRINER e KAZANIETZ, 2007). Essas proteínas estão envolvidas com o metabolismo lipídico devido ao fato de seu mecanismo geral de ativação envolver a ligação de segundos-mensageiros como, por exemplo, os diacilgliceróis (DAG), como efetores endógenos e ésteres de forbol como efetores exógenos (PMA ou TPA - forbol-12-miristato-13-acetato) (SPITALER e CANTRELL, 2004).

Existem nove genes que codificam para PKC, esses genes codificam para as isoenzimas classificadas em três grupos: PKC clássicas (cPKCs: PKC $\alpha$ , PKC $\beta$ I, PKC $\beta$ II e PKC $\gamma$ ), PKCs "modernas" (nPKCs: PKC $\delta$ , PKC $\epsilon$ , PKC $\zeta$  e PKC $\theta$ ) e PKCs atípicas (aPKCs: PKC $\xi$  e PKC $\iota$ ). cPKCs podem ser ativadas por cálcio, ésteres de forbol ou diacilgliceróis ao passo que nPKCs podem ser ativadas apenas por ésteres de forbol ou DAG. PKC atípicas (aPKCs) são insensíveis à cálcio ou DAG. PKCs  $\alpha$ ,  $\delta$  e  $\epsilon$  são amplamente expressas, enquanto que a expressão das outras PKCs é em grande parte do tipo célula/tecido específica (DENNING, 2012; GRINER e KAZANIETZ, 2007).

As proteínas quinases C desempenham funções tanto no desenvolvimento normal quanto em processos neoplásicos dos melanócitos (DENNING, 2012). Devido à heterogeneidade destas enzimas, sua função exata necessita de uma avaliação baseada em outros aspectos metabólicos, permitindo assim a correlação das informações, objetivando-se focar nessas quinases como novos alvos de medicamentos.

SANTANA-FILHO 2013 BIOQUÍMICA  
UFPR

### 3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

A lipidômica se mostra como uma área promissora, podendo complementar a proteômica e a genômica ao fornecer uma visão dinâmica do metabolismo dos lipídeos, permitindo a obtenção de dados qualitativos e quantitativos das diversas classes lipídicas presentes em extratos obtidos de diversas matrizes biológicas. O desenvolvimento desta área científica está intimamente relacionado à evolução das técnicas de análise de lipídeos. Trabalhos recentes realizados em nosso laboratório demonstraram resultados extremamente promissores nesta área de estudo (DE SOUZA *et al.*, 2009; SASSAKI *et al.*, 2008b). Além disso, como enfatizado na revisão bibliográfica, poucos estudos visaram elucidar variações lipídicas que possam ocorrer entre linhagens tumorigênicas, especialmente melanoma, com diferentes graus de agressividade, sobretudo utilizando técnicas de espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear. O estudo do lipidoma dessas linhagens pode revelar moléculas que venham a servir como marcadores, possibilitando o desenvolvimento de métodos padronizados para sua detecção e o seu uso clínico no diagnóstico do grau de agressividade de tumores, ou mesmo auxiliar na prevenção, ao se correlacionar os estágios iniciais do desenvolvimento de determinado processo carcinogênico com moléculas presentes no lipidoma. Além disso, as técnicas desenvolvidas poderão ser aplicadas em análises lipidômicas de outras matrizes, expandindo a abordagem para o estudo do lipidoma de microrganismos, mecanismo de infecção de células eucarióticas por vírus, estudos de quimiotaxia, entre outros.

Diante disto, o objetivo deste trabalho é utilizar técnicas de cromatografia, espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear em análises lipidômicas visando elucidar, de maneira dinâmica, mudanças no conteúdo e tipos de lipídeos e moléculas conjugadas que possam estar presentes em extratos lipídicos de diferentes matrizes biológicas. Como objetivos específicos, temos os seguintes tópicos:

- Caracterizar qualitativa e quantitativamente mudanças no conteúdo lipídico presentes nos extratos de células de diferentes linhagens de melanoma humano, utilizando técnicas de derivatização química, cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear.
- Utilizar as mesmas técnicas na caracterização do lipídoma de células de melanócitos e de melanoma de origem murina.
- Aplicar técnicas de espectroscopia de ressonância magnética nuclear utilizando diferentes núcleos, como  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$  e  $^{31}\text{P}$ , buscando obter assinalamento específico para as principais classes de lipídeos, e verificar a correlação dos resultados obtidos utilizando esta técnica com mudanças qualitativas ou quantitativas dos lipídeos obtidos, por técnicas de análise multivariada.
- Utilizar técnicas de biologia celular e molecular, visando ratificar os resultados obtidos e confirmar as vias metabólicas que se apresentem alteradas.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Estratégia de ação

Os experimentos desta tese foram elaborados de acordo com a estratégia de ação cujas etapas estão mostradas na Figura 3:

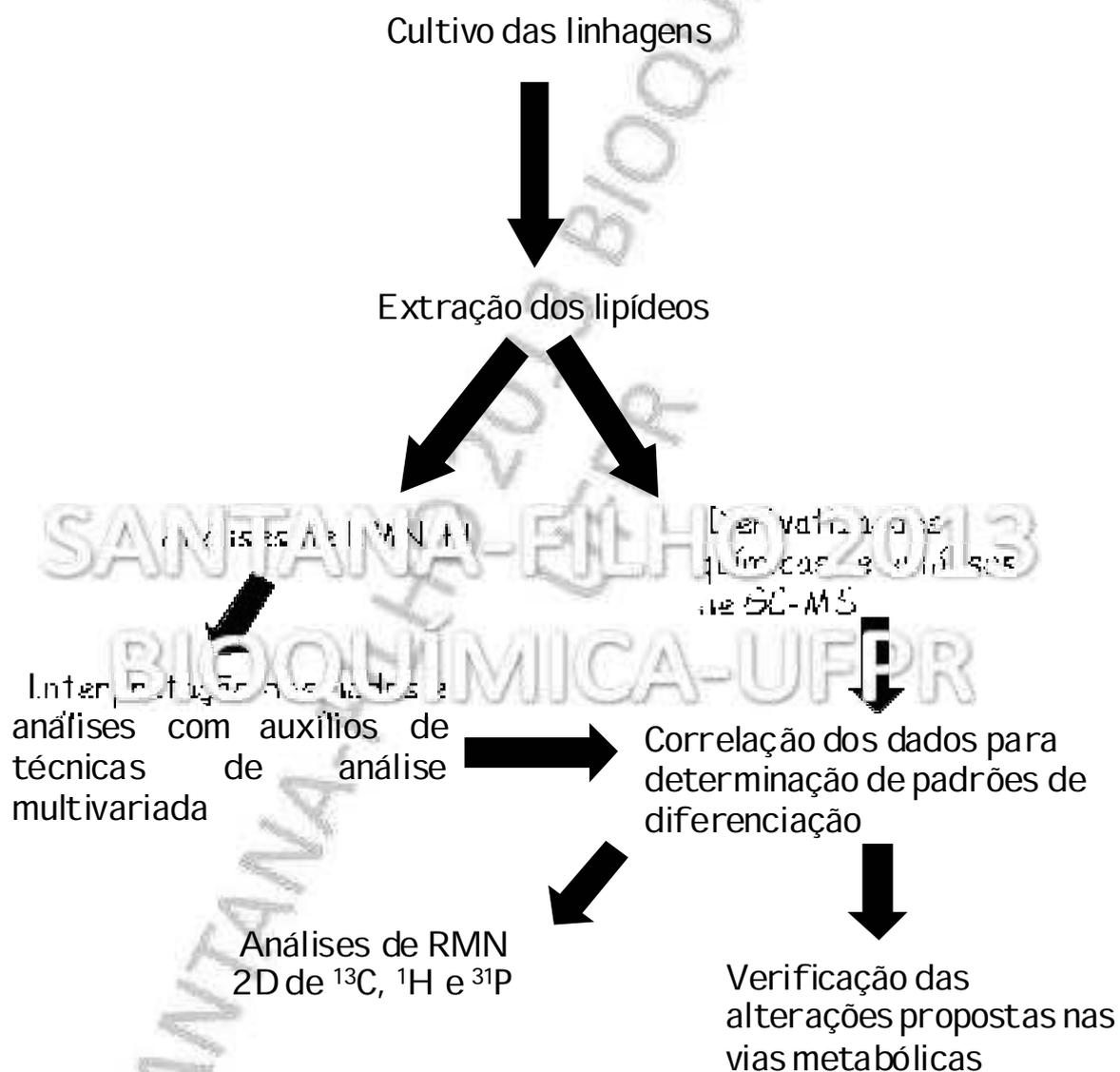


Figura 3. Estratégia de ação que foi utilizada nos experimentos.

#### 4.2. Cultivo e manutenção das linhagens de células de melanoma humano

Foram utilizadas linhagens de melanoma humano que representam diferentes fases da progressão do tumor: fase de crescimento radial (RGP), fase de crescimento vertical (VGP) e fase metastática (MET). As linhagens de melanoma humano utilizadas foram selecionadas visando a maior representatividade do estágio de desenvolvimento tumorigênico.

Na Tabela 1, são listadas as características fenotípicas que indicam indiretamente a agressividade do tumor (eficiência na formação de colônias em ágar EFC), marcadores moleculares característicos de melanomas (presença de integrina  $\alpha_v\beta_3$  e mutação no proto-oncogene *BRAF*) e informações sobre o local de isolamento e a fase de progressão da doença quando foram isoladas (MASTERS *et al.*, 2002). Estas linhagens foram gentilmente cedidas pelo Dr. Meenhard Herlyn, do Wistar Institute, Philadelphia, PA, EUA. Fotos das linhagens de melanoma humano selecionadas em diferentes confluências estão expostas na Figura 4 A-C.

As células foram cultivadas em meio Tu, que consiste em 80% de meio MCDB, 20% do meio L15 de Leibovitz, 2 mM de  $\text{CaCl}_2$  e 5  $\mu\text{g/mL}$  de insulina, suplementado com 2% de soro fetal bovino (FBS), e incubadas em estufa com atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$ , a 37°C. As culturas foram repicadas quando as células atingiam uma densidade equivalente a 80% da densidade de saturação, utilizando tripsina 0,1% em PBSA contendo 1mM de EDTA. Os estoques celulares foram mantidos no meio de cultivo contendo 10% de DMSO a -190°C, em reservatório do tipo *dewar* contendo nitrogênio líquido. Após o período de cultivo, as células foram destacadas, utilizando-se tripsina 0,1% em PBSA contendo 1 mM de EDTA, recolhidas e centrifugadas a 4000 rpm por 20 minutos, sendo ressuspensas em tampão fosfato e recentrifugadas, processo este que foi realizado 3 vezes. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e o *pellet* submetido ao processo de extração. Adicionalmente, foram realizados testes com a linhagem de melanoma humano SK-MEL-28 (gentilmente cedida pela

Profa. Ana Maria de Lauro Castrucci do Instituto de Biociências, Departamento de Fisiologia da Universidade de São Paulo (São Paulo), cultivada segundo as condições descritas para a linhagem de melanoma murino B16-F10, descritas abaixo.

Tabela 1. Características fenotípicas e genéticas das linhagens de melanoma humano utilizadas<sup>a</sup>

Linhagem	Característica				
	EFC <sup>c</sup> (%)	Integrina $\alpha_3\beta_3$	Mutação em <i>BRAF</i>	Local de isolamento	Patologia
RGP WM1552	8,32	-	V600E- <sup>e</sup>	Glúteo	Melanoma com disseminação superficial
VGP WM793	3,71- 1,71	-	V600E- <sup>e</sup>	Meterno	Melanoma com disseminação metastásica
MET 1205 Lu	25,0	+	V600E- <sup>e</sup>	WM 793- <sup>d</sup>	- <sup>f</sup>
SK - MEL28- <sup>b</sup>	- <sup>f</sup>	+	V600E- <sup>e</sup>	Pele	- <sup>f</sup>

<sup>a</sup>- Adaptado de Masters (MASTERS *et al.*, 2002); <sup>b</sup>- Adaptado de Pisano (PISANO *et al.*, 2013) <sup>c</sup>-Eficiência na formação de colônias; <sup>d</sup>- seleção de metástase em pulmão de camundongo após injeção subcutânea; <sup>e</sup>- Valina substituída por glutamato no códon 600; <sup>f</sup>- Não determinado.

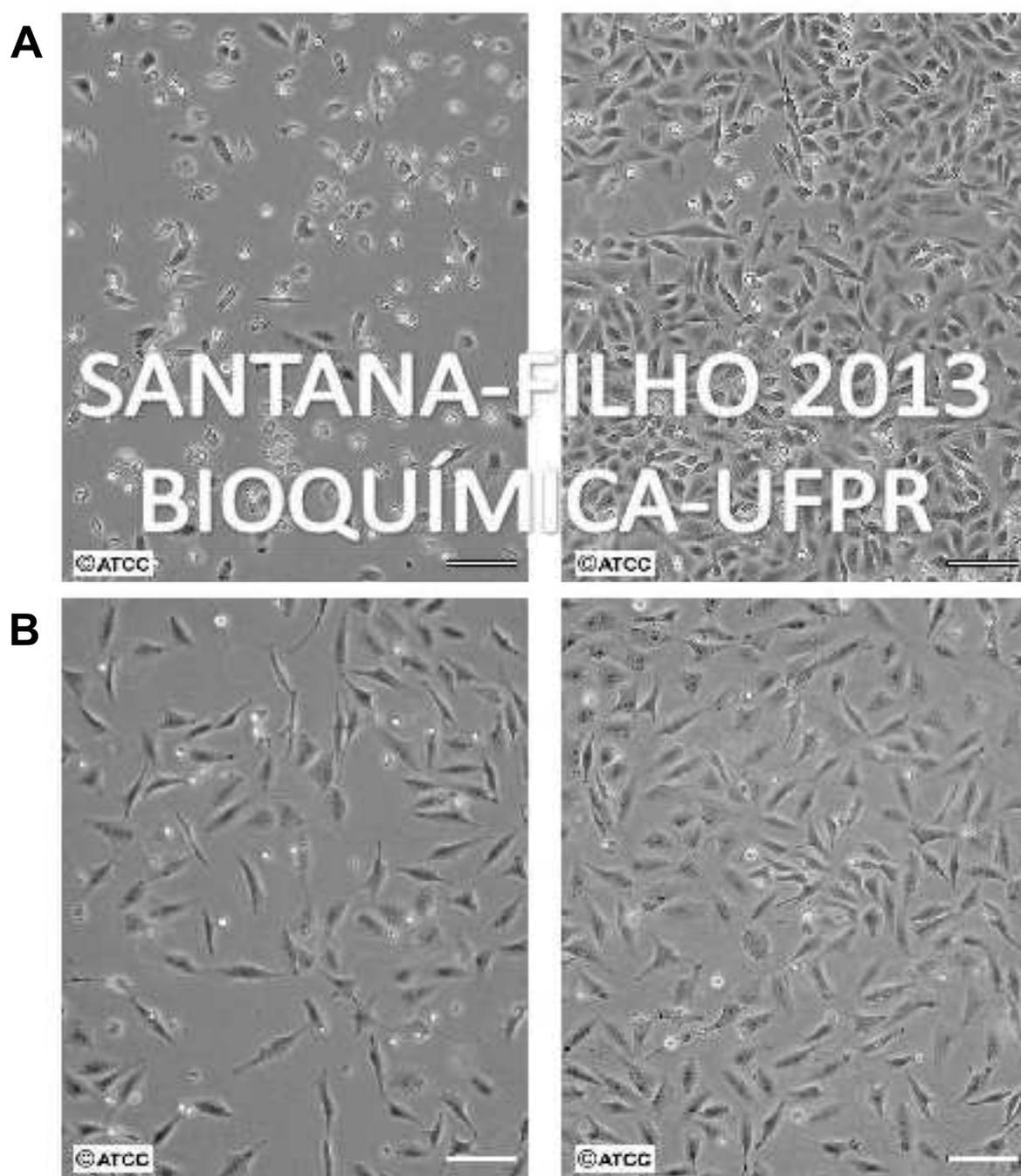


Figura 4. Microscopia das linhagens de melanoma humano WM1552 em alta e baixa densidade (A) e WM 793 em alta e baixa densidade (B). Imagens obtidas do sítio da ATCC correspondente as respectivas linhagens (ATCC, 2013). A barra de escala corresponde a 100  $\mu\text{m}$ .



Figura 4 (continuação). Microscopia da linhagem de melanoma humano 1205 Lu cultivada em alta e baixa densidade. Imagens obtidas do sítio da ATCC correspondente as respectivas linhagens (ATCC, 2013). A barra de escala corresponde a 100  $\mu\text{m}$ .

#### **4.3. Cultivo e manutenção das linhagens de células murinas de melanoma e melanócitos.**

As linhagens celulares murinas, cujas características e origem estão listadas na Tabela 2, foram gentilmente cedidas pelo Dr. Roger Chammas, Laboratório de Oncologia Experimental da Escola de Medicina da Universidade de São Paulo, SP, Brasil. Fotos das linhagens Melan-a e B16-F10 cultivadas em alta densidade estão expostas na figura 5 A e B. As linhagens foram cultivadas em meio de cultura RPMI 1640, acrescido de 7,5% de soro fetal bovino (pH 7,4) e 50  $\mu\text{g/mL}$  do antibiótico gentamicina. No caso dos melanócitos, foi adicionado também ao meio de cultura PMA (forbol-12-miristato-13-acetato, Sigma) na concentração de 200 nmol. As garrafas com as culturas de células foram mantidas em estufa com temperatura constante de 37°C, em atmosfera contendo 5% de  $\text{CO}_2$ , com umidade controlada de 95%. As culturas foram repicadas quando as células atingem uma densidade equivalente a 80% da densidade de saturação, utilizando tripsina 0,1% em PBSA contendo

1mM de EDTA. Os estoques celulares foram mantidos no meio de cultivo contendo 10% de DMSO, em reservatório do tipo *dewar* contendo nitrogênio líquido. Após o período de cultivo as células foram destacadas, utilizando-se tripsina 0,1% em PBSA contendo 1mM de EDTA, recolhidas e centrifugadas a 4000 rpm por 20 minutos, sendo ressuspensas em tampão fosfato e recentrifugadas, processo este que foi realizado três vezes. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* submetido ao processo de extração.

Tabela 2. Características fenotípicas das linhagens murinas utilizadas.

Linha	Característica			Referência
	em	Característica	Patologia	
Melan-a	Melanócito	Melanoblastos de origem embrionária	Não tumorigênica, raramente metastática	(BENNETT <i>et al.</i> , 1987)
B16-F10	Melanoma	Replicagem de metástases formadas em pulmão de camundongo após injeção subcutânea	Tumorigênica e metastática	(NAKAMURA <i>et al.</i> , 2002)

A quantidade de frascos e garrafas de cultivo utilizada foi dependente da linhagem e do experimento a ser realizado, sendo assim, para experimentos que visavam a extração lipídica das linhagens humanas (as quais atingem menor confluência que as linhagens murinas) e posterior análise de RMN, uma média de 4 garrafas de 150 cm<sup>2</sup> foi utilizada, enquanto que para as linhagens murinas 4 a 6 garrafas de 75 cm<sup>2</sup> eram suficientes, enquanto que experimentos que visavam análises gênicas utilizavam no máximo duas garrafas de 25 cm<sup>2</sup> que posteriormente eram plaqueadas em placas de 25 cm<sup>2</sup> em densidades específicas.

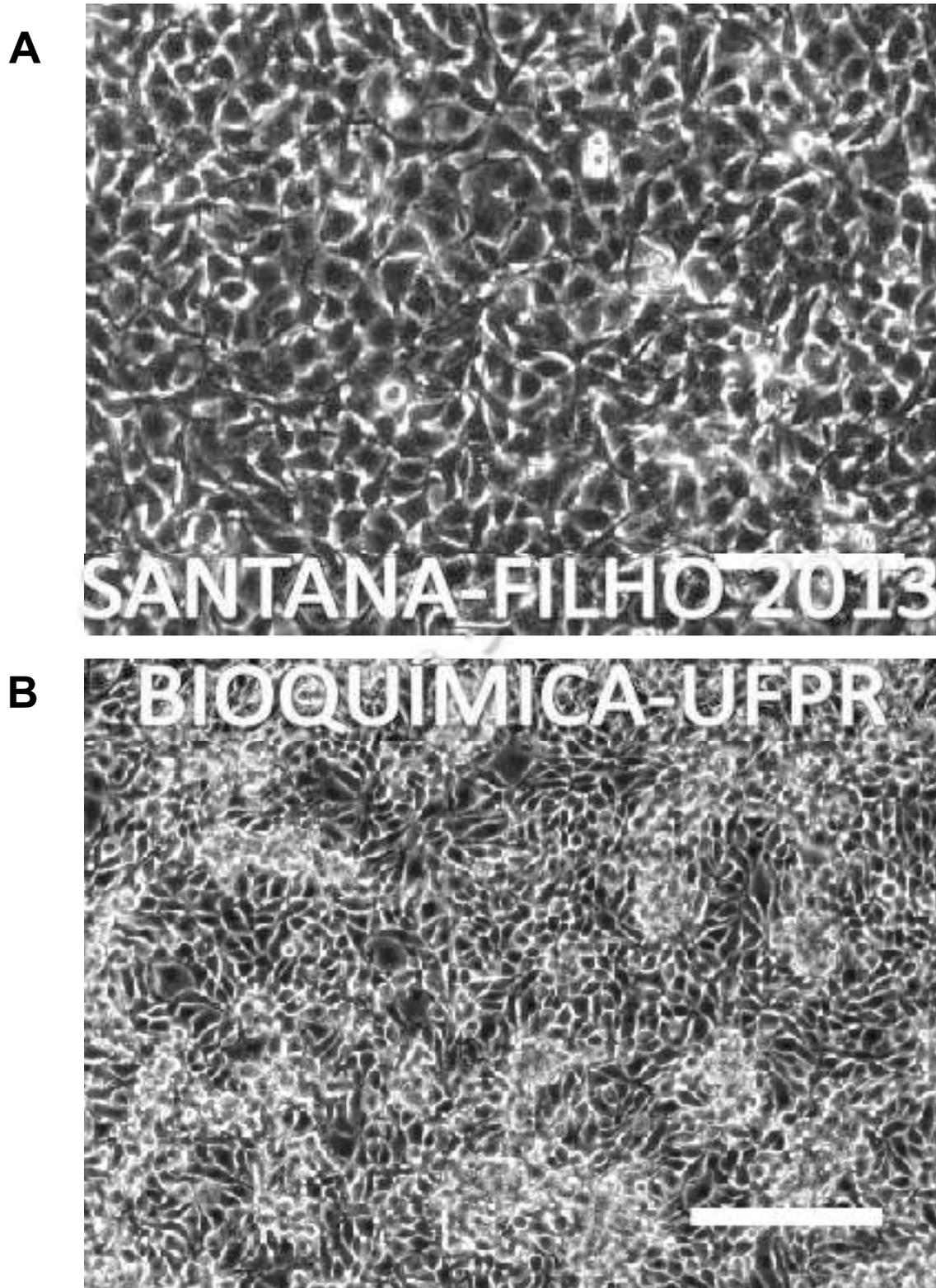


Figura 5. Microscopia das linhagens de melanócito murino Melan-a em alta densidade (A) e da linhagem de melanoma murino B16-F10 em alta densidade (B). As imagens foram obtidas em um microscópio Axiovert 40 (ZEISS), com aumento de 100  $\times$ . A barra de escala corresponde a 200  $\mu$ m.

#### 4.4. Extração dos lipídeos

Para se extrair as frações lipídicas das células as mesmas foram submetidas à lise por choque térmico, sendo submergidas em nitrogênio líquido a  $-190^{\circ}\text{C}$  por 2 minutos e retornando a temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$  pelo mesmo período. Feito isso, uma quantidade pré-determinada e igual para as linhagens foi pesada e transferida para um tubo de vidro com tampa rosqueada de teflon e volume de 4 mL. As células foram então extraídas com uma mistura de  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (1:1, v/v), a temperatura de  $100^{\circ}\text{C}$  por 2 horas (CABRINI *et al.*, 1992; FOLCH, LEES e SLOANE STANLEY, 1957; LIN *et al.*, 2004). O extrato lipídico foi centrifugado e o solvente orgânico contido no sobrenadante recolhido, e com este extrato foram realizadas as derivatizações químicas, cromatografias e análises espectroscópicas e espectrométricas.

#### 4.5. Extração pelo método de Folch

Alternativamente, algumas das amostras foram submetidas à extração lipídica pelo método de Folch (FOLCH *et al.*, 1957), visando a extração de possíveis glicolipídeos presentes nas linhagens celulares. Após 4 extrações sucessivas, o solvente foi evaporado sob fluxo de nitrogênio e o resíduo submetido à partição utilizando uma mistura de clorofórmio, metanol e uma solução aquosa de KCl na concentração de 0,75%, sendo que a fase inferior da partição foi coletada e evaporada sob fluxo de nitrogênio. Com este resíduo foram realizadas as análises de TLC visando a identificação de fosfolipídeos e glicolipídeos.

#### 4.6. Cromatografia em camada delgada

Estas análises foram realizadas em placas de sílica-gel 60G (Merck), com 8 cm de altura total (7 cm a partir da origem). As análises foram desenvolvidas com diversos sistemas de solventes, notadamente:  $\text{CHCl}_3$ -MeOH- $\text{H}_2\text{O}$  (65:25:4, v/v),  $\text{CHCl}_3$ -MeOH (80:20 v/v), e

CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O (80:20:3, v/v). A visualização dos compostos foi realizada com diferentes reagentes, de acordo com o tipo de grupamento químico analisado: carboidratos - orcinol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 100°C (SKIPSKI, 1975; SKIPSKI, SMOLOWE e BARCLAY, 1967); compostos contendo fosfatos - solução de molibdênio a temperatura ambiente (DITTMER e LESTER, 1964).

#### 4.7. Derivatizações.

##### 4.7.1. Derivatização para análise em GC-MS

**Metanólise** - Amostras (aproximadamente 0,5 mg) foram dissolvidas em MeOH-HCl 1N (900 µL) e mantidas a 100°C por 2 h. Feito isso, as amostras foram evaporadas sob fluxo de N<sub>2</sub>. Alternativamente as amostras foram submetidas a uma partição utilizando 1 mL de hexano com adição de água destilada (0,5 mL) para facilitar a separação das fases. A fase apolar (hexano) foi coletada e a fase polar, contendo metanol e água, evaporada sob fluxo de N<sub>2</sub>.

**Hidrólise** - Para eliminação dos grupos metil que foram adicionados aos grupamentos carbonila presentes na fração MeOH:H<sub>2</sub>O após a metanólise, as amostras foram dissolvidas em ácido trifluoroacético (TFA) 1 M (1 mL), utilizando frascos de 4 mL com tampa rosqueável de teflon. A hidrólise foi realizada à 100°C por 10 h e posteriormente as amostras foram evaporadas sob fluxo de N<sub>2</sub>.

**Redução** - As amostras hidrolisadas foram solubilizadas em 300 µL de H<sub>2</sub>O deionizada, e 1 mg de NaBH<sub>4</sub> foi adicionado. As amostras foram mantidas à temperatura ambiente (~25°C) por 4 h, após isso, as amostras foram submetidas à evaporação sob fluxo de N<sub>2</sub> e o excesso de NaBH<sub>4</sub> foi eliminado pela adição de TFA (100 µL), o qual foi então removido pela adição de

metanol e evaporação sob fluxo de  $N_2$ . Em seguida, 1 mL de MeOH foi adicionado e novamente evaporado em fluxo de  $N_2$ . Este processo foi repetido por 3 vezes para remoção do borato residual (SASSAKI *et al.*, 2008a).

**Acetilação** - As amostras provenientes do processo de metanólise/hidrólise/redução foram resuspendidas em 200  $\mu$ L de piridina-anidrido acético (1:1, v/v), e aquecidas por 2 h a 100°C. Os derivados acetilados foram submetidos à extração utilizando  $CHCl_3$  (200  $\mu$ L) e os reagentes removidos por sucessivas lavagens com solução de  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  (5%, v/v). Ao final,  $Na_2SO_4$  anidro foi adicionado para remoção da água residual. Após filtragem, as amostras foram transferidas para frascos limpos, e evaporadas em temperatura ambiente (SASSAKI *et al.*, 2008a).

#### 4.7.2. Derivatizações utilizando reagentes deuterados

Neste experimento, alíquotas de 100  $\mu$ L dos extratos lipídicos obtidos das linhagens foram dissolvidas em 1 ml de  $CHCl_3$ -MeOH (1:1, v/v) e evaporadas sob um fluxo de  $N_2$ . Feito isso foram testadas várias condições da reação de metanólise para se determinar a razão metanol:cloro de acetila (AcCl) (9:1) que favorecesse a conversão completa dos ácidos graxos em derivados metil éster ou metil- $d_3$  éster. As misturas foram agitadas durante 2 minutos e aquecidas a 100°C durante intervalos de tempo diferentes (o melhor tempo de incubação da reação foi de 4 h). Os derivados ácidos graxos metil éster resultantes foram extraídos por partição entre hexano (1 mL) e água destilada (0,5 mL). A fase superior (orgânica) foi recolhida e evaporada sob fluxo de  $N_2$ . Foram realizadas esterificações com os reagentes AcCl- $CD_3OD$  ou AcCl- $CH_3OH$ , resultando em derivados ácidos graxos metil éster deuterados e não-deuterados.

#### 4.8. Análises por GC-MS

A análise por GC-MS foi realizada utilizando dois cromatógrafos a gás Varian: 3800 acoplado um detector de MS 4000, ou Saturn 2000R, ambos com detector de massas do tipo *ion trap*. Estes equipamentos são equipados com uma coluna capilar de baixo sangramento/MS (DB-1 ou DB-225, respectivamente) com dimensões de 30 m × 0,25 mm de diâmetro interno (ambos adquiridas da empresa Agilent/Varian, Santa Clara, CA, EUA). A detecção por massas foi realizada através de ionização eletrônica (70 eV). A temperatura do injetor foi mantida em 250°C e do *trap* em 200°C. Hélio 5.0 analítico foi utilizado como gás de arraste, a um fluxo de 1 mL/min. As análises foram realizadas, com duas programações, de acordo com cada tipo de equipamento e composto a ser analisado:

##### **No cromatógrafo equipado com a coluna DB-225-MS**

- Análise de compostos polares: temperatura de 50°C a 220°C a 40°C por min, mantida por 25 min.
- Análise de derivados de ácidos graxos metil éster e outros componentes lipídicos passíveis de volatilização temperatura de 50°C a 210°C a 40°C por min, mantida por 35 min (SASSAKI *et al.*, 2008b).

##### **No cromatógrafo equipado com a coluna DB-1**

- Inicial a 50°C, mantido por 2 min, aquecido a 90°C (20°C por min, mantida durante 1 min) e em seguida a 280°C (5°C por min, mantida durante 2 min). Utilizada para análise de todos os derivados.

Espectros de ionização eletrônica (EI) foram obtidos a 70 eV e 200°C. O volume de injeção foi de 1 uL, com uma razão de *split* de 1:10. A análise dos dados foi realizada utilizando-se o *software* Saturn 5.1 (SASSAKI *et al.*, 2008b).

#### 4.9. Análise por espectroscopia de ressonância magnética nuclear

Espectros de 1D e 2D de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e  $^{31}\text{P}$  foram obtidos em um espectrômetro de RMN Bruker *Avance III* 400, operando a 9,06 Tesla (400 MHz para  $^1\text{H}$ ), equipado com uma sonda trinuclear de observação inversa de 5 mm e gradiente de campo no eixo z. Antes das análises, as amostras foram submetidas à troca de H por D, por sucessivas solubilizações e evaporações em solventes deuterados. Em seguida foram solubilizadas em 500  $\mu\text{L}$  de uma solução de  $\text{CDCl}_3:\text{CD}_3\text{OD}$  (1:1, v/v) e centrifugadas. Destes, 400  $\mu\text{L}$  foram transferidos para tubos de RMN de 5 mm para aquisição dos experimentos de RMN. Os deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foram referenciados em relação ao sinal do TMS em 0,00 ppm, enquanto que os espectros de  $^{31}\text{P}$  relativos à solução aquosa (85%, v/v) de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  em 0,00 ppm. Os experimentos foram realizados sem a rotação do tubo, com o sinal de TMS a uma largura média variando de 0,8-1,0 Hz. Experimentos de RMN 2D foram realizadas usando as seguintes sequências de pulsos: HSQC editado (*heteronuclear correlation via double inept transfer*) com desacoplamento durante a aquisição, com edição de multiplicidade durante a etapa de seleção (hsqcedetgp), COSY, correlação homonuclear com pré-saturação durante o atraso de relaxamento utilizando gradiente de pulsos de seleção (cosygpprqf); TOCSY, correlação homonuclear total através de transferência Hartman-Hahn usando a sequência MLEV17 com um tempo de mistura de 0,06 s (mlevphpr.2); e HMBC, correlação heteronuclear via zero e dupla coerência quântica otimizada para acoplamentos de longo alcance (hmbcgpndqf). Os experimentos de RMN 2D foram adquiridos com detecção de quadratura na dimensão indireta, sendo que os experimentos de HSQC editado foram adquiridos com 128 scans por série de 1 K x 256 pontos e processados (4 K) antes da transformada de Fourier (SASSAKI *et al.*, 2011).

#### 4.10. Redução dos dados e pca

Após a correção da fase e linha de base, cada espectro foi reduzido a 361 (linhagens humanas) ou 242 (linhagens murinas) regiões de igual largura (0,01 ppm) usando o *software* AMIX (análise de misturas), versão 3.8 (Bruker BioSpin). A janela de  $^1\text{H}$  utilizada foi de 0,50 a 5,50 ppm. A região espectral próxima a ressonância da água residual (DOH -  $\delta$  4,70-5,00) e do metanol ( $\text{CHD}_2\text{OD}$  -  $\delta$  3,32-3,36), foram removidas de todos os conjuntos de dados antes de normalização e análise multivariada, a fim de eliminar variações derivadas de possíveis irregularidades da supressão da água ou heterogeneidades do sinal do solvente. Após uma análise de componentes principais (PCA) preliminar, as regiões correspondentes às ressonâncias dos grupos  $(\text{CH}_2)_n$  ( $\delta$  1,22-1,40) e  $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$  ( $\delta$  3,18-3,25) também foram removidas dos conjuntos de dados, principalmente porque pequenas deformações dos sinais nesta região interferiram significativamente na análise de PCA, devido à elevada intensidade dos sinais nesta região. Todas as regiões dentro da janela especificada remanescentes dos espectros foram analisadas sem escalonamento prévio, a fim de preservar as diferenças naturais na intensidade dos conjuntos de dados.

Esta metodologia permite a redução da dimensionalidade dos conjuntos de dados (neste caso deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$ ), por meio da construção de novos eixos de comparação dos valores entre as amostras. O primeiro componente principal (PC) consiste de uma combinação linear dos valores providos ao programa e descreve a maior quantidade de variação existente entre os conjuntos de dados. O restante dos componentes principais são construídos ortogonalmente um ao outro, e descrevem cada um o restante de variação existente. A diferenciação dos conjuntos de dados é visualizada pela distância entre eles fornecida pelo *scores plot*, onde o primeiro componente principal (PC1) apresenta-se na horizontal e o segundo componente principal (PC2) encontra-se no eixo vertical. O *loadings plot*, por sua vez revela as regiões do espectro que contribuem para o posicionamento das

amostras dentro dos grupos formados no *scores plot*, fornecendo *clusters* onde os pontos mais distantes do centro são os que mais influenciam na discriminação dos conjuntos dos dados. O *Loadings 1D plot*, por sua vez, apresenta os mesmos dados do *Loadings plot*, mas em forma de um pseudo-espectro de RMN formado pelos *buckets*, ou seja, pelas regiões do espectro com deslocamentos químicos que mais influenciaram na discriminação, permitindo identificar as variáveis que mais influenciam na separação dos conjuntos de dados. Para melhor visualização da contribuição dos deslocamentos químicos na discriminação entre os grupos presentes no *scores plot* a área de cada sinal correspondente a determinados compostos no *loadings 1D plot* foi integrada e feito isso foram atribuídos legendas variando de +++++ para os sinais que mais contribuíram até + para os que menos contribuíram.

#### 4.11. Ensaio de expressão de gênica

Os níveis de expressão de mRNA codificando para GAMT (guanidinoacetato-metiltransferase - CE 2.1.1.2) foram quantificados nas linhagens Melan-a e B16-F10. Para isso, cDNA foi sintetizado utilizando o Kit de Transcrição Reversa ImProm II (Promega), a partir de 1 µg de RNA total, de acordo com as instruções do fabricante. As reações de qRT-PCR foram realizadas em um termociclador StepOne Plus (Applied Biosystems), utilizando SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) e *primers* específicos para os genes de interesse. As reações seguiram as curvas de temperatura padrão do equipamento (15 s a 95°C e 1 min a 60°C durante 40 ciclos). A eficiência de amplificação e normalização dos dados foram realizadas conforme descrito anteriormente (PFAFFL, 2001), usando ACTB como gene de referência. Um ciclo de dissociação foi realizado após cada ensaio para verificar ocasionais amplificações não específicas ou contaminações. As sequências dos *primers* utilizados foram  
GAMT:        *Sense*:        5'-ATGTTTGAGGAGACGCAGG-3';        *Antisense*:        5'-

AAGGCATAGTAGCGGCAGT-3'; ACTB *Sense*: 5'-AAGATCAAGATCATTGCTCCTCC-3'; *Antisense*: 5'-CGTACTCCTGCTTGCTGATC-3'.

SANTANA-FILHO 2013 BIOQUÍMICA-  
UFPR

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Cultivo e análise das linhagens de melanoma humano.

As linhagens de células de melanoma humano WM 1552 (RGP), WM 793 (VGP), e 1205 Lu (MET) foram cultivadas até atingirem uma alta confluência (aproximadamente 80%) de acordo com a Tabela 3. Inicialmente as células foram cultivadas em 2 confluências, com o objetivo de se obter o extrato lipídico em cada uma delas.

Tabela 3. Características das células das linhagens de melanoma humano em alta confluência (80-100%) e média confluência (40-60%).

Linhagem	Características do cultivo			
	Confluência	Concentração (células/mL)	Quantidade (Quantidade)	Peso (mg)
WM1552	Média	$1,68 \times 10^6$	$1,19 \times 10^7$	1,4
WM793	Média	$1,91 \times 10^6$	$1,41 \times 10^7$	1,5
1205 Lu	Média	$0,79 \times 10^6$	$0,9 \times 10^7$	4,6
WM1552	Alta	$2,92 \times 10^6$	$3,5 \times 10^7$	14,1
WM793	Alta	$2,04 \times 10^6$	$2,6 \times 10^7$	10,1
1205 Lu	Alta	$1,55 \times 10^6$	$2,4 \times 10^7$	13,9

Foi observado que a linhagem WM 793 apresentou uma menor quantidade de células em relação às outras linhagens, em ambas as confluências testadas, enquanto que as linhagens WM 1552 e 1205 Lu apresentaram um comportamento inverso, apresentando um maior número de células.

Os experimentos com as linhagens cultivadas em confluência média foram descartados, pois a quantidade de matriz (peso seco do *pellet* liofilizado) proveniente das células não forneceu uma quantidade de lipídeos após a extração que permitisse a aplicação das técnicas de análise. Isto não foi considerado um obstáculo, uma vez que alguns autores

(CANSELL *et al.*, 1997) relatam que não são encontradas diferenças na composição lipídica de linhagens de melanomas confluentes e subconfluentes.

### 5.1.1. Cromatografia em camada delgada

Após a lise das células, o material liofilizado foi submetido à extração conforme descrito nos materiais e métodos. Com o extrato lipídico das linhagens, foram realizadas análises por cromatografia em camada delgada para detectar a presença de fosfolípidos e glicosídeos. Após o desenvolvimento da corrida cromatográfica as placas foram submetidas à revelação, por meio de reagentes específicos para compostos fosfatados e glicosídeos. A presença de compostos fosforilados pertencentes a classe dos fosfolípidos foi confirmada nos extratos das células, porém, devido à baixa quantidade de material presente nos extratos, apenas as bandas com as maiores concentrações de compostos foram visualizadas após a revelação, sendo assim a linhagem 1205 Lu foi selecionada para ser cultivada em maior escala (devido à sua maior taxa de proliferação, facilitando, assim, a obtenção de maiores quantidades de células em menor tempo) e com o extrato lipídico obtido da partição de Folch foram testados diversos sistemas de solventes para o desenvolvimento das corridas cromatográficas, como visualizado na Figura 6 A-D. A identificação dos fosfolípidos foi realizada por meio da comparação de padrões de fosfolípidos: fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS), fosfatidilglicerol e uma mistura de fosfolípidos obtida a partir de extração de gema de ovo (PL). Revelando as placas com o reagente de Dittmer e Lester (DITTMER e LESTER, 1964), o qual é específico para fosfolípidos, foram observadas todas as classes e mais alguns *spots* que provavelmente correspondem as formas monoesterificadas de alguns dos fosfolípidos, o que comprovou que a metodologia empregada nas extrações foi eficaz. Porém, mesmo utilizando diferentes sistemas de solventes para o desenvolvimento das placas, não foi obtida uma separação



Figura 6. Cromatografias desenvolvidas com diferentes sistemas de solventes, notadamente clorofórmio:metanol:água nas proporções 80:20:3 (A e B), 80:20:0 (C) e 65:25:4 (D). A ordem de aplicação dos spots, da esquerda para a direita, foi: PC, PE, amostra (extrato lipídico da linhagem 1205 Lu), padrão de PL extraídos de ovo, PG e PS. Para visualização, as placas foram borrifadas com o reagente de Dittmer e Lester, específico para a revelação de fosfolípeos.

satisfatória. Outro fator foi que mesmo utilizando uma maior concentração maior de amostras dos extratos lipídicos (tanto proveniente da extração com clorofórmio metanol como da extração de folch), quando as placas foram reveladas com o reagente específico para carboidratos (orcinol), nenhum dos *spots* coincidiu com o  $R_f$  das amostras que correspondiam aos fosfolípeos, de fato nenhuma molécula glicídica foi detectada no extrato lipídico analisado, nem mesmo quando se tentou revelar com orcinol o *upper phase* proveniente da extração de Folch, o que desencorajou a continuidade dos estudos com TLC visando caracterizar o perfil lipídico/glicídico das amostras, o que não prejudicou a continuidade do projeto, pois o escopo desta tese originalmente priorizava a utilização de outras técnicas.

### 5.1.2. Derivatização e análise por GC-MS

Os extratos lipídicos foram submetidos à processos de derivatização para posterior análise por GC-MS. Inicialmente, foi realizada uma metanólise com o extrato lipídico das 3

linhagens (RGP, VGP e MET), conforme descrito nos materiais e métodos. O material metanolizado foi submetido ao processo de acetilação e analisado por GC-MS. Os resultados, porém, não foram satisfatórios, pois, embora tenham sido detectados vários ácidos graxos e polióis, diversos compostos identificados como pertencentes a classe dos monossacarídeos apresentaram uma multiplicidade de picos, devido a ocorrência de isômeros resultantes da não redução do carbono anomérico presente nestes compostos. Com base nestes resultados, utilizou-se outra estratégia: para melhor definição tanto dos componentes lipídicos como dos componentes não lipídicos, as amostras foram submetidas à metanólise e imediatamente após a reação foi realizada uma partição utilizando hexano, visando solubilizar neste os componentes lipídicos da amostra com o mínimo de perda possível, esta fração hexânica foi, então, submetida à análise por GC-MS, enquanto que a fração MeOH:H<sub>2</sub>O foi submetida a evaporação sob fluxo de N<sub>2</sub>, hidrolisada, reduzida, acetilada e submetida à análise por GC-MS. Os resultados estão expostos na Figura 7 e na Tabela 4, onde se pode verificar que os ácidos graxos presentes em maior proporção foram o ácido oleico (C18:1) e ácido palmítico (C16). O ácido palmitoleico (C16:1) apresentou proporções diferentes entre as linhagens, passando de 4,0% na linhagem RGP para 9,7% na linhagem VGP e 8,8% na linhagem MET.

Este resultado está de acordo com os apresentados por Schroeder e Gardner (SCHROEDER e GARDINER, 1984b), que cultivaram duas linhagens de células de melanoma murino (B16-F1, de baixo potencial metastático e B16-F10, de alto potencial metastático) e encontraram valores de 6,6 e 8,6% de ácido palmitoleico para as linhagens B16-F1 e B16-F10, respectivamente. Outro dado interessante revelado pelos experimentos foi que enquanto a proporção de ácido esteárico (C18) diminui, ocorreu um acréscimo da proporção de alguns ácidos graxos poli-insaturados (C18:2, C18:3 e C20:4) com o aumento do potencial carcinogênico das linhagens. Cansell *et al.* (CANSELL *et al.*, 1997), relatam que

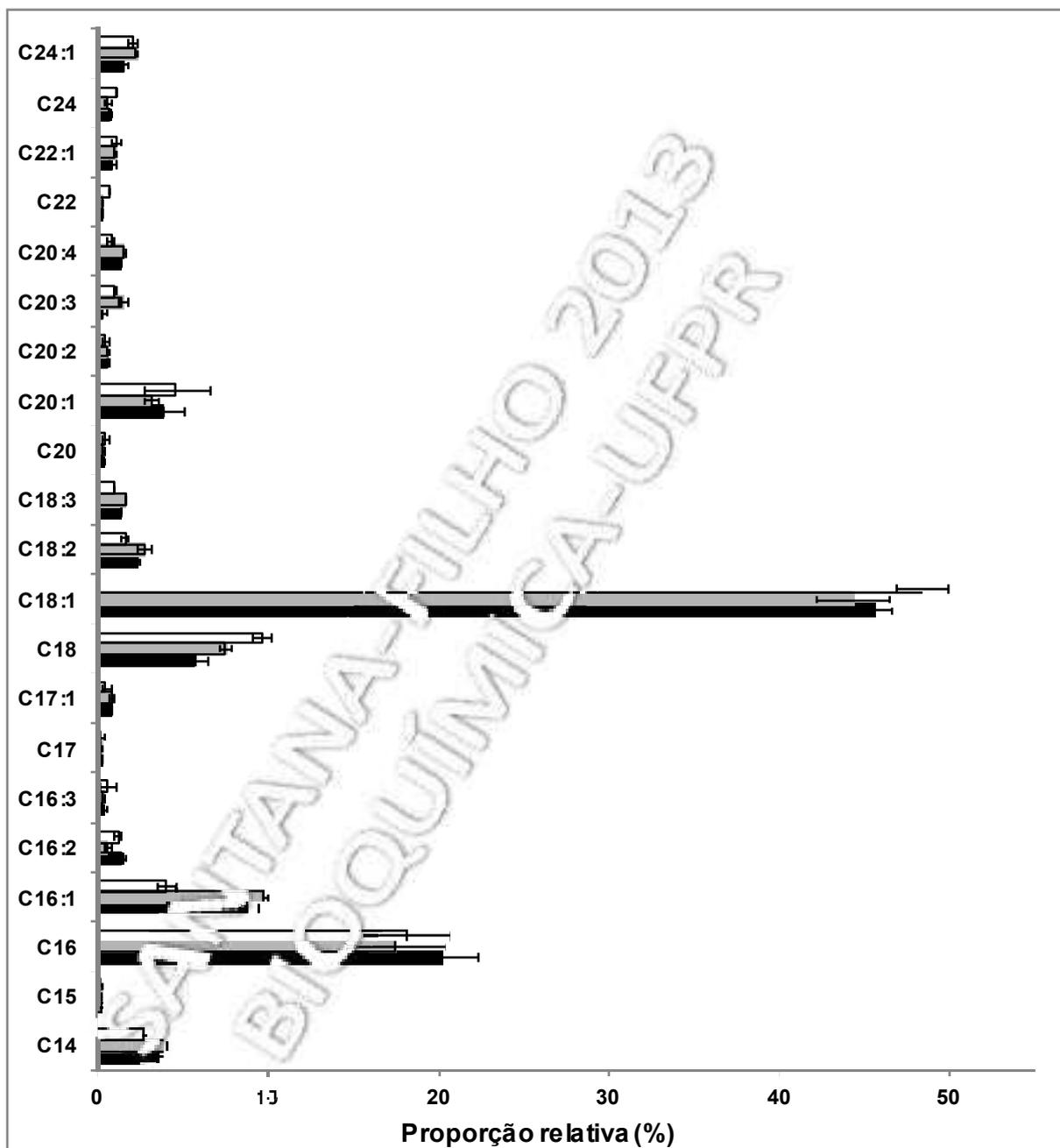


Figura 7. Composição de ácidos graxos presentes na fração apolar (hexano) após metanólise dos extratos lipídicos obtido das linhagens de melanoma humano RGP (barras brancas), VGP (barras cinzas) e MET (barras negras).

os ácidos graxos oleico (C18:1), palmítico (C16) e esteárico (C18) são os componentes principais presentes nas membranas de células endoteliais humanas cultivadas *in vitro*.

Em um estudo com tecidos e tumores hepáticos (KUDO *et al.*, 2011), os ácidos graxos C16 e C18 e seus análogos monoinsaturados são os presentes em maior quantidade nos extratos lipídicos e, em sintonia com os dados da Figura 7, os ácidos graxos C16 e C18:1 apresentaram uma maior proporção nos tumores em relação ao tecido normal.

Em relação aos compostos polares, pode-se verificar que apenas 3 monossacarídeos foram identificados nos extratos lipídicos, uma pentose (ribose) e duas hexoses (galactose e glucose). Além disso, foram observados dois polióis, glicerol e inositol. Este último apresentou um comportamento inteiramente diferenciado entre as diferentes linhagens, pois teve a sua quantidade relativa alterada em mais de 80 vezes quando se compara os resultados obtidos da linhagem RGP com a linhagem MET (Tabela 4).

Para melhor quantificar essa alteração, foi preparada uma curva padrão utilizando concentrações de padrão de mio-inositol que variaram de 10 a 100 µg. Essas soluções foram acetiladas e injetadas no CG-MS, e a área dos picos gerados em cada corrida cromatográfica foi integrada, possibilitando a construção da curva padrão exibida na Figura 8. Com o auxílio desta curva foi possível calcular a quantidade de inositol presente nas amostras, que variou de 0,1 µg para a linhagem RGP, 14,1 µg para a linhagem VGP e 138,4 µg para a linhagem MET. Comparando estes valores com o peso do extrato lipídico obtido para cada uma das linhagens (aproximadamente 2,0 mg), percebe-se que na linhagem MET o inositol representa aproximadamente 7% do peso total do extrato.

Foi realizada uma análise por GC-MS do extrato lipídico obtido da linhagem 1205 Lu, após este passar por acetilação sem uma etapa de hidrólise prévia, e apenas uma quantidade residual de inositol foi detectada. Embora o inositol seja um composto polar, como apenas o extrato lipídico foi analisado, a explicação mais sensata é presumir que este inositol seja parte de um conjugado lipídico.

Tabela 4. Quantificação dos metabólitos presentes na fase MeOH:H<sub>2</sub>O após metanólise, partição, hidrólise, redução e acetilação dos extratos lipídicos obtidos das linhagens de melanoma humano RGP, VGP e MET.

Metabólito	Linhagem (proporção relativa %)		
	WM 1552 (RGP)	WM 793 (VGP)	1205 L <sup>+</sup> (MET)
glicose	2,11	3,49	7,71
inositol	0,88	15,51	18,43
ribose	14,02	10,33	6,16
galactose	0,1	0,50	0,50
glucose	0,1	0,9	0,71
polióis	79,28	61,01	86,16
monossacarídeos	20,87	36,15	12,35

O inositol está presente em algumas classes de fosfolídeos, os quais estão distribuídos nas membranas plasmáticas de diversos organismos do domínio *archaea* e em todos os eucariotos, bem como em algumas poucas bactérias (MICHELL, 2008). As moléculas que contêm inositol incluem archaetidilinositol, gentobiosylcalda-archaetidilinositol (*archaea*), ceramida-fosforil-1-inositol (fungos e algumas plantas) e fosfatidilinositol, com seus derivados fosforilados nas hidroxilas 3, 4 e 5. A maioria dos fosfatidilinositóis e outros glicerofosfoinositídeos presentes nas membranas celulares de mamíferos são esterificados pelo ácido esteárico e pelo ácido araquidônico, mas ácidos graxos com cadeia mais curta também podem ocorrer em outros organismos (MICHELL, 2008). Na literatura, Trulla *et al.* (LLIGONA TRULLA *et al.*, 1992b) foram os únicos pesquisadores a sugerirem uma correlação entre o potencial metastático e a quantidade de fosfoinositídeos. Neste estudo, três linhagens de células de melanoma murino foram utilizadas (B16-F1, B16-F10 e BL-6), com diferentes potenciais metastáticos, e as células foram estudadas em diferentes confluências (subconfluentes e confluentes). Após a extração dos lípidos, as amostras foram submetidas a uma separação por cromatografia em camada delgada preparativa e, após raspagem das bandas, o teor de fosfato inorgânico de cada fração foi mensurado. Foi verificado que a quantidade total de fosfolídeos diminuiu com o aumento

da densidade celular em todas as linhagens, enquanto que a quantidade de fosfatidilinositol, embora tenha diminuído com o aumento da confluência na linhagem B16-F1 (menos agressiva), se comportou de maneira inversa nas outras duas linhagens (B16-F10 e BL6, mais agressivas), aumentando a sua quantidade em mais de três vezes. No presente trabalho, um comportamento semelhante foi observado, com um aumento progressivo da quantidade de inositol de acordo com o aumento do potencial carcinogênico das linhagens. Além disso, observando os dados da Figura 7 e da Tabela 4 conjuntamente, pode-se verificar que, ao mesmo tempo em que ocorre um aumento substancial da quantidade de inositol entre as linhagens RGP, VGP e MET, ocorre também um aumento (porém, menos expressivo) da proporção do ácido graxo C20:4 (ácido araquidônico) que, como citado anteriormente, é um dos ácidos graxos que estão preferencialmente unidos por ligação éster ao fosfatidilinositol. O mesmo não ocorre com o ácido esteárico (C18), que diminui a proporção de acordo com o aumento do potencial carcinogênico das linhagens.

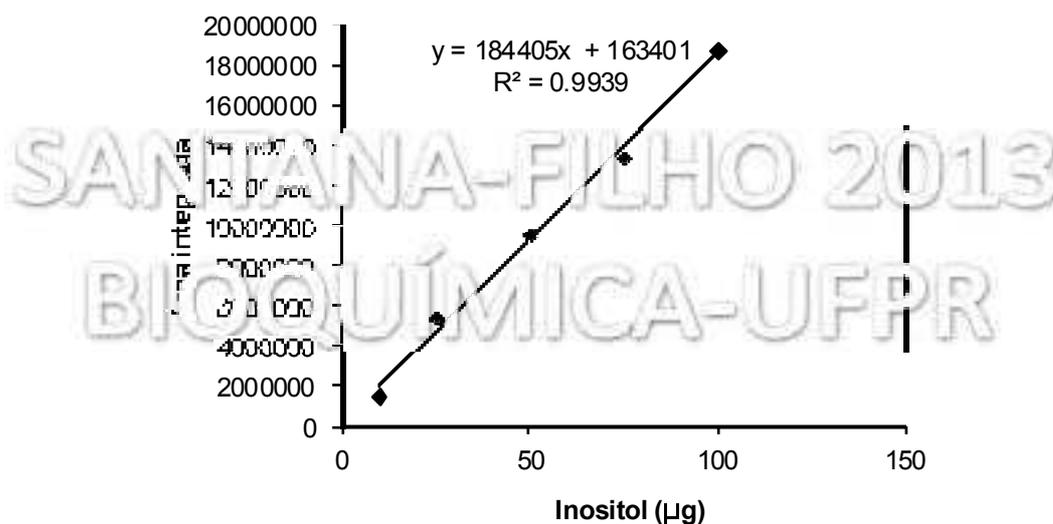


Figura 8. Curva padrão de mio-inositol.

### 5.1.3. Análises de RMN

As linhagens de melanoma humano foram submetidas a análises de ressonância magnética nuclear 1D e 2D, visando confirmar os resultados obtidos pelas análises de GC-MS, onde foi verificado um aumento gradual da proporção de inositol entre as linhagens RGP, VGP e MET. Para estes experimentos, foi estabelecida a mesma quantidade de extrato lipídico para as 3 linhagens e as amostras foram então dissolvidas em 500  $\mu\text{L}$  de  $\text{CDCl}_3:\text{CD}_3\text{OD}$  (1:1). Os resultados dos experimentos de RMN de  $^1\text{H}$  com supressão do sinal da água para as 3 linhagens estão expostos na Figura 9. Os espectros de  $^1\text{H}$  demonstraram uma similaridade muito grande entre si, e foram assinalados de acordo com dados disponíveis na literatura (ADOSRAKU *et al.*, 1994; BECKONERT *et al.*, 2010; CASU *et al.*, 1991; CHOI *et al.*, 1993; COEN *et al.*, 2003; WILLKER e LEIBFRITZ, 1998). As classes lipídicas e metabólitos identificados em cada linhagem e seus respectivos deslocamentos químicos estão expostos na Tabela 5. Devido a grande similaridade dos espectros de  $^1\text{H}$ , os dados obtidos foram submetidos à análise de componentes principais (PCA - *Principal Component Analysis*).

Como pode ser visto na Figura 10 (A-C), a linhagem RGP se diferenciou bastante das linhagens VGP e MET considerando o primeiro componente principal (PC), que explicou 92% da variância, sendo que mesmo sendo bastante semelhantes, as linhagens VGP e MET foram diferenciadas pelo segundo PC (que explicou 96% da variância acumulada). Como pode ser observado na Figura 10B (*loadings plot*), os principais sinais que contribuíram para a separação das três linhagens foram os referentes aos deslocamentos R- $\text{CH}_3$  da região terminal de colesteróis e ácidos graxos (0,890 ppm), região de deslocamento de ácidos graxos monoinsaturados (2,030 ppm), e um sinal atribuído à região de deslocamento químico de inositóis fosforilados (3,64 - 3,67 ppm).

Tabela 5. Metabólitos e correspondentes deslocamentos químicos assinalados nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  obtidos a partir dos extratos lipídicos das linhagens de melanoma humano RGP VGP e MET. Os sinais positivo (+) e negativo (-) correspondem à presença dos compostos nas amostras. A confirmação do assinalamento foi realizada pela análise dos espectros de HSQC-ed das 3 linhagens.

Metabólito/ Classe lipídica	$\delta$ (ppm) $^1\text{H}$	RGP	VGP	MET
Chol-C <sub>18</sub>	0,700	+	+	+
R-CH <sub>3</sub>	0,840-0,910	+	+	+
Chol-C <sub>21</sub>	0,925	+	+	+
CH=CH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	0,976	-	-	-
Chol-C <sub>19</sub>	1,017	+	+	+
Chol	1,050-1,140	-	-	-
RCO <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	1,180	-	-	-
(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub>	1,200-1,409	-	+	-
F <sub>2</sub> :R-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CO	1,555-1,667	+	+	+
F <sub>2</sub> :CH=CH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CO	1,668-1,704	+	+	+
Chol	1,765-1,890	-	-	-
Chol	1,920-1,970	-	-	-
CH=CH-CH <sub>2</sub> -CH-CH- (18:1)	2,010-2,110	+	+	+
CH=CH-CH <sub>2</sub> -CH=CH- (18:2;20:4)	2,110	-	+	+
CH=CH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CO (20:4)	2,010-2,110	-	-	-
Chol	2,110-2,280	+	+	+
F <sub>2</sub> : R-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CO	2,280-2,390	+	+	+
-CH=CH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CO (22:6)	2,490	-	-	-
-CH=CH-CH <sub>2</sub> -CH=CH- (18:2)	2,740	-	-	-
-CH=CH-(CH <sub>2</sub> -CH=CH) <sub>y</sub> (20:4, 22:6)	2,770-2,880	-	-	-
PE-1'	3,33	+	+	+
-N <sup>+</sup> (Me) <sub>3</sub> (PC)	3,190-3,250	+	+	+
PI-5'	3,210	-	-	+
CHD <sub>2</sub> OD	3,240	+	+	+
PS-1'	3,366	-	-	-
PI-3'	3,420	+	+	+
PC-2'	3,614	+	+	+
PI-4'	3,670	+	+	+
PI-2'	3,690	-	+	+
Gly-C3 (DG)	3,735	+	+	+
PI-6'	3,785	-	-	-
PI-1'	3,896	-	+	+
Gly-C1 (PLA/PC/PE)	4,028	+	+	+
Gly-C1 (SM)/Gly-C3 (F <sub>2</sub> )/PE-1'	4,048-4,060	+	+	+
Gly-C1 (PI)/PE-1'	4,090	+	+	+
Gly-C1 (DG/TG/PC/PE/PI)	4,140-4,215	+	+	+
Gly-C1 (SM)	4,184	+	+	+
PE-1'	4,262	+	+	+
Gly-C1 (DG/TG)	4,330-4,396	+	+	+
PLA (-O-)	4,362	-	-	-
Gly-C1 (DG/TG/PC/PE/PI)	4,390-4,470	+	-	+
H <sub>2</sub> O	4,50	+	+	+
Gly-C1 (DG)	5,176	+	-	-
Gly-C2 (PC/PE/PI)	5,243	-	+	+
Gly-C2 (TG)	5,300	+	-	+
Mono-UFA	5,341	+	+	+
Poly-UFA	5,360	+	+	+
PLA (-O-HC=)	5,936	-	-	-

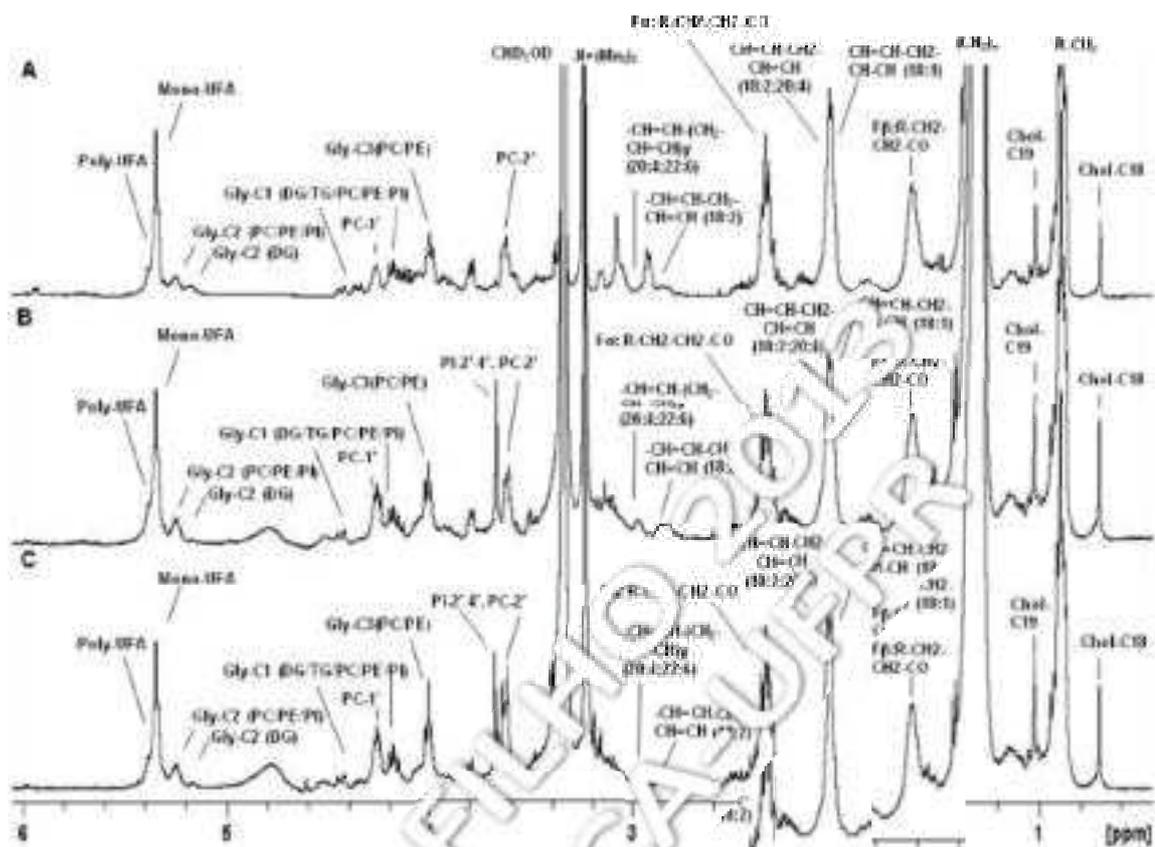


Figura 9. Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos extratos lipídicos das linhagens de melanoma humano RGP, VGP e MET (A, B e C, respectivamente) com as principais classes lipídicas assinaladas.

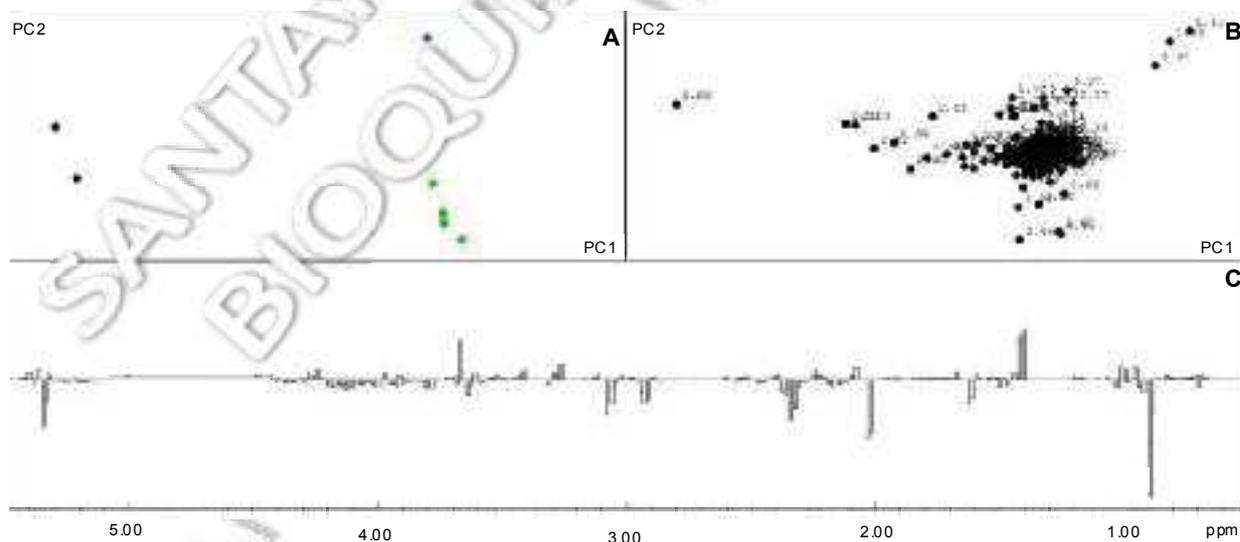


Figura 10. Resultados da análise de componentes principais realizada com os espectros de  $^1\text{H}$  provenientes dos extratos lipídicos das 3 linhagens de células de melanoma humano (RGP, VGP e MET, em preto, azul e verde na figura, respectivamente). A- Scores plot; B-Loadings plot; C-Loadings 1D Plot.

Para complementar a identificação dos compostos descritos na Tabela 5, foi realizado o experimento de RMN 2D HSQC-ed (Figuras 11 e 12). Neste experimento, os carbonos ligados a dois hidrogênios adquirem uma fase diferente daqueles ligados a 1 ou a 3 hidrogênios, assim grupamentos  $\text{CH}_2$  podem ser diferenciados de grupamentos CH e  $\text{CH}_3$ . Devido à grande semelhança entre as linhagens MET e VGP o mapa de deslocamento químico desta última foi omitido. Visando correlacionar os dados obtidos nas análises de GC-MS com os apresentados na análise de componentes principais, que sugeriram uma grande contribuição de um deslocamento químico localizado na região de compostos como inositois fosforilados, foram realizadas análises adicionais de RMN 1D de  $^{31}\text{P}$  e RMN 2D (HSQC, HSQC-ed, HMBC e HMBC  $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$ ) das linhagens e de padrões de fosfatidilinositol e mio-inositol. A comparação do mapa de deslocamentos químicos de RMN 2D HSQC-ed do padrão de mio-inositol (Figura 13A) e do extrato lipídico obtido da linhagem MET (Figura 13B) permitiu relacionar os carbonos pertencentes ao fosfatidilinositol e os pertencentes ao derivado de inositol que foi identificado nas linhagens (Figura 13). Assim foi possível estabelecer uma ligação entre o sinal em 3.670 ppm no espectro de  $^1\text{H}$  e carbonos pertencentes a moléculas de inositol. Estes carbonos apresentaram algumas pequenas variações em seus deslocamentos químicos, comparando o espectro da linhagem MET com o do padrão de mio-inositol, provavelmente relacionadas ao fato de pertencerem a derivados di ou tri fosforilados do inositol. Para se confirmar este composto como pertencente à classe dos fosfoinosítídeos, foi realizada uma comparação (sobreposição) dos experimentos de RMN 2D do tipo HSQC-ed e HMBC  $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$  realizados com padrões de fosfatidilinositol e com o extrato lipídico obtido da linhagem MET.

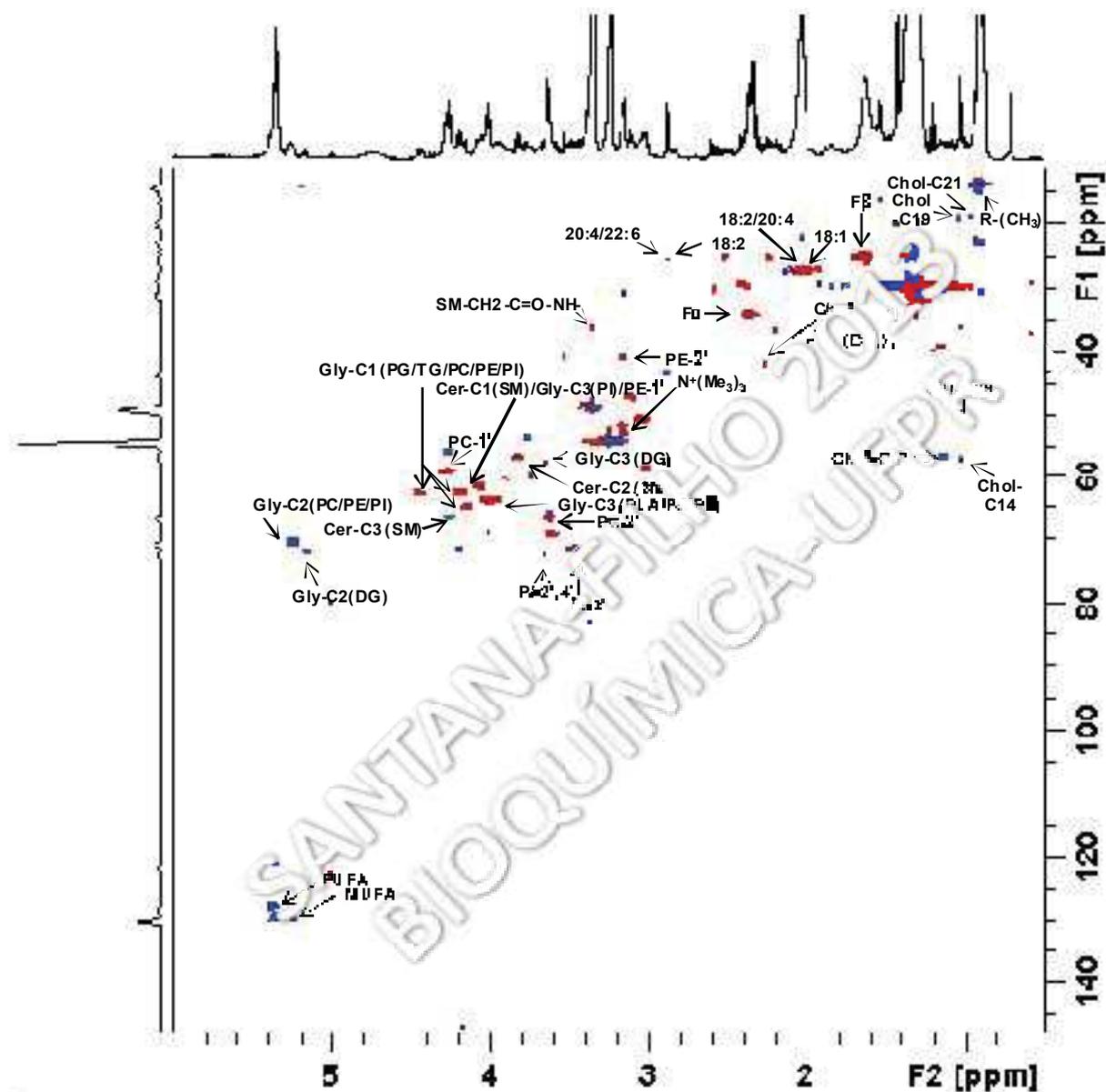


Figura 11. Mapa de deslocamento químico parcial do experimento de RMN 2D HSQC-ed obtido do extrato lipídico da linhagem de melanoma humano WM 1552 (RGP), mostrando os assinalamentos das principais classes de lipídeos encontradas. A fase positiva, mostrada em azul, corresponde a correlações de primeira ordem do tipo CH e CH<sub>3</sub>, enquanto que a fase negativa (vermelho) corresponde a correlações de primeira ordem do tipo CH<sub>2</sub>.

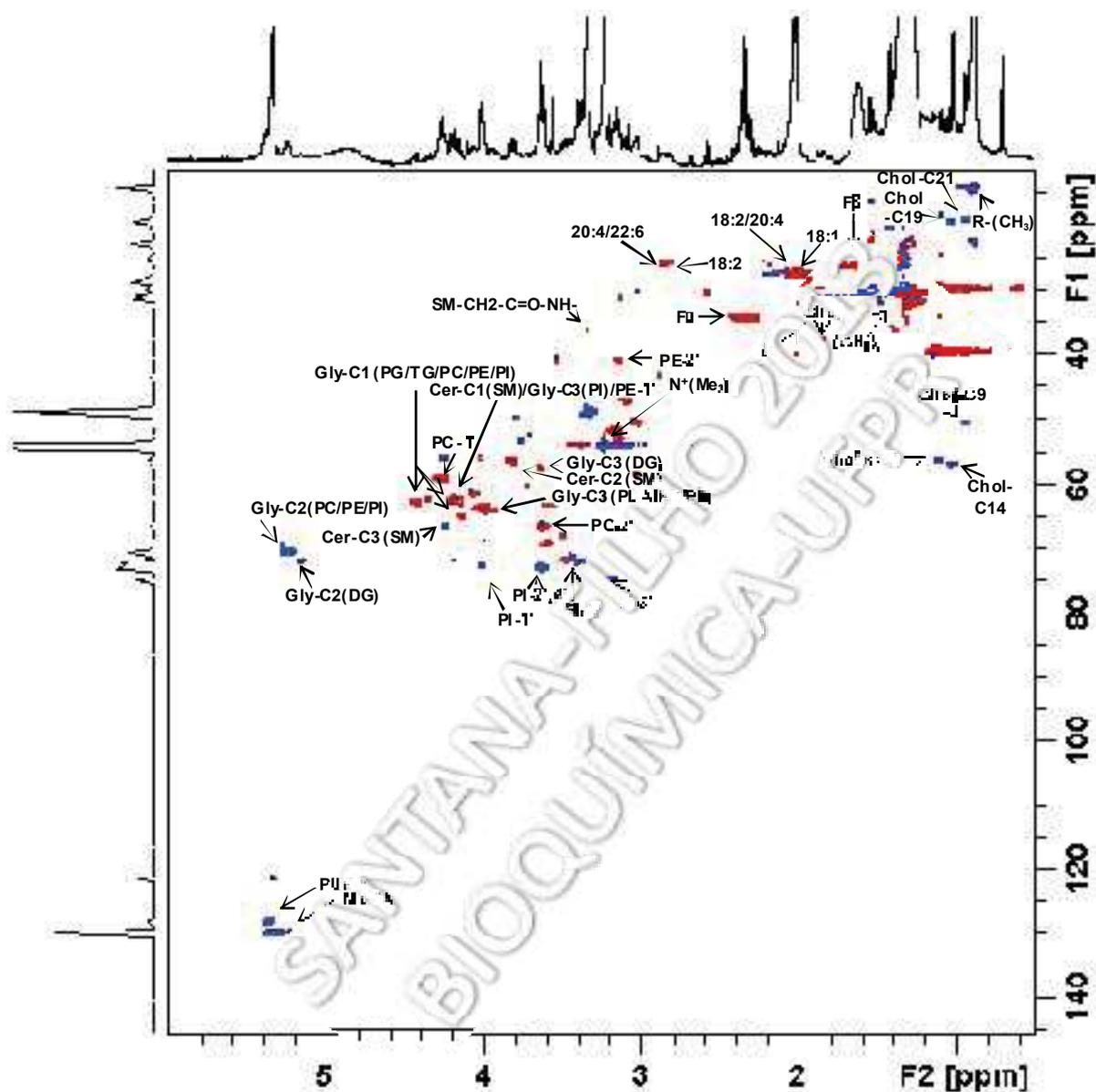


Figura 12. Mapa de deslocamento químico parcial do experimento de RMN 2D HSQC-ed obtido do extrato lipídico da linhagem de melanoma humano1205 Lu (MET), mostrando os assinalamentos das principais classes de lipídeos encontradas. A fase positiva, mostrada em azul, corresponde a correlações de primeira ordem do tipo CH e CH<sub>3</sub>, enquanto que a fase negativa (vermelho) corresponde a correlações de primeira ordem do tipo CH<sub>2</sub>.

Pela análise dos mapas de deslocamentos químicos (Figura 14 A e B) dos experimentos de RMN 2D HMBC  $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$  pode-se identificar correlações a longa distância entre os hidrogênios ligados aos carbonos identificados como pertencentes a derivados de inositol com os fosfatos correspondentes ao padrão de fosfatidilinositol, mostrados em preto nas Figuras 14A e 14B. Através da análise do espectro de HSQC-ed realizado com o padrão de fosfatidilinositol e com o extrato lipídico obtido da linhagem MET, foi possível assinalar os hidrogênios que mostram correlação à longa distância com o grupamento fosfato (H-1' e H-C3 do glicerol, Figura 15). Foi realizado também o assinalamento dos hidrogênios pertencentes ao anel do inositol e os pertencentes a molécula de glicerol do fosfatidilinositol.

Com estes dados (Figura 15) é possível afirmar que a grande diferença na quantidade de inositol observada nas análises de GC-MS se deve a presença de moléculas de fosfatidilinositol, moléculas estas que indicam alguma perturbação relacionada ao metabolismo deste glicerofosfolípídeo, indicando uma correlação com o potencial carcinogênico das 3 linhagens.

#### 5.1.4. Discussão

A quantidade de fosfatidilinositol em células e tecidos corresponde geralmente a 10% do total de fosfolípídeos, sendo que os fosfolípídeos estão presentes na membrana plasmática de células de eucariotos numa proporção de 1:1 em relação às também abundantes moléculas de colesterol (VAN MEER *et al.*, 2008). Além de ser encontrado também em membranas de organelas celulares (membrana mitocondrial, retículo endoplasmático, complexo de Golgi e endossomos) o fosfatidilinositol também participa de processos de sinalização e reconhecimento, porém todos os lipídeos envolvidos nestes processos não ultrapassam nem 1% do total de lipídeos encontrados em células e tecidos.

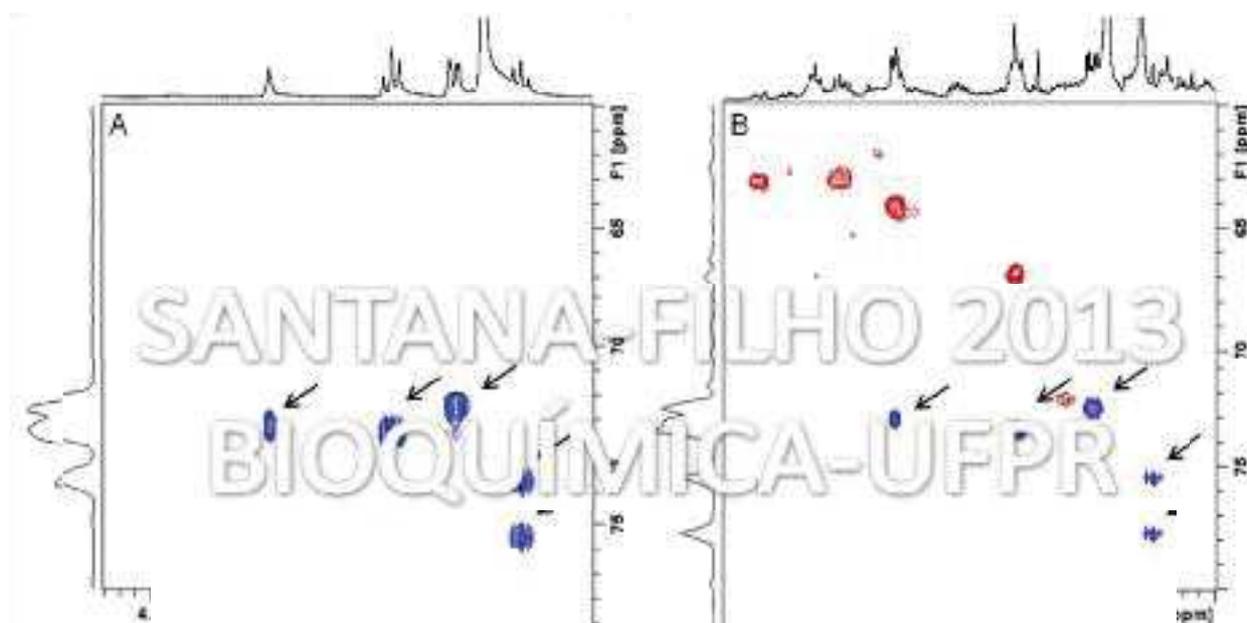


Figura 13. Mapa de deslocamento químico parcial do experimento de RMN 2D (HSQC-ed) realizado com um padrão de mio-inositol (A) dissolvido em  $\text{CDCl}_3:\text{CD}_3\text{OD}$  (1:1) e com o extrato lipídico da linhagem de melanoma humano 1205 Lu (B) no mesmo solvente. A fase positiva (azul) corresponde a correlações de primeira ordem do tipo CH e  $\text{CH}_3$ , enquanto que a fase negativa (vermelho) corresponde a correlações de primeira ordem do tipo  $\text{CH}_2$ .

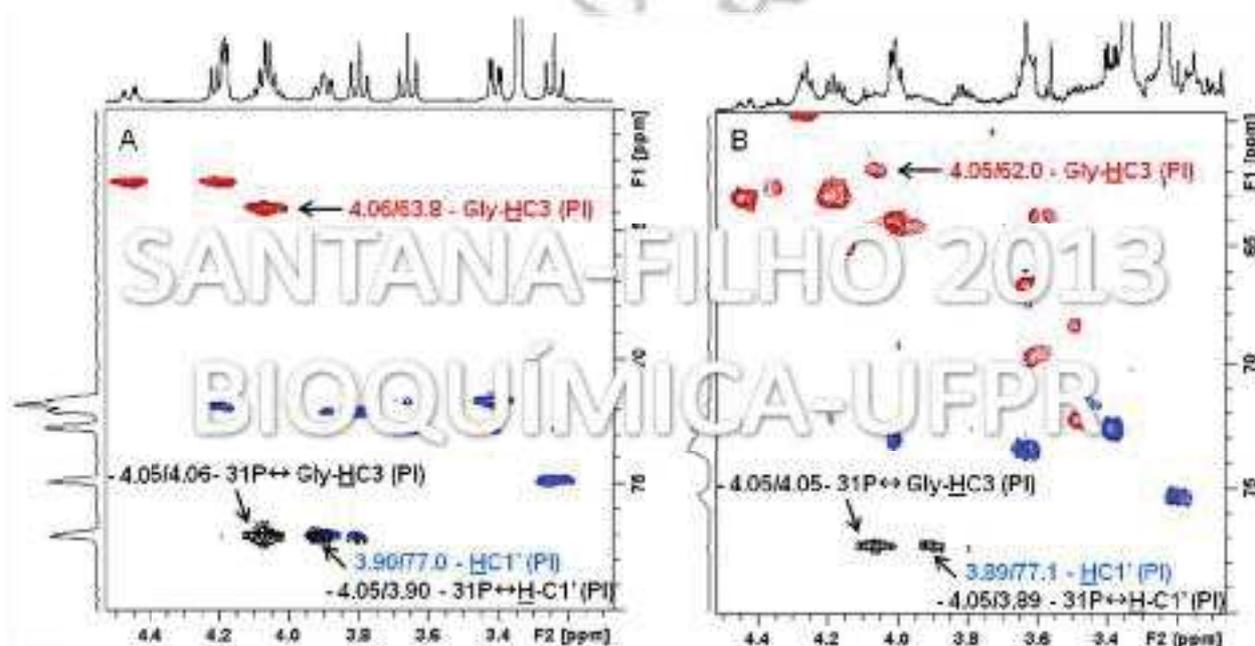


Figura 14. Mapa de deslocamento químico parcial do experimento de RMN 2D ( $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$  HMBC sobreposto por HSQC-ed) realizado com padrões de fosfatidilinositol (A) e com o extrato lipídico da linhagem de melanoma humano 1205 Lu (B). Os deslocamentos em preto correspondem à correlações  $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$  do tipo HMBC, e estão sobrepostos pelos mapas de deslocamento do tipo HSQC-ed onde a fase positiva, mostrada em azul, corresponde a correlações de primeira ordem do tipo CH e  $\text{CH}_3$ , enquanto que a fase negativa (vermelho) corresponde a correlações de primeira ordem do tipo  $\text{CH}_2$ .

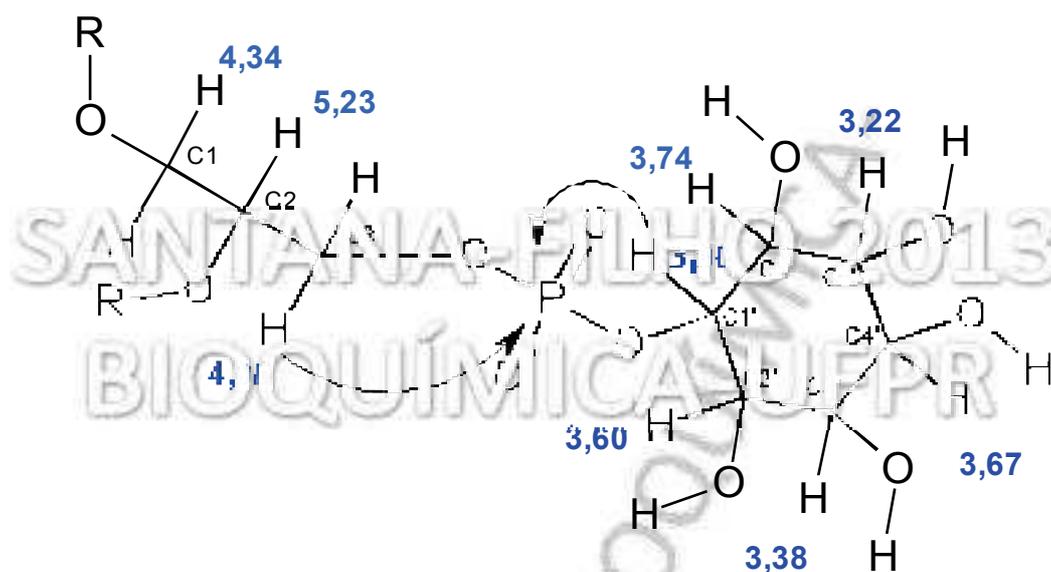


Figura 15. Representação da porção polar da molécula de fosfatidilinositol com os deslocamentos químicos referentes aos hidrogênios do inositol e do resíduo de glicerol. As flechas indicam correlações à longa distância entre  $^1\text{H}$  e  $^{31}\text{P}$  (HMBC). Os radicais R referem-se às cadeias de ácidos graxos ligadas aos carbonos C1 e C2 do glicerol.

O aumento da quantidade de fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato é um evento comum em diversos processos carcinogênicos, sendo resultado da superativação da enzima fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) (VIVANCO e SAWYERS, 2002). Na realidade, a molécula de fosfatidilinositol pode ser fosforilada nas posições 3, 4 e 5 do anel inositol, criando diversas possibilidades de derivados fosforilados, cada um com uma função própria dentro de uma intrincada rede de sinalização (BUNNEY e KATAN, 2010). Como exemplo, podemos citar o derivado fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato, que pode ser hidrolisado por fosfolipases do tipo C em inositol-1,4,5-trifosfato e diacilglicerol, que irão atuar como efetores das vias da proteína-quinase C e transporte de cálcio, respectivamente (RHEE, 2001). O próprio fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato é um efetor da AKT, uma serina-treonina quinase responsável pela ativação de uma cascata de sinalização que regula processos de proliferação, apoptose e crescimento (VIVANCO e SAWYERS, 2002). Dentre as vias de sinalização

influenciadas por fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato, uma das mais estudadas é a que envolve a fosfatase supressora de tumor com homologia a tensina (PTEN). Essa enzima está localizada *downstream* a PI3K, e é considerada a mais importante reguladora negativa da via de sinalização para sobrevivência celular iniciada pela PI3K (CULLY *et al.*, 2006). De fato, a perda, tanto de um alelo, como dos genes que codificam para PTEN ocorre com grande frequência em diversos tumores, como em mama e próstata, bem como em melanomas e gliomas (HOLLANDER, BLUMENTHAL e DENNIS, 2011). Mais importante ainda, outros estudos mostraram que mutações em PTEN são particularmente importantes para o desenvolvimento de algumas formas de melanoma (CELEBI *et al.*, 2000) e que o processo de inativação deste gene em melanoma envolve mecanismos epigenéticos que não são observados em outros tipos de tumores onde este gene também está envolvido (ZHOU *et al.*, 2000). Porém, devido à grande diferença na proporção de inositol nas três linhagens analisadas, particularmente entre as linhagens RGP e MET, a hipótese mais provável é que esse fosfolípídeo tenha uma função primária na formação de estruturas, enquanto que secundariamente esteja atuando em processos de sinalização. Existem poucos relatos na literatura que caracterizem modificações a níveis estruturais de fosfolípídeos durante processos carcinogênicos (CALORINI *et al.*, 1987; SCHROEDER e GARDINER, 1984b), particularmente em melanomas de origem humana, e a maioria deles utiliza metodologias que, embora forneçam resultados precisos (PORTOUKALIAN *et al.*, 1979), não dispunham dos avanços tecnológicos que ocorreram nos últimos 15 anos na área de espectrometria de massas, cromatografia gasosa e espectroscopia de RMN, enfatizando ainda mais a importância dos resultados encontrados neste trabalho, que justificaram o desenvolvimento e aprimoramento das metodologias aqui aplicadas.

Os experimentos permitiram identificar alterações metabólicas envolvidas com o metabolismo de fosfatidilinositol, alterações estas que estão presentes nas três linhagens

analisadas como representantes das fases de crescimento RGP, VGP e MET. Aparentemente nestas três linhagens o potencial carcinogênico está diretamente associado ao aumento da quantidade de fosfatidilinositol nas células. Entretanto, a análise de padrões de moléculas de fosfatidilinositóis esterificadas com fosfatos em diferentes posições por técnicas de RMN e espectrometria de massas com ionização à pressão atmosférica são necessárias para que se identifiquem com total precisão quais derivados fosforilados de inositóis estão presentes em concentração alterada nas linhagens. Caso estes experimentos forneçam dados suficientemente claros, experimentos envolvendo o uso de inibidores para etapas específicas de vias de sinalização e síntese de fosfoinositídeos também devem ser realizados, visando identificar qual ponto da via está sendo alterado em cada uma das linhagens.

SANTANA-FILHO 2013 BIODIVERSIDADE  
UFPR

## 5.2. Cultivo e análise das linhagens de origem murina

As linhagens de melanoma e melanócitos apresentaram comportamentos distintos no que se refere ao número de células necessário para se atingir uma confluência de 80%, revelando uma grande diferença no volume celular (35%, com a linhagem B16-F10 sendo a de menor volume) entre as linhagens, porém a diferença no volume não se refletiu na diferença de massa, pois pela contagem do número de células e pesagem do *pellet* liofilizado foi revelado que a linhagem de melanócito apresentou uma massa do *pellet* apenas 12% menor.

### 5.2.1. Análises de RMN

As duas linhagens de células de origem murina utilizadas neste trabalho (B16-F10 e Melan-a) foram cultivadas até alcançarem uma confluência de aproximadamente 80%. As linhagens de melanócitos e melanoma foram cultivadas *in vitro* e os extratos lipídicos obtidos como descrito na metodologia. Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  obtidos dos extratos lipídicos das duas linhagens (B16-F10 e Melan-a) mostraram-se muito semelhantes (Figura 16), sendo que o assinalamento das diferentes classes lipídicas foi realizado através da combinação dos experimentos de RMN 1D e 2D, com a ajuda de dados da literatura (ADOSRAKU *et al.*, 1994; BECKONERT *et al.*, 2010; CASU *et al.*, 1991; CHOI *et al.*, 1993; COEN *et al.*, 2003; WILLKER e LEIBFRITZ, 1998). Com poucas exceções, todas as classes de lipídeos presentes nos extratos puderam ser identificadas no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Tabela 6) e os experimentos bidimensionais 2D HSQC-ed contribuíram significativamente para esclarecer ambiguidades que ocorreram quando houve sobreposição de sinais no espectro 1D de  $^1\text{H}$  (Figuras 17 e 18). O experimento de RMN 2D HSQC-ed foi bastante útil nesta etapa, pois contribuiu para a correta identificação dos carbonos pertencentes aos resíduos de glicerol

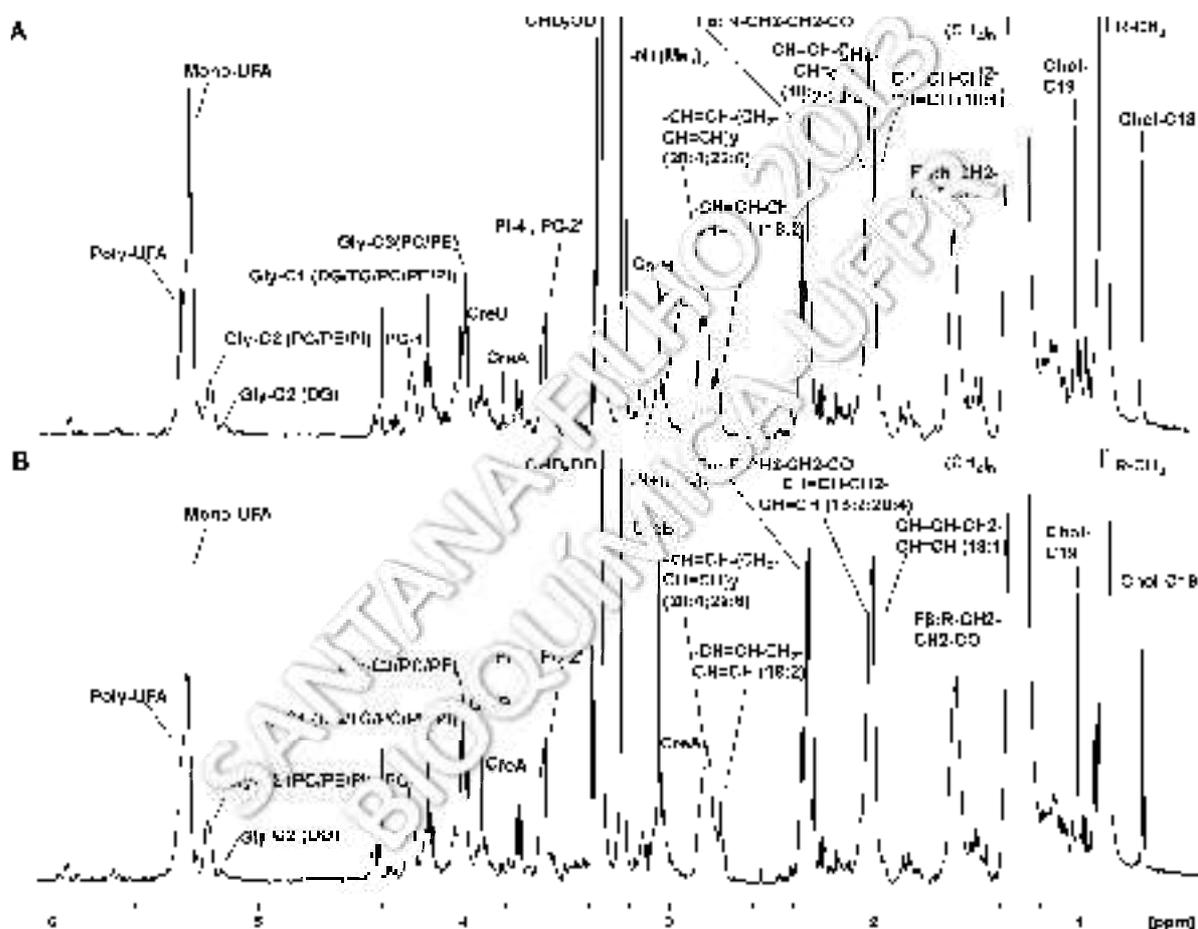


Figura 16. Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos extratos lipídicos obtidos das linhagens murinas Melan-a (A) e B16-F10 (B). Os deslocamentos químicos estão referenciados ao padrão interno TMS ( $\delta = 0$  ppm). Para maiores detalhes dos assinalamentos consultar a Tabela 6.

presentes em diversas classes lipídicas, graças à sequência de edição de multiplicidade combinada com atribuição de fases específicas no mapa de deslocamento químico de RMN 2D obtido.

### 5.2.2. Derivatizações e análises por GC-MS

As derivatizações e análises por GC-MS foram realizadas nos extratos lipídicos obtidos a partir das linhagens de células murinas Melan-a e B16-F10, como descrito nos materiais e métodos. As derivatizações foram realizadas através da utilização de  $\text{AcCl-CH}_3\text{OH}$

Tabela 6. Assinalamento das classes lipídicas presentes nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  obtidos dos extratos lipídicos das linhagens murinas Melan-a e B16-F10.

Metabólito/Classe lipídica	$\delta$ (ppm) $^1\text{H}$
Chol-C <sub>18</sub>	0,700
R-CH <sub>3</sub>	0,840-0,910
Chol-C <sub>21</sub>	0,915
-CH=CH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	0,975
Chol-C <sub>19</sub>	1,017
Chol	1,050-1,140
RCO <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	1,130
(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub>	1,200-1,220
Chol	1,250-1,553
F <sub>7</sub> :R-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CO <sub>2</sub> -	1,555-1,567
F <sub>7</sub> :CH=CH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -	1,613-1,764
Chol	1,755-1,890
Chol	1,910-1,970
-CH=CH-CH <sub>2</sub> -CH-CH- (11:1)	2,010-2,030
-CH=CH-CH <sub>2</sub> -CH=CH- (18:1; 20:4)	2,045
-CH=CH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH-CH- (20:4)	2,065-2,120
Chol	2,120-2,280
F <sub>6</sub> : R-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CO <sub>2</sub> -	2,280-2,390
-CH=CH-CH <sub>2</sub> -CH-CH- (11:6)	2,410
-CH=CH-CH <sub>2</sub> -CH-CH- (18:1)	2,740
-CH=CH-(CH <sub>2</sub> -CH=CH-) <sub>n</sub> (2:4-11:6)	2,770-2,880
CreA	3,040
CreB	3,054
PE-1'	3,135
-N <sup>+</sup> (Me) <sub>3</sub> (C <sub>12</sub> )	3,190-3,250
PI-5'	3,250
Chol-C3	3,330
-CHD <sub>2</sub> -GD	3,340
PS-1'	3,366
PI-3'	3,420
PC-2'	3,614
PI-4'	3,650
PI	3,690
Gly-1' (DG)	3,735
PE-2'	3,785
CreA	3,817
PE-1'	3,896
CreB	3,914
Gly-C3(PE/PC/PE)	4,028
Cer-C <sub>1</sub> (DG)/Gly-C3(PI)/PE-1'	4,048
Gly-1' (PI/PE-1')	4,090
Gly-C <sub>1</sub> (TG/TG/PC/PE/PI)	4,140-4,215
Cer-C <sub>1</sub> (SM)	4,184
PC-1'	4,262
Gly-C <sub>1</sub> (DG/TG)	4,330-4,396
Gly-C <sub>1</sub> (CH-)	4,362
Gly-C <sub>1</sub> (DG/TG/PC/PE/PI)	4,390-4,470
HOD	4,573
Gly-C2 (DG)	5,176
Gly-C2 (PC/PE/PI)	5,243
Gly-C2 (TG)	5,300
Mono-UFA	5,341
Poli-UFA	5,367
PLA (-O-HC=)	5,936

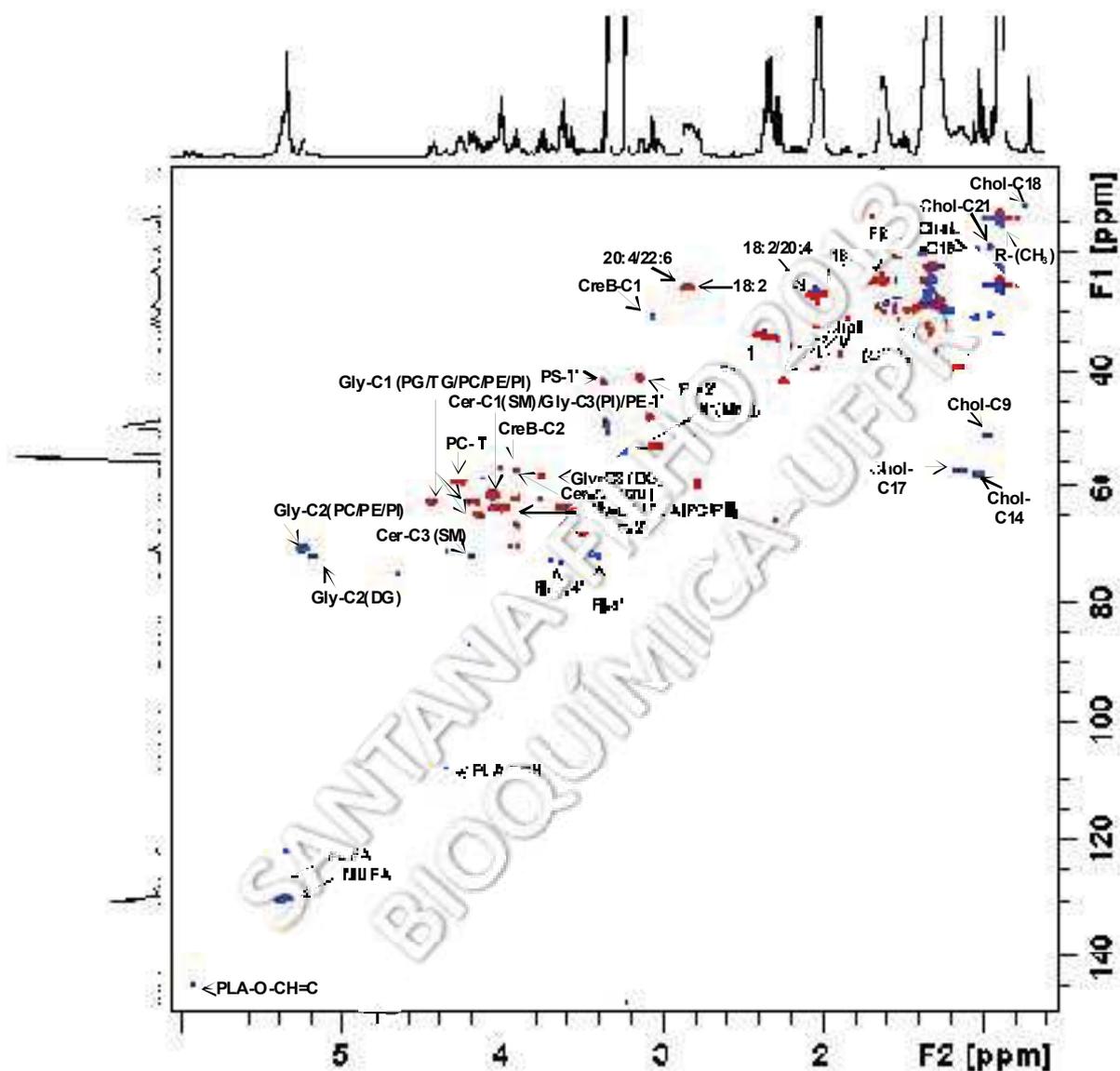


Figura 17. Mapa de deslocamento químico parcial do experimento de RMN 2D HSQC-ed obtido do extrato lipídico da linhagem de melanócito murino Melan-a, mostrando os assinalamentos das principais classes de lipídeos encontradas. A fase positiva, mostrada em azul, corresponde a correlações de primeira ordem do tipo CH e CH<sub>3</sub>, enquanto que a fase negativa (vermelho) corresponde a correlações de primeira ordem do tipo CH<sub>2</sub>.

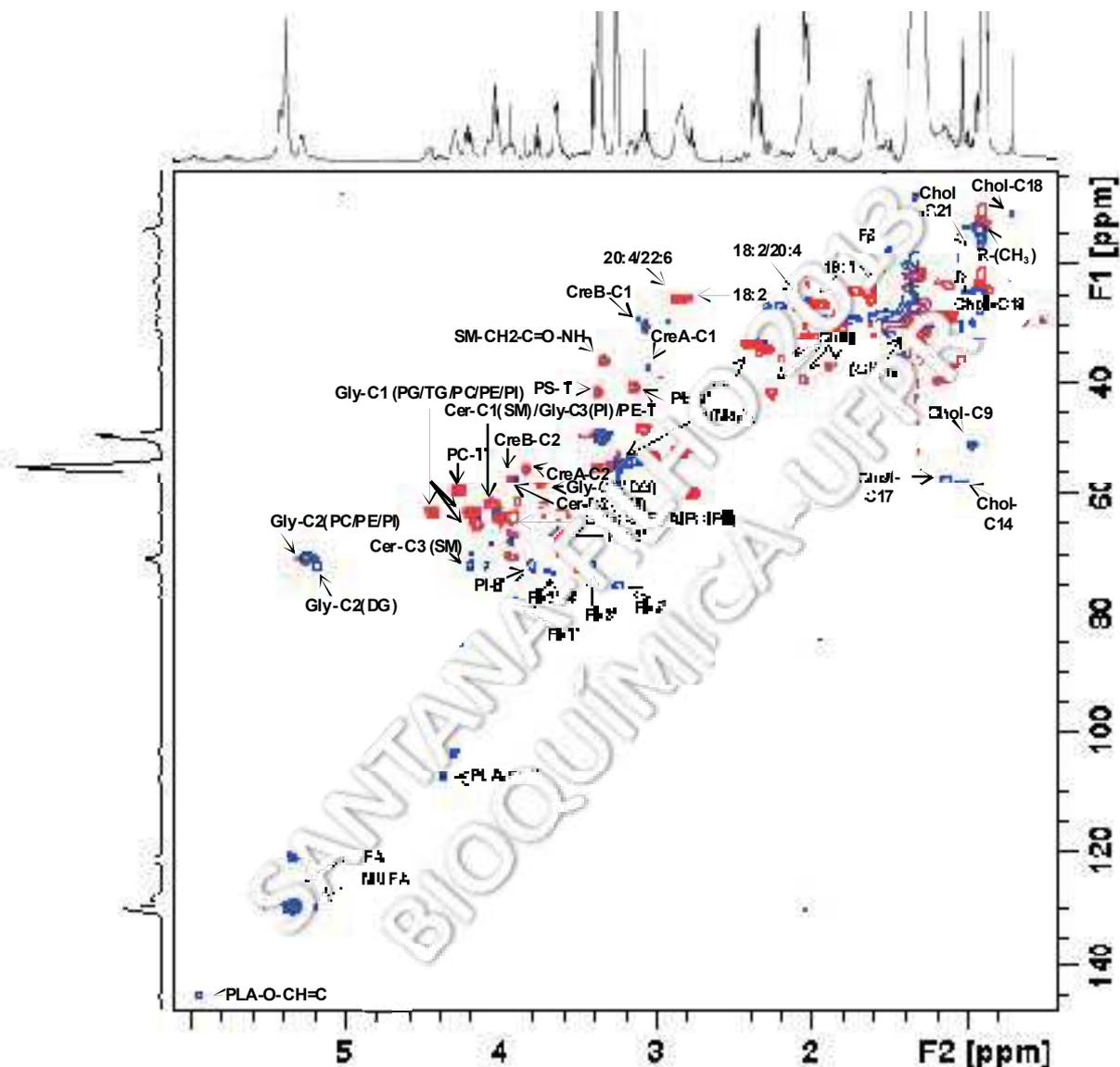


Figura 18. Mapa de deslocamento químico parcial do experimento de RMN 2D HSQC-ed obtido do extrato lipídico da linhagem de melanoma murino B16-F10, mostrando os assinalamentos das principais classes de lipídeos encontradas. A fase positiva, mostrada em azul, corresponde a correlações de primeira ordem do tipo CH e CH<sub>3</sub>, enquanto que a fase negativa (vermelho) corresponde a correlações de primeira ordem do tipo CH<sub>2</sub>.

e AcCl-CD<sub>3</sub>OD, nos extratos das linhagens Melan-a e B16-F10, respectivamente. Inesperadamente, foi verificado que nas análises por GC-MS os derivados ácidos graxos metil-*d*<sub>3</sub> éster eluíram mais rapidamente (diferença média de tempo de ~ 0,03 minutos, Tabela 7) do que o derivado não deuterado correspondente, sendo que isto ocorreu com todos os derivados ácidos graxos metil éster, mesmo quando utilizamos outra matriz biológica, como o extrato lipídico obtido de linhagem de células de melanoma humano SK-MEL-28 (Tabela 7). De forma a investigar esta propriedade, algumas condições das análises de GC-MS foram alteradas (Tabela 8), aumentando a temperatura do injetor, a taxa de *split* e usando diferentes solventes para dissolver os compostos após a metanólise, antes de efetuar a injeção das amostras no equipamento. No entanto, esta propriedade foi mantida. Um comportamento semelhante foi observado para os derivados de benzeno e ciclohexano deuterados ou não deuterados (DAVIS e SCHIESSLER, 1973), hidrocarbonetos substituídos isotopicamente (FALCONER e CVETANOVIC, 1962) e com ácidos graxos metil éster e ácidos graxos metil-*d*<sub>3</sub> éster (THURNHOFER e VETTER, 2006). Sendo assim, concluiu-se que a diferença no tempo de retenção dos derivados pode ser atribuída a diferentes pressões de vapor dos derivados metanolizados, sendo que o derivado ácido graxo metil-*d*<sub>3</sub> éster apresenta uma pressão de vapor mais elevada do que o derivado não deuterado, uma vez que o primeiro tem um ponto de ebulição mais baixo (GAUMANN e BONZO, 1973). No entanto, o resultado mais importante foi a reprodutibilidade da quantificação realizada, quando os derivados deuterados e os não deuterados são analisados simultaneamente. Isto permite a análise simultânea de duas amostras diferentes no mesmo cromatograma, diminuindo o tempo de análise requerido e reduzindo problemas de reprodutibilidade, proporcionando, assim, uma comparação mais confiável.

Tabela 7. Tempo de retenção ( $R_t$ ) dos ácidos graxos metil e metil- $d_3$  éster obtidos após reação de esterificação (metanólise) no extrato lipídico obtido da linhagem de melanoma humano SK-MEL-28<sup>a</sup>.

Ácido graxo	Metil- $d_3$	Metil	Metil- $d_3$	Metil
	DB-1 $R_t$ (min)	DB-1 $R_t$ (min)	DB-225 $R_t$ (min)	DB-225 $R_t$ (min)
C14:0	21,82	21,84	5,86	5,89
C15:0	21,97	23,80	6,27	6,10
C17:0	23,12	23,52	6,91	6,14
C16:0	23,74	23,76	6,80	6,82
C17:0	24,23	23,67	7,47	7,17
C18:3	24,00	8,73	-	7,11
C18:2	28,75	28,78	8,92	8,96
C18:1	28,86	28,87	8,58	8,62
C18:0	29,36	29,39	8,32	8,34

<sup>a</sup>- Os derivados ácidos graxos metil éster foram analisados por GC-MS equipados com as colunas DB-1 e DB-225. <sup>b</sup>- não detectado

Em relação às análises das duas linhagens murinas, estas revelaram uma composição diferenciada de ácidos graxos, sendo que o extrato lipídico obtido da linhagem Melan-a apresentou uma proporção menor de ácidos graxos C14 e C16, quando comparado com a linhagem de células B16-F10 (Figura 19A). Para os ácidos graxos C18 e C18:1, este efeito foi o oposto, principalmente para o C18:1, com a linhagem Melan-a apresentando uma quantidade relativamente mais elevada desses dois ácidos graxos do que a linhagem B16-F10. As quantificações foram realizadas com os íons de  $m/z$  74 e 55, e 77 e 55 (MJØS, 2004; THURNHOFER e VETTER, 2005) (Figura 20). Também foi realizada a análise de uma amostra contendo uma mistura de quantidades iguais de cada metanolizado, com o objetivo de se determinar a reprodutibilidade do método, como mostrado na Figura 19B.

Tabela 8. Valores iniciais e finais dos parâmetros modificados para a otimização das análises por GC-MS dos derivados ácidos graxos metil éster.

Parâmetro	Inicial	Final
Stream	1,5	4
Ratão gás	10	10
Velocidade	1,000	4,450
Temperatura do injetor (°C)	270	250

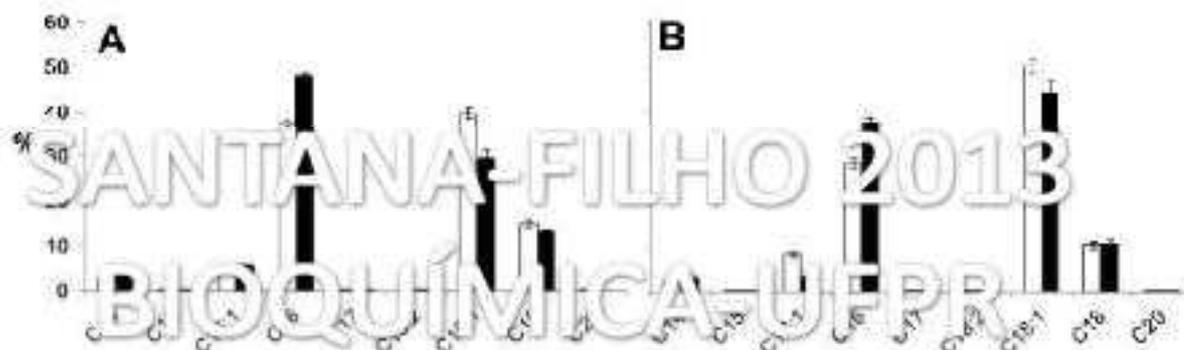


Figura 19. Quantificação relativa (%) dos derivados de ácidos graxos metil éster e metil- $d_3$  éster após a reação de metanólise nos extratos lipídicos obtidos das linhagens murinas Melana (barras brancas) e B16-F10 (barras negras). A- quantificação realizada com as amostras sendo injetadas em separado e B- quantificação realizada com as amostras sendo injetadas ao mesmo tempo.



Figura 20. (A) Mecanismo de formação do rearranjo de McLafferty, com os respectivos valores de  $m/z$  para os íons derivados metil e metil- $d_3$ ; (B) estrutura proposta dos íons com  $m/z$  81 (cátion ciclohexenil), e (C)  $m/z$  79 (cátion hexadienil), principais íons formados em espectros de impacto eletrônico de ácidos graxos mono e poliinsaturados.

Infelizmente, devido à problemas de quantificação, como explicado abaixo, a quantificação simultânea dos derivados de ácidos graxos metil éster e metil- $d_3$  éster e não foi possível para os ácidos graxos insaturados, como se mostra na Figura 19B, em parte por causa da menor diferença no tempo de retenção para os derivados de ácidos graxos insaturados com cadeias mais curtas de carbono. No entanto, o fator que mais prejudicou a quantificação simultânea dos ácidos graxos insaturados foi devido ao fato que os fragmentos que possibilitam a identificação dos ácidos graxos insaturados no espectro de impacto eletrônico são formados após a eliminação do *headgroup* (Figura 20), que permanece sem carga, de modo que os íons formados são encontrados no espectro de massa dos derivados de ácidos graxos metil éster e metil- $d_3$  éster (THURNHOFER e VETTER, 2006).

### 5.2.3. Análise de componentes principais

A análise de componentes principais foi realizada nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  obtidos a fim de detectar diferenças que não poderiam ser atribuídas por processos de integração das áreas de sinais. A contribuição de cada sinal na discriminação foi baseada em uma escala proporcional à distância do sinal ao cluster presente no *loadings plot*, onde uma maior contribuição corresponde a uma maior distância do cluster. As linhagens B16-F10 e Melan-a foram diferenciadas principalmente pelo primeiro componente principal (PC1- eixo horizontal da Figura 21A), o qual explicou 95% da variância. Entre as classes de lipídeos, os sinais que mais influenciaram a discriminação no PC1 (Figura 21B e C) tiveram seus deslocamentos químicos atribuídos ao colesterol (C-18 e C-19) e de ácidos graxos monoinsaturados e insaturados, que incluem a região de deslocamento químico de C14, C16 e C18:1, o que corrobora com os dados obtidos por GC-MS, que revelaram proporções diferentes destes ácidos graxos entre as linhagens de células (Figura 19). No entanto, os deslocamentos químicos que mais influenciaram na diferenciação foram aqueles situados em

3,054 ppm e 3,914 ppm (Tabela 9). Cada sinal que contribuiu de forma significativa para distinguir as linhagens de células teve sua significância verificada através da análise estatística de seu *bucket*, que mostrou que eles estão dentro dos níveis de confiança estabelecidos pela matriz de covariância.

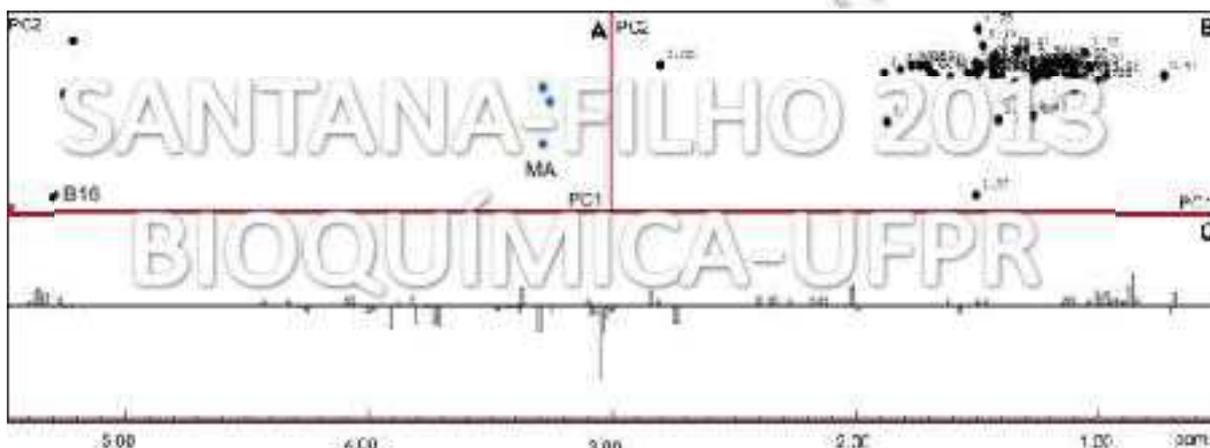


Figura 21. *Scores plot* (A) da análise de PCA realizada com os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  obtidos dos extratos lipídicos das linhagens murinas Melan-a (MA) e B16-F10 (B16), (B) *Loadings plot*, (C) *1D Loadings plot*.

Um dos sinais que mais contribuiu para a diferenciação em PC1 das linhagens celulares foi o de deslocamento químico situado em 3,914 ppm, sendo que a intensidade deste sinal foi maior no extrato lipídico obtido da linhagem B16-F10 do que no extrato lipídico de Melan-a (Figura 16). No experimento de HSQC-ed, este sinal pôde ser correlacionado diretamente a um átomo de carbono com deslocamento químico de 56,83 ppm que foi atribuído como um grupo  $\text{CH}_2$  pela sequência de edição de fase (Figura 18). A fim de identificar o composto que estaria originando este sinal, experimentos adicionais de RMN 2D (TOCSY e HMBC), foram realizados, como mostrado na Figura 22 (A-D). Com a análise de HMBC (Figura 22B) este sinal mostrou correlações de longo alcance com carbonos situados em  $\delta$  de 170,30 e 186,32 ppm, embora no experimento TOCSY nenhum acoplamento pôde ser detectado, provavelmente devido aos efeitos de sobreposição de sinais no mapa de

correlação bidimensional. Com o objetivo de obter a correta atribuição deste sinal, a amostra foi particionada entre água e clorofórmio. A fase superior, aquosa, que continha os componentes polares da partição, foi liofilizada e dissolvida em D<sub>2</sub>O para análise de RMN.

Tabela 9. Deslocamentos químicos e respectivas contribuições na discriminação dos compostos presentes nos extratos lipídicos das linhagens murinas Melan-a e B16-F10<sup>a</sup>.

Classe lipídica/metabólito	$\delta$ (ppm) <sup>1</sup> H	Contribuição para discriminação em PC1 (unidades arbitrárias)
<b>Chol-C18</b>	0,698	+
<b>R-CH<sub>3</sub></b>	0,870	+++
<b>Chol C19</b>	1,012	+
<b>-CH=C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (C=C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (18:1))</b>	1,017	++
<b>-CH=CH-CH<sub>2</sub>-CH=CH- (18:1)</b>	1,145	++
<b>-CH=CH-CH<sub>2</sub>-CH=CH- (18:1)</b>	1,316	+
<b>Creatina</b>	3,214	+++
<b>Creatinina</b>	3,054	++++
<b>DG-C3</b>	3,734	++
<b>Creatina</b>	3,816	++
<b>Creatinina</b>	3,914	+++
<b>PUFA/MUFA</b>	5,361	++

<sup>a</sup>- Os deslocamentos químicos estão referenciados ao padrão interno TMS ( $\delta = 0$  ppm).

O experimento de TOCSY foi repetido e desta vez mostrou o acoplamento do sinal em 3,910 ppm com outro sistema de *spin* situado a 3,054 ppm (Figura 22C), ou seja, justamente o que estava contribuindo de maneira bastante significativa para a diferenciação em PC1 na análise de PCA. Com esta informação, foi possível identificar com sucesso o metabólito como sendo 2-amino-1-metil-5H-imidazol-4-ona (creatinina, Figura 22D). Experimentos adicionais com padrões confirmaram este resultado (dados não mostrados). Os experimentos de HMBC da fração aquosa da partição também indicaram acoplamentos de longo alcance entre os grupamentos de CH<sub>2</sub> e CH<sub>3</sub>, que também estavam presentes no mapa de deslocamento químico obtido a partir do extrato lipídico intacto, mas que não foram assinalados devido à

sobreposição com outros sinais. Também foi possível identificar o metabólito precursor da creatinina, a creatina, que originou deslocamentos químicos no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  em 3,040 ppm e 3,817 ppm, que também influenciaram na diferenciação no primeiro componente principal, e originaram mapas de deslocamento químico com muitos sinais semelhantes

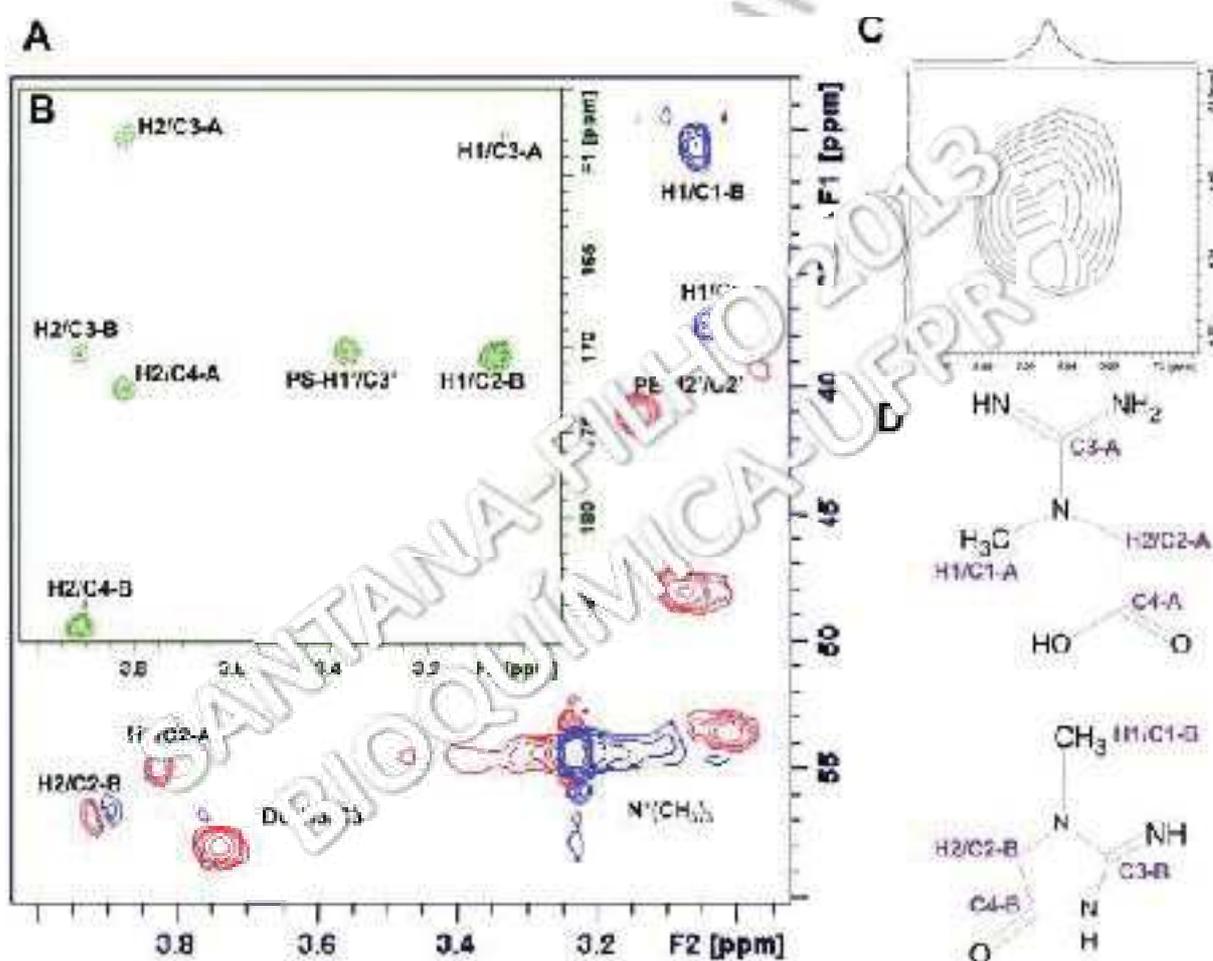


Figura 22. *Fingerprints* identificados no mapa de deslocamento químico de RMN 2D dos experimentos homo e heteronucleares; (A) - assinalamentos dos *fingerprints* no experimento HSQC-ed, a fase positiva, mostrada em azul, corresponde a correlações de primeira ordem do tipo CH e CH<sub>3</sub>, enquanto que a fase negativa (vermelho) corresponde a correlações de primeira ordem do tipo CH<sub>2</sub>. Como referência as estruturas das moléculas de creatina (superior) e creatinina (inferior) são mostradas em (D); (B) Mapa de deslocamento químico parcial do experimento HMBC, mostrando as correlações heteronucleares de longa distância dos prótons H1 e H2 das estruturas vistas em (D) com os carbonos quaternários. (C) Espectro parcial do experimento TOCSY, mostrando as correlações homonucleares entre os dois sistemas de *spins* isolados na molécula de creatinina.

aos da creatinina nos experimentos de HSQC-ed e HMBC (Figura 22A-C). Também foi realizada uma extração aquosa das linhagens celulares liofilizadas (Figura 23), que permitiu a identificação e quantificação de compostos hidrofílicos no espectro de RMN de  $^1\text{H}$ . Esta fração também apresentou alterações acentuadas entre as linhagens celulares (Tabela 10). As principais diferenças encontradas foram, novamente, aquelas relacionadas com as concentrações metabólicas de creatina, os níveis de lactato e treonina, (superiores no extrato aquoso obtido da linhagem B16-F10) e os níveis de alanina, acetato, e lisina, os quais apresentavam concentrações mais elevadas no extrato aquoso obtido da linhagem Melan-a.

Essas variações estão de acordo com alguns trabalhos na literatura realizados com tecidos e linhagens de células neoplásicas, porém de outros carcinomas. Aumentos dos níveis de lactato e treonina foram observados quando amostras de tecidos de câncer de colo retal foram comparadas com amostras de tecido normal (WANG *et al.*, 2013), por outro lado neste estudo os níveis de creatina apresentaram diminuição no tecido proveniente das amostras cancerígenas se comparadas ao controle. Embora o aumento dos níveis de alguns metabólitos (lactato, 2,6-Bifosfoglicerato) sejam amplamente difundidos como relacionados ao fenótipo cancerígeno (PLATHOW e WEBER, 2008), outros metabólitos necessitam de uma análise mais minuciosa, sempre levando em conta o tipo celular estudado e seus níveis em condições normais de crescimento celular e em condições de desenvolvimento de neoplasias, um bom exemplo são os níveis de lisina, que no estudo de Wang *et al.* (WANG *et al.*, 2013) aparece como relacionado à carcinogênese, ao contrário do observado na Tabela 10.

O fato da creatina, e não a creatinina, estar presente em maiores quantidades no extrato aquoso quando comparado com o extrato lipídico é provavelmente devido a maior estabilidade da creatina em água, o que impede a sua degradação em creatinina, que ocorre de forma tanto enzimática quanto espontânea (WYSS e KADDURAH-DAOUK, 2000).

Tabela 10. Assinalamentos e quantificação relativa dos metabólitos com concentrações alteradas presentes no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do extrato aquoso das linhagens murinas Melan-a e B16-F10.

Metabólito	$\delta$ (ppm) $^1\text{H}$	Área integrada (u.a.)		
		Melan-a	B16-F10	B16/MA
Urea	2,704	4,34	5,31	1,13
Lactato/Treonina	1,327	1,09	1,88	1,72
Alanina	2,492	1,51	1,05	0,70
Alanina	1,128	1,05	1,31	1,27
Alanina	1,157	1,37	1,76	1,58
Creatina	3,040	0,64	1,26	1,97
Lactato	4,106	0,91	1,34	1,47

#### 5.2.4. Avaliação da expressão gênica

Com o objetivo de investigar os mecanismos de sinalização intracelular alterados entre as células de melanócitos e melanoma relacionados com as diferentes quantidades de creatina encontradas nos extratos lipídicos das duas linhagens, ensaios de expressão gênica foram realizados. Os experimentos de qRT-PCR mostraram que os níveis de mRNA que codificam para a expressão da enzima GAMT (guanidinoacetato-metiltransferase), a qual é responsável pela catalisação do passo final da síntese de creatina, mostraram-se significativamente mais elevados na linhagem de células B16-F10 em comparação com Melan-a (Figura 24), o que confirma que a rota bioquímica deste metabólito está alterada à nível transcricional. Níveis de expressão diferentes de GAMT explicam as diferentes quantidades de creatina encontradas associadas com os extratos lipídicos nas linhagens de células B16-F10 e Melan-a.

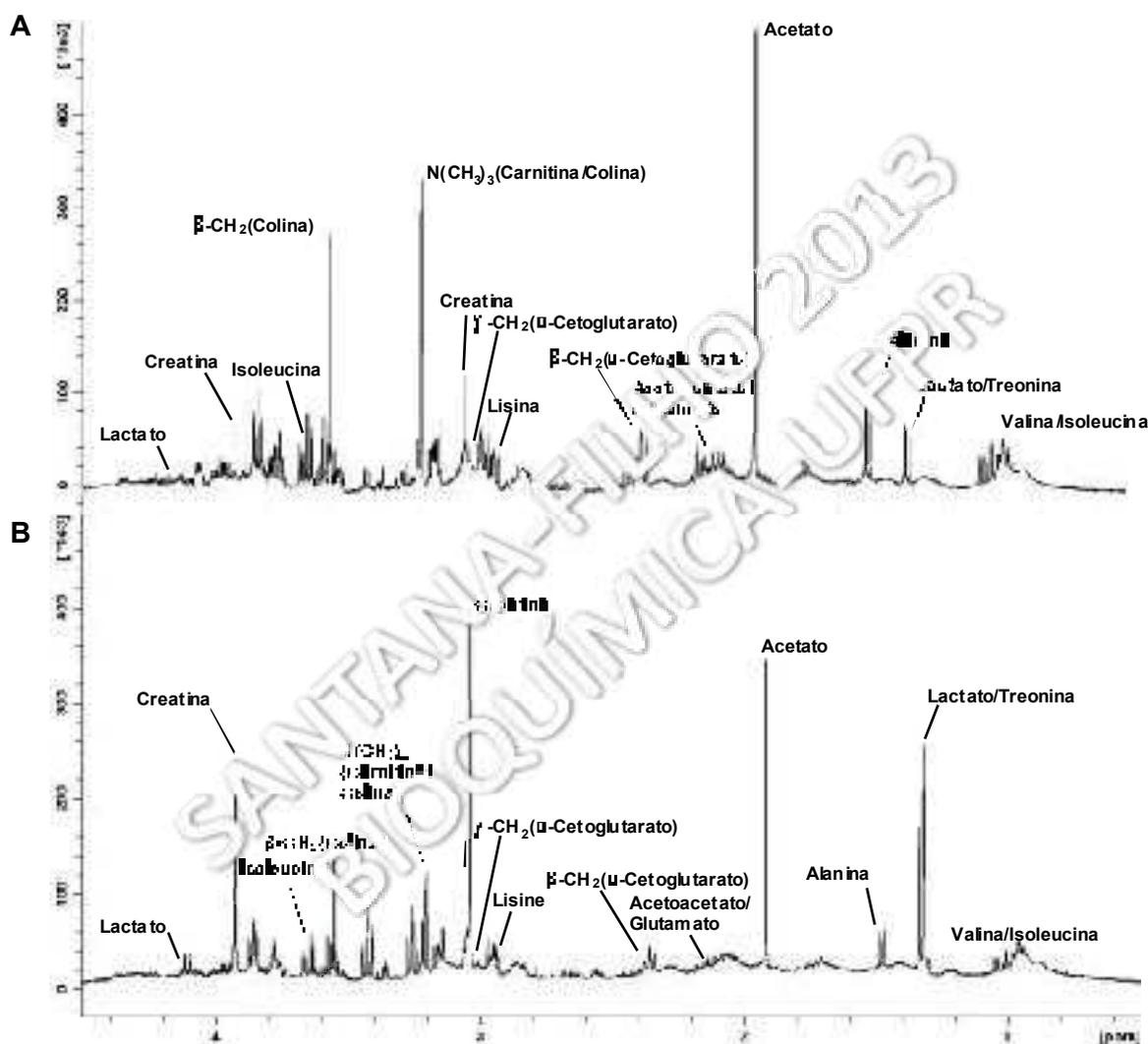


Figura 23. Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos extratos aquosos obtidos das linhagens murinas Melan-a (A) e B16-F10 (B). Os deslocamentos químicos estão referenciados ao TMS ( $\delta = 0$  ppm).

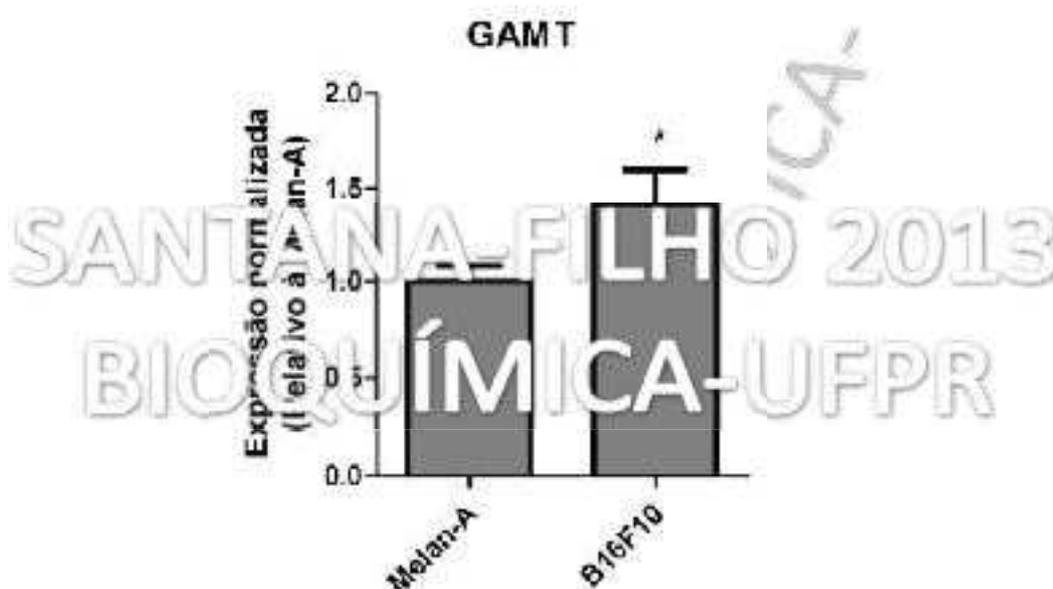


Figura 24. Níveis de expressão da enzima GAMT (guanidinoacetato-metiltransferase) nas linhagens murinas Melan-a e B16-F10.

#### 5.2.5 Efeito do PMA no padrão de expressão lipídica das linhagens de melanócitos

A adição ao meio de cultura de agentes mitogênicos, como ésteres de forbol, visando estimular o crescimento de melanócitos é uma prática comum em cultivo celular. Esses compostos, porém, podem levar a alterações fenotípicas e morfológicas indicadoras de processos transformantes (CHAO-HSING e HSIN-SU, 1991). As alterações provocadas pelo PMA no metabolismo de linhagens de melanócitos não apenas influenciam na proliferação, mas também parecem aumentar a expressão de alguns genes relacionados a processos de progressão e ao mesmo tempo diminuir marcadores de diferenciação (KRASAGAKIS *et al.*, 1993). Com o objetivo de verificar se a adição do éster de forbol PMA ao meio de crescimento da linhagem de melanócitos Melan-a poderia influenciar no padrão de discriminação obtido a partir da análise de RMN de  $^1\text{H}$  do extrato lipídico, foi realizado o

cultivo da linhagem Melan-a em três condições diferentes. Estas foram: 1) com PMA adicionado ao meio durante todo o período de cultivo (MA), 2) com a linhagem Melan-a cultivada em meio sem PMA durante 24 horas (MA-24), e 3) em que a linhagem Melan-a foi cultivado durante 72 h sem PMA no meio (MA-72). Para efeitos de comparação, também incluímos nesta análise um cultivo da linhagem B16-F10. As análises de RMN de  $^1\text{H}$  e análises de componentes principais foram realizadas nos extratos lipídicos das células (Figura 25 e Tabela 11).

O primeiro componente principal explicou 67% da variância, mostrando uma boa discriminação entre os quatro conjuntos de dados experimentais. Em PC1, os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  referentes à B16-F10 e à condição MA-72 localizaram-se nos extremos opostos do modelo criado (Figura 25A), e a condição onde a linhagem Melan-a foi cultivada todo o tempo com o agente mitogênico mostrou uma maior semelhança com a linhagem de células B16-F10 do que com a condição MA-24. Os principais sinais que contribuíram na diferenciação foram os relacionados com o colesterol C-18, colesterol C-19, e a região correspondente à insaturações de ácidos graxos C18:1 (Figura 25 B e C).

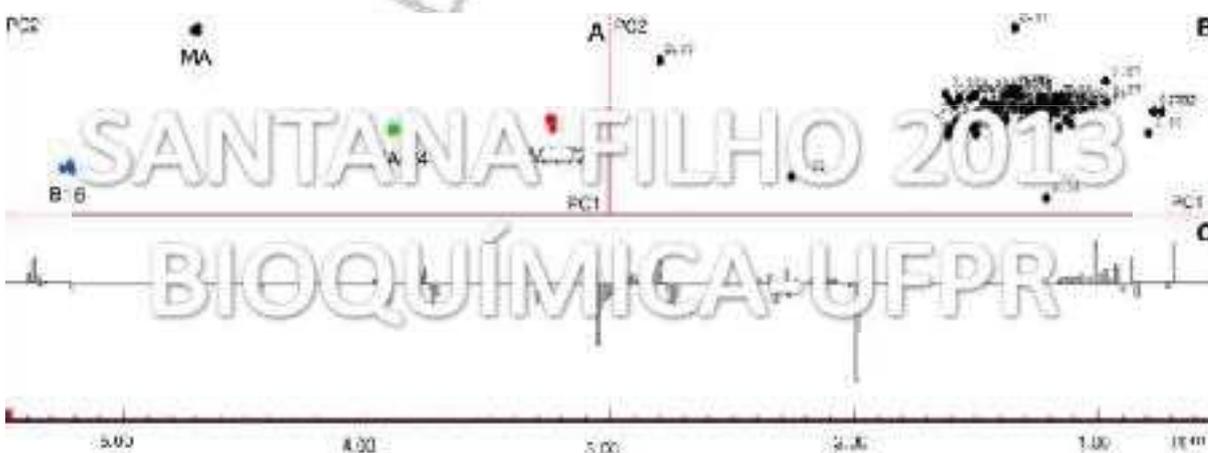


Figura 25. *Scores plot* (A) da análise de PCA realizada com os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  obtidos dos extratos lipídicos das linhagens murinas Melan-a (3 diferentes condições de cultivo) e B16-F10, (B) *Loadings plot*, (C) *1D Loadings plot*.

Tabela 11. Deslocamentos químicos e respectivas contribuições na discriminação dos compostos presentes nos extratos lipídicos das linhagens murinas Melan-a (cultivada com e sem PMA no meio) e B16-F10<sup>a</sup>.

Classe lipídica/metabólito	$\delta$ (ppm), <sup>1</sup> H	Contribuição para discriminação em PC1 (unidades arbitrárias)
<b>Chol-C18</b>	0,698	+++
<b>-CH=CH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub></b>	0,976	+
<b>Chol-Cl<sup>1</sup></b>	1,011	++
<b>-CH=CH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub></b>	2,112	+++
<b>For: R-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>-</b>	2,333	+
<b>-CH=CH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub> (1<sup>o</sup>)</b>	2,743	++
<b>-CH=CH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub> (2<sup>o</sup>)</b>	2,816	++
<b>Creatina</b>	3,040	++
<b>Creatinina</b>	3,054	++++
<b>DG-C3</b>	3,734	+
<b>Creatina</b>	3,816	+
<b>Creatinina</b>	3,914	++
<b>PUFA/MUFA</b>	5,361	++

<sup>a</sup>- Os deslocamentos químicos estão referenciados ao padrão interno TMS ( $\delta = 0$  ppm).

A influência do PMA sobre o perfil lipídico da linhagem Melan-a parece influenciar outros alvos (Tabela 11) do que aqueles que contribuem para diferenciar esta linhagem da linhagem tumorigênica (B16-F10, Tabela 9). Sendo assim, pode-se concluir que a análise de componentes principais realizada com os espectros de RMN de <sup>1</sup>H foi capaz de discriminar entre as linhagens e apontar as moléculas que mais influenciam a separação, mesmo que esteja presente a influência do PMA. No segundo PC, que explica 18% da variância restante, somente a condição onde linhagem Melan-a foi cultivada em tempo integral com PMA foi discriminada das outras.

### 5.2.6. Discussão

Os espectros de RMN de <sup>1</sup>H realizados nos extratos lipídicos obtidos das linhagens murinas B16-F10 e Melan-a mostraram-se muito semelhantes, embora as duas linhagens

apresentem comportamentos diferentes, principalmente relacionadas com as características de crescimento, capacidade de invasão e potencial carcinogênico. Devido a estas semelhanças, os resultados obtidos na análise de PCA tornam-se ainda mais importantes, pois esta metodologia de análise possibilitou o assinalamento das diferentes classes de lipídeos presentes nos extratos, proporcionando uma comparação confiável entre estes metabólitos e explicitando a contribuição quantitativa destes na discriminação entre as duas linhagens.

Além disso, o principal contribuinte entre as classes de lipídeos que influenciou na diferenciação das linhagens foi atribuído às regiões terminais dos ácidos graxos  $-CH_3$  (tabela 9), o que complementa e ratifica os resultados das análises por GC-MS. Comparações entre perfis de ácidos graxos de linhagens normais e tumorigênicas não são comuns na literatura, particularmente em melanoma. Caracterizações do conteúdo total de ácidos graxos em linhagens de melanoma murino B16-F10 já foram estudadas, sendo que, a exemplo do que foi revelado neste trabalho, houve predominância dos ácidos graxos C16, C18:1 e C18 (ANDO *et al.*, 2006). As quantidades diferentes encontradas na linhagem B16-F10 e Melan-a em relação aos ácidos graxos C14 e C16 estão coerentes com o que ocorreu no estudo de Schroeder *et al.* (SCHROEDER e GARDINER, 1984b). Eles encontraram um aumento destes ácidos graxos (15%) entre as linhagens de células B16-F1 e B16-F10 (B16-F1 e B16-F10 são linhagens que foram desenvolvidas utilizando o procedimento seletivo de Fidler a partir da linhagem B16-F0, onde a estirpe F10 passou 10 vezes através do processo seletivo), embora neste estudo apenas ácidos graxos presentes em fosfolipídeos tenham sido submetidos à análise. Também foi verificado que nenhum ácido graxo com comprimento de cadeia de carbono maior que C20 foi detectado. Ácidos graxos com um número ímpar de átomos de carbono em células de origem murina são relatados (SCHROEDER e GARDINER, 1984b), bem como o seu aumento em linhagens de células com um maior potencial metastático. O aumento de proporção encontrado para o ácido palmítico (C16) na linhagem B16-F10 em

comparação com a linhagem Melan-a pode indicar o envolvimento de enzimas da classe de ácido-graxo sintases (*fatty acid synthase* - FASN). Estas enzimas são as principais responsáveis pela síntese de ácidos graxos de cadeia longa, particularmente o ácido palmítico (DI VIZIO *et al.*, 2008), e o aumento de sua expressão está relacionado a processos de independência de adesão e migração na tumorigênese do melanoma e câncer de próstata (FELICETTI *et al.*, 2009). Assim, o aumento na proporção de palmitato relatado neste estudo pode estar envolvido ao aumento dos níveis de FASN.

O uso de agentes mitogênicos é bastante difundido em estudos com linhagens celulares, tanto de origem humana como murina, como a linhagem Melan-a. Stranzl *et al.* (STRANZL *et al.*, 1997) estudaram os efeitos do PMA em duas linhagens de células de câncer de mama hormônio sensíveis (ER+) e hormônio insensíveis (ER-). Estes autores mostraram que quando o PMA foi adicionado ao meio de cultura, as células ER+ apresentaram um aumento significativo de mRNA que codificava para receptores de lipoproteínas de baixa densidade (LDL-R mRNA), sugerindo que a PKC influencia na entrega de colesterol exógeno para as células cancerígenas, através da regulação dos níveis de LDL-R mRNA. No presente trabalho, observou-se que por meio de técnicas de análise multivariada, o lipidoma obtido da linhagem B16-F10 mostrou-se mais semelhante ao da linhagem Melan-a, quando esta última foi cultivada em tempo integral com PMA no meio de crescimento, em concentração de 200 nM, sendo que os principais sinais que influenciaram na discriminação foram referentes aos níveis de ácidos graxos insaturados, bem como para deslocamentos químicos atribuídos a moléculas de colesterol. Assim, pode-se hipotetizar uma função semelhante, onde o PMA estaria exercendo uma função análoga à do DAG ativando PKC (LIU *et al.*, 1995), que por sua vez regula os níveis de colesterol. A análise da linhagem Melan-a na presença e na ausência de PMA no meio de cultivo demonstrou que a utilização deste agente promotor de tumor pode influenciar significativamente o metabolismo lipídico,

mostrando uma maior semelhança com o perfil lipídico de linhagens de células altamente proliferativas. Os resultados demonstram que mesmo o extrato lipídico obtido a partir da linhagem de células Melan-a cultivada em tempo integral com PMA no meio de cultivo pôde ser discriminado do extrato lipídico obtido da linhagem B16-F10 pela análise de PCA realizada com os espectros de RMN de  $^1\text{H}$ . Aquisição da independência de fatores de crescimento é um dos principais requisitos do processo de transformação neoplásica, mas a evolução para um estágio de completa malignidade inclui múltiplos passos, como a perda de controle de proliferação e de crescimento celular, resistência a apoptose, e o desenvolvimento de um sistema vascular de suporte (HANAHAN e WEINBERG, 2000a). Sendo assim, quando esta linhagem celular for utilizada como uma condição de controle nos experimentos, a adição de PMA ou outros agentes mitogênicos ao meio de cultura deve ser realizada de maneira criteriosa.

Outro resultado importante deste trabalho refere-se às proporções de creatina/creatinina encontradas nos extratos lipídicos das linhagens B16-F10 e Melan-a. Pela integração das regiões dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  correspondente a estes metabólitos, verificou-se que os seus níveis estavam pelo menos duas vezes mais elevadas na linhagem B16-F10 em comparação com a linhagem Melan-a. Embora estudos anteriores tenham relatado a presença destes metabólitos em algumas linhagens de células tumorigênicas (BAYET-ROBERT *et al.*, 2010; BERA *et al.*, 2008; TRIBA *et al.*, 2010) e fluídos corporais (ENGELKE *et al.*, 2009), para nosso conhecimento, a sua presença não foi observada em extratos lipídicos de linhagens celulares de mamíferos. A creatina tem uma característica de *zwitterion* em pH fisiológico, podendo assim desempenhar um papel na estabilização das membranas celulares (SHAROV *et al.*, 1987). Conseqüentemente, isto poderia explicar a sua fraca solubilidade em água, o que favorece a sua dissolução nos solventes usados para a extração lipídica e análise de RMN. Também foram encontradas outras moléculas de baixo

peso molecular que apresentaram concentrações alteradas entre as duas linhagens de células quando analisamos um extrato hidrofílico através de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 23 e Tabela 10), porém, mesmo quando aplicado um método de extração aquosa nas linhagens celulares, o metabólito que foi encontrado em maior intensidade nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e com a concentração significativamente alterada entre as linhagens foi novamente a creatina. Isto nos leva à hipótese de que esta característica incomum em relação à solubilidade foi influenciada pela alta concentração deste metabólito resultante de alterações na via biossintética de creatina, como foi demonstrado pelo ensaio de expressão gênica realizado.

Para ambas as linhagens, os níveis de creatinina foram mais elevados quando comparados com os de creatina, uma vez que a creatina é convertida em creatinina através de um processo que é, em sua maior parte, espontâneo e não enzimático (WYSS e KADDURAH-DAOUK, 2000).

A maior proporção de creatina/creatinina na linhagem B16-F10 em relação à linhagem Melan-a pode ser influenciada por vários fatores. O mais provável é que a concentração destes metabólitos esteja relacionada com o elevado fluxo metabólico em linhagens de células tumorigênicas, desempenhando assim um papel nos processos envolvidos com a geração e armazenamento de energia (NASRALLAH, FEKI e KAABACHI, 2010). Creatina-quinase e citrato-sintase têm suas atividades aumentadas quando as células estão com déficit de creatina tecidual (O'GUERMAN *et al.*, 1996). A creatina está envolvida na via de síntese de ATP através de seu derivado fosfocreatina. A creatina e fosfocreatina também estão envolvidas na translocação de ATP da membrana mitocondrial interna para o citosol, atuando como uma lançadeira de energia entre as organelas (BESSMAN e CARPENTER, 1985). A superexpressão de mRNA codificando para GAMT nas células da linhagem B16-F10, em comparação com os níveis observados de GAMT na linhagem Melan-a confirma alterações na

via de síntese bioquímica deste metabólito em células de melanoma, corroborando a afirmação acima citada de que a linhagem de células B16-F10 possuem um fluxo metabólico mais elevado do que a linhagem não tumorigênica. As diferenças quanto às quantidades de creatina/creatinina encontradas neste estudo demonstram como metodologias de diagnóstico podem ser desenvolvidas, com base em análises em escala de laboratório utilizando técnicas de RMN, visando encontrar proteínas e vias alteradas nas linhagens de melanoma e posteriormente investigar se a avaliação destas alterações pode ser utilizada na rotina clínica. Alterações na via de creatina foram observadas em outros processos carcinogênicos, como em pulmão (GAZDAR *et al.*, 1981), fígado (MEFFERT *et al.*, 2005) e intestino (JOSEPH, CARDESA e CARRERAS, 1997), embora o aumento ou a diminuição quantitativa deste metabólito aparentemente se mostre específico a cada tecido, órgão e tipo celular (IDE *et al.*, 2010). A implementação de técnicas de RMN de  $^1\text{H}$  combinadas com análises quimiométricas, como as aqui desenvolvidas, em amostras de tecidos provenientes de carcinomas de origem clínica, pode confirmar e realçar outras moléculas que possam desempenhar um papel de biomarcadores. Estas informações poderão então auxiliar em diagnósticos envolvendo técnicas de ressonância de imagem (MRI), como as que utilizam sistemas  $\mu\text{NMR}$  (GHAZANI *et al.*, 2012), fornecendo informações clínicas adicionais, visando à detecção e prevenção precoce do melanoma e outras neoplasias.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho, técnicas analíticas foram aplicadas visando caracterizar e comparar o lipidoma de linhagens de melanoma humano representantes de diferentes estágios de carcinogenicidade e de linhagens murinas de melanócitos e melanoma. A aplicação das técnicas de derivatização, análise por GC-MS, RMN e análise multivariada nos extratos lipídicos e aquosos obtidos das linhagens permitiu identificar vias metabólicas alteradas tanto nas linhagens humanas como nas linhagens de origem murina.

Na primeira parte deste estudo, linhagens de melanoma humano representando os 3 principais estágios do desenvolvimento deste tipo de câncer tiveram o seu lipidoma estudado e comparado utilizando técnicas modernas de GC-MS e RMN. A aplicação de técnicas de análise de componentes principais nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  obtidos demonstrou que há uma relação, nestas 3 linhagens, entre o aumento da potencial tumorigênico e a quantidade de fosfatidilinositol presente nos extratos lipídicos. As análises de GC-MS e RMN 2D forneceram informações complementares que possibilitaram a caracterização da composição de ácidos graxos das linhagens e identificação da quase totalidade das classes lipídicas. Embora distúrbios envolvendo fosfoinositídeos em geral apontem para alterações em vias de sinalização intracelular (MICHELL, 2008), devido à enorme diferença da quantidade de inositol entre a linhagem RGP e a linhagem MET acredita-se que estes fosfoinositídeos estejam participando da formação de estruturas. A análise de outras linhagens de melanoma humano da série WM, juntamente com linhagens de melanócitos humanos podem confirmar esta hipótese e fornecer indicações para o planejamento de experimentos envolvendo inibidores específicos de vias de síntese, sinalização e degradação de fosfoinositídeos.

Na segunda parte desta tese, linhagens murinas de melanócitos e de melanoma foram cultivadas e tiveram seu extrato lipídico analisado. Pela aplicação das técnicas de derivatização e GC-MS desenvolvidas foi possível assinalar os principais contribuintes entre todas as classes de compostos presentes no extrato lipídico, mesmo aqueles com pequenas variações, entre as duas linhagens celulares. Com o auxílio de análises de RMN 2D e dados da literatura foi possível assinalar com precisão a maioria dos sinais presentes no espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , e submeter estes dados à análise de PCA, proporcionando assim uma ferramenta útil para identificar e mensurar as diferentes classes lipídicas. Potenciais biomarcadores encontrados nos extratos lipídicos das linhagens foram apontados pela análise de PCA dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ : regiões de deslocamento químico pertencentes à ácidos graxos e colesterol ( $-\text{CH}_3$ ) e os metabólitos de baixo peso molecular creatina e creatinina. Análises de expressão gênica revelaram que a via bioquímica de síntese deste metabólito de baixo peso molecular está significativamente alterada entre as linhagens, estando mais ativa na linhagem de melanoma analisada. Outro resultado importante relacionou a influência da adição de agentes mitogênicos ao meio de cultivo da linhagem de melanócitos Melan-a. Foi revelado que o lipidoma obtido das células submetidas ao crescimento com e sem PMA no meio de cultura por diferentes períodos demonstrou alterações, embora a adição deste agente promotor de tumor não tenham prejudicado a diferenciação das linhagens, sugerindo que a sua adição deve ser realizada de maneira criteriosa quando células de melanócitos são utilizadas como controle em estudos de caracterização metabólica.

Apresentamos neste trabalho, pela primeira vez, que um perfil lipidômico de linhagens de melanoma e melanócitos pode ser caracterizado e comparado com o uso de técnicas modernas de GC-MS e RMN, revelando metabólitos que permitiram a identificação de alterações em vias bioquímicas nas linhagens.

## 7. CONCLUSÕES

### 7.1. Análise do lipidoma das linhagens de melanoma humano.

Neste trabalho, linhagens de melanoma humano representando os 3 estágios de desenvolvimento do tumor foram cultivadas e tiveram seu extrato lipídico analisado. Os resultados revelaram que:

- As linhagens celulares escolhidas como representantes dos 3 estágios de desenvolvimento de tumor apresentaram diferenças na relação peso/volume celular, porém foi possível estabelecer uma quantidade padrão que possibilitasse a realização das análises por GC-MS e RMN.
- As reações de derivatização otimizadas permitiram a análise tanto da composição de ácidos graxos quanto de compostos polares associados presentes nos extratos lipídicos das linhagens.
- A principal diferença encontrada nas análises por GC-MS está relacionada à quantidade de inositol presente nas 3 linhagens, que mostrou um aumento bastante significativo, acompanhando a capacidade tumorigênica das linhagens.
- As análises de RMN de  $^1\text{H}$  mostraram espectros muito semelhantes, o que nos levou à utilizar métodos de análise multivariada que auxiliassem a identificação dos principais deslocamentos químicos presentes no espectro que influenciassem na discriminação das 3 linhagens. Estes estavam relacionados à região de deslocamento de grupamentos terminais ( $-\text{CH}_3$ ) de ácidos graxos, grupamentos  $-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$  da colina e deslocamentos característicos de moléculas de inosítois fosforilados.
- Visando correlacionar estes deslocamentos com moléculas de fosfatidilinositol, foram realizados análises adicionais de RMN, que confirmaram a identidade deste composto,

podendo então correlacionar o inositol encontrado nas análises de GC-MS às moléculas de fosfatidilinositol identificadas nas análises de RMN.

- Foi possível demonstrar que, através de análises lipidômicas, perfis metabólicos de linhagens de células de melanoma podem ser caracterizados, por meio de mais de uma técnica analítica, o que aumenta a possibilidade de identificar com precisão as moléculas das vias bioquímicas que apresentem alterações significativas de concentração, permitindo a investigação das vias metabólicas que estejam relacionadas à evolução de processos carcinogênicos, abrindo a possibilidade de estudos da ação de compostos que atuem inibindo etapas específicas destas vias, e do efeito destes inibidores nos perfis metabólicos destas linhagens.

## **7.2. Análise comparativa do lipidoma das linhagens de origem murina Melan-a e B16-F10**

Uma discriminação eficaz entre células de melanócitos imortalizados e células de melanoma foi concretizada, empregando uma combinação de técnicas de GC-MS e técnicas de RMN de  $^1\text{H}$ . Foi possível cultivar, extrair e identificar ácidos graxos saturados e insaturados, fosfolipídeos, esteróides, enfim, a quase totalidade de classes lipídicas presentes no extrato de duas linhagens murinas, Melan-a e B16-F10. Os experimentos revelaram que:

- O uso de solventes deuterados na etapa de derivatização permitiu a análise simultânea dos dois extratos por GC-MS, porém essa metodologia prejudicou a análise de ácidos graxos insaturados. Mesmo assim, foi possível quantificar os ácidos graxos presentes nos extratos das células, sendo que as linhagens divergiram principalmente em relação à proporção de ácidos graxos C14, C16 e C18:1.

- Os resultados obtidos nas análises de GC-MS foram complementados com os obtidos por RMN de  $^1\text{H}$  e correlacionados pelo uso de técnicas de análise multivariada. A técnica de análise de componentes principais foi extremamente útil para se determinar os componentes presentes no extrato que mais contribuíram para a separação das linhagens. Por meio destes dados foi possível identificar e quantificar o principal metabólito que estava presente em diferentes proporção nas linhagens. Surpreendentemente, este metabólito não pertencia à nenhuma classe lipídica, e foi identificado por meio da combinação de experimentos de RMN 2D homo e heteronucleares como creatina/creatinina.
- O fato de esta molécula de baixo peso molecular e com propriedades polares estar presente nos extratos lipídicos das linhagens, e em maior proporção na linhagem tumorigênica, levou a hipótese de que algum desequilíbrio estaria ocorrendo na via metabólica de síntese deste composto, hipótese esta que foi confirmada pela avaliação do nível de expressão da enzima GAMT, responsável pela catálise do passo final na via de síntese de creatina.
- Os experimentos envolvendo o cultivo da linhagem de melanócito sem e com a adição de PMA ao meio de cultivo revelaram que o uso de agentes mitogênicos, tais como ésteres de forbol, pode influenciar acentuadamente o lipidoma desta linhagem celular, assemelhando-se ao perfil de linhagens celulares mais proliferativas.

## 8. PERSPECTIVAS FUTURAS

Este foi um trabalho pioneiro, que empreendeu a união de técnicas analíticas buscando a sua aplicação na caracterização do lipidoma obtido de linhagens de células de melanoma de origem humana e murina e uma linhagem de melanócitos de origem murina. Os resultados promissores abrem possibilidades para a continuação dos estudos, como sugestão de experimentos, podemos citar:

- Cultivo de outras linhagens de melanoma humano da série WM, visando extrair e caracterizar comparativamente o lipidoma destas linhagens e revelar metabólitos que possuam relação com o desenvolvimento do processo tumorigênico presente em linhagens não relacionadas, buscando a elucidação das vias metabólicas alteradas e possíveis candidatos a biomarcadores.
- Cultivo de linhagens de melanócitos humanos, objetivando a comparação do lipidoma destas linhagens com as linhagens de melanoma.
- Experimentos com inibidores das vias bioquímicas relacionadas ao metabolismo de fosfatidilinositol nas 3 linhagens humanas analisadas neste trabalho, buscando elucidar a relação entre aumento do potencial tumorigênico e aumento da quantidade de fosfoinosítídeos nessas linhagens.
- Análises de expressão a *Western Blot* de proteínas hipotetizadas como tendo a sua expressão alterada entre as linhagens, como FASN.
- Análises de linhagens de melanócitos com e sem a adição de agentes mitogênicos, como o PMA, buscando caracterizar o papel da proteína quinase C e outros alvos destes promotores de proliferação nas modificações encontradas no lipidoma obtido das linhagens.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADOSRAKU, R. K. *et al.* NMR lipid profiles of cells, tissues, and body fluids: proton NMR analysis of human erythrocyte lipids. **J Lipid Res**, v. 35, n. 11, p. 1925-1931, Nov 1994.
- ANDO, H. *et al.* Intracellular composition of fatty acid affects the processing and function of tyrosinase through the ubiquitin-proteasome pathway. **Biochem J**, v. 394, n. Pt 1, p. 43-50, Feb 2006.
- ATCC. American Type Culture Collection. 2013. Disponível em: <<http://www.atcc.org/>>. Acesso em: 16/02/2013.
- BAYET-ROBERT, M. *et al.* Quantitative two-dimensional HRMAS <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy-based metabolite profiling of human cancer cell lines and response to chemotherapy. **Magn Reson Med**, v. 63, n. 5, p. 1172-1183, May 2010.
- BECKONERT, O. *et al.* High-resolution magic-angle-spinning NMR spectroscopy for metabolic profiling of intact tissues. **Nat Protoc**, v. 5, n. 6, p. 1019-1032, 2010.
- BENNETT, D. C., COOPER, P. J., HART, I. R. A line of non-tumorigenic mouse melanocytes, syngeneic with the B16 melanoma and requiring a tumour promoter for growth. **Int J Cancer**, v. 39, n. 3, p. 414-418, Mar 1987.
- BERA, S. *et al.* Enzymes of creatine biosynthesis, arginine and methionine metabolism in normal and malignant cells. **FEBS J**, v. 275, n. 23, p. 5899-5909, Dec 2008.
- BESSMAN, S. P., CARPENTER, C. L. The creatine-creatine phosphate energy shuttle. **Annu Rev Biochem**, v. 54, p. 831-862, 1985.
- BROOKS, G. *et al.* Growth of melanocytic cells is associated with down-regulation of protein kinase C alpha, delta, and epsilon isoforms. Possible role of diacylglycerol. **J Biol Chem**, v. 268, n. 32, p. 23868-75, Nov 1993.
- BUNNEY, T. D., KATAN, M. Phosphoinositide signalling in cancer: beyond PI3K and PTEN. **Nat Rev Cancer**, v. 10, n. 5, p. 342-52, May 2010.
- CABRINI, L. *et al.* Extraction of lipids and lipophilic antioxidants from fish tissues: a comparison among different methods. **Comp Biochem Physiol B**, v. 101, n. 3, p. 383-386, Mar 1992.
- CALORINI, L. *et al.* Lipid composition of cultured B16 melanoma cell variants with different lung-colonizing potential. **Lipids**, v. 22, n. 9, p. 651-6, Sep 1987.
- CANSELL, M. *et al.* Lipid composition of cultured endothelial cells in relation to their growth. **Lipids**, v. 32, n. 1, p. 39-44, Jan 1997.
- CASU, M. *et al.* NMR lipid profiles of cells, tissues and body fluids. **Magn Reson Chem**, v. 29, p. 594-602, 1991.

- CASU, M. *et al.* One- and two-dimensional <sup>1</sup>H-NMR analysis of lipids extracted from erythrocytes and plasma of humans. **Arch Gerontol Geriatr**, v. 15 Suppl 1, p. 111-21, 1992.
- CELEBI, J. T. *et al.* Identification of PTEN mutations in metastatic melanoma specimens. **J Med Genet**, v. 37, n. 9, p. 653-7, Sep 2000.
- CHAO-HSING, K. A., HSIN-SU, Y. U. A study of the effects of phorbol 12-myristate-13-acetate on cell differentiation of pure human melanocytes in vitro. **Arch Dermatol Res**, v. 283, n. 2, p. 119-124, 1991.
- CHOI, G. T., CASU, M., GIBBONS, W. A. N.m.r. lipid profiles of cells, tissues and body fluids. Neutral, non-acidic and acidic phospholipid analysis of Bond Elut chromatographic fractions. **Biochem J**, v. 290 ( Pt 3), p. 717-721, Mar 1993.
- CLARK, J. *et al.* Quantification of PtdInsP3 molecular species in cells and tissues by mass spectrometry. **Nat Methods**, v. 8, n. 3, p. 267-72, Mar 2011.
- COEN, M. *et al.* Heteronuclear <sup>1</sup>H-<sup>31</sup>P statistical total correlation NMR spectroscopy of intact liver for metabolic biomarker assignment: application to galactosamine-induced hepatotoxicity. **Anal Chem**, v. 79, n. 23, p. 8956-66, Dec 2007.
- COEN, M. *et al.* An integrated metabolomic investigation of acetaminophen toxicity in the mouse using NMR spectroscopy. **Chem Res Toxicol**, v. 16, n. 3, p. 295-303, Mar 2003.
- CULLY, M. *et al.* Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. **Nat Rev Cancer**, v. 6, n. 3, p. 184-92, Mar 2006.
- DAVIS, R. T., SCHIESSLER, R. Vapor pressures of perdeuterobenzene and perdeuterocyclohexane. **J Phys Chem.**, v. 57, p. 966-968, 1973.
- DE SOUZA, L. M. *et al.* Positive and negative tandem mass spectrometric fingerprints of lipids from the halophilic Archaea Haloarcula marismortui. **J Lipid Res**, v. 50, n. 7, p. 1363-73, Jul 2009.
- DENNING, M. F. Specifying protein kinase C functions in melanoma. **Pigment Cell Melanoma Res**, v. 25, n. 4, p. 466-76, Jul 2012.
- DI VIZIO, D. *et al.* Caveolin-1 interacts with a lipid raft-associated population of fatty acid synthase. **Cell Cycle**, v. 7, n. 14, p. 2257-67, Jul 2008.
- DITTMER, J. C., LESTER, R. L. A SIMPLE, SPECIFIC SPRAY FOR THE DETECTION OF PHOSPHOLIPIDS ON THIN-LAYER CHROMATOGRAMS. **J Lipid Res**, v. 15, p. 126-7, Jan 1964.
- DIXON, J. B. The effect of obesity on health outcomes. **Mol Cell Endocrinol**, v. 316, n. 2, p. 104-8, Mar 25 2010.
- DUMAZ, N. *et al.* In melanoma, RAS mutations are accompanied by switching signaling from BRAF to CRAF and disrupted cyclic AMP signaling. **Cancer Res**, v. 66, n. 19, p. 9483-91, Oct 2006.

- ENGELKE, U. F. *et al.* Guanidinoacetate methyltransferase (GAMT) deficiency diagnosed by proton NMR spectroscopy of body fluids. **NMR Biomed**, v. 22, n. 5, p. 538-544, Jun 2009.
- FALCONER, W. E., CVETANOVIC, R. J. Separation of isotopically substituted hydrocarbons by partition chromatography. **Anal Chem**, v. 34, p. 1064-1066, 1962.
- FELICETTI, F. *et al.* Caveolin-1 tumor-promoting role in human melanoma. **Int J Cancer**, v. 125, n. 7, p. 1514-22, Oct 2009.
- FERNANDIS, A. Z., WENK, M. R. Lipid-based biomarkers for cancer. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 877, n. 26, p. 2830-5, Sep 2009.
- FOLCH, J., LEES, M., SLOANE STANLEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **J Biol Chem**, v. 226, n. 1, p. 497-509, May 1957.
- GAUMANN, T., BONZO, R. Gas-chromatographic retention indexes of deuterated compounds. **Helv Chim Acta**, v. 56, p. 1165-1176, 1973.
- GAWRISCH, K., ELDHO, N. V., POLOZOV, I. V. Novel NMR tools to study structure and dynamics of biomembranes. **Chem Phys Lipids**, v. 116, n. 1-2, p. 135-51, Jun 2002.
- GAZDAR, A. F. *et al.* Levels of creatine kinase and its BB isoenzyme in lung cancer specimens and cultures. **Cancer Res**, v. 41, n. 7, p. 2773-7, Jul 1981.
- GHAZANI, A. A. *et al.* Sensitive and Direct Detection of Circulating Tumor Cells by Multimarker  $\mu$ -Nuclear Magnetic Resonance. **Neoplasia**, v. 14, n. 5, p. 388-95, May 2012.
- GRAY-SCHOPFER, V., WELLBROCK, C., MARAIS, R. Melanoma biology and new targeted therapy. **Nature**, v. 445, n. 7130, p. 851-7, Feb 2007.
- GRAY-SCHOPFER, V. C. *et al.* Cellular senescence in naevi and immortalisation in melanoma: a role for p16? **Br J Cancer**, v. 95, n. 4, p. 496-505, Aug 2006.
- GRINER, E. M., KAZANIETZ, M. G. Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 7, n. 4, p. 281-94, Apr 2007.
- GROSS, R. W., HAN, X. L. Lipidomics at the interface of Structure and Function in Systems Biology. **Chemistry & Biology**, v. 18, n. 3, p. 284-291, Mar 25 2011.
- HAKOMORI, S. Aberrant glycosylation in cancer cell membranes as focused on glycolipids: overview and perspectives. **Cancer Res**, v. 45, n. 6, p. 2405-14, Jun 1985.
- HAN, X., GROSS, R. W. Global analyses of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples by ESI mass spectrometry: a bridge to lipidomics. **J Lipid Res**, v. 44, n. 6, p. 1071-9, Jun 2003.

- HAN, X., GROSS, R. W. Shotgun lipidomics: electrospray ionization mass spectrometric analysis and quantitation of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples. **Mass Spectrom Rev**, v. 24, n. 3, p. 367-412, 2005 May-Jun 2005.
- HANAHAHAN, D., WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, p. 57-70, 2000a.
- HANAHAHAN, D., WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, Jan 2000b.
- HANAHAHAN, D., WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-74, Mar 2011.
- HAQQ, C. *et al.* The gene expression signatures of melanoma progression. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 17, p. 6092-7, Apr 2005.
- HERLYN, M. Human melanoma: development and progression. **Cancer Metastasis Rev**, v. 9, n. 2, p. 101-12, Sep 1990.
- HOLLANDER, M. C., BLUMENTHAL, G. M., DENNIS, P. A. PTEN loss in the continuum of common cancers, rare syndromes and mouse models. **Nat Rev Cancer**, v. 11, n. 4, p. 289-301, Apr 2011.
- IDE, T. *et al.* GAMT joins the p53 network: branching into metabolism. **Cell Cycle**, v. 9, n. 9, p. 1706-10, May 2010.
- JOSEPH, J., CARDESA, A., CARRERAS, J. Creatine kinase activity and isoenzymes in lung, colon and liver carcinomas. **Br J Cancer**, v. 76, n. 5, p. 600-5, 1997.
- KASHANI-SABET, M. *et al.* A multi-marker assay to distinguish malignant melanomas from benign nevi. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 15, p. 6268-72, Apr 2009.
- KOLTER, T. Lipids and lipidomics. **Angew Chem Int Ed Engl**, v. 45, n. 36, p. 5910-1, Sep 2006.
- KRASAGAKIS, K. *et al.* 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate not only modulates proliferation rates, but also alters antigen expression and LAK-cell susceptibility of normal human melanocytes in vitro. **J Invest Dermatol**, v. 100, n. 5, p. 653-659, May 1993.
- KUDO, Y. *et al.* Altered composition of fatty acids exacerbates hepatotumorigenesis during activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. **J Hepatol**, v. 55, n. 6, p. 1400-8, Dec 2011.
- LE MOYEC, L. *et al.* - Magnetic resonance spectroscopy of cellular lipid extracts from sensitive, resistant and reverting K562 cells and flow cytometry for investigating the P-glycoprotein function in resistance reversion. v. - 13, n. - 2, p. - 101, 2000.
- LIN, J. H. *et al.* Ethyl acetate/ethyl alcohol mixtures as an alternative to folch reagent for extracting animal lipids. **J Agric Food Chem**, v. 52, n. 16, p. 4984-4986, Aug 2004.

LIPSKY, S. R., LANDOWNE, R. A. Gas chromatography--biochemical applications. **Annu Rev Biochem**, v. 29, p. 649-68, 1960.

LIU, B. *et al.* 12(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid and 13(S)-hydroxyoctadecadienoic acid regulation of protein kinase C- $\alpha$  in melanoma cells: role of receptor-mediated hydrolysis of inositol phospholipids. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 92, n. 20, p. 9323-9327, Sep 1995.

LLIGONA TRULLA, L. *et al.* Phospholipid composition, phosphoinositide metabolism and metastatic capacity in murine melanoma B16 variants at different stages of growth. **Melanoma Res**, v. 2, n. 4, p. 235-40, Nov 1992a.

LLIGONA TRULLA, L. *et al.* Phospholipid composition, phosphoinositide metabolism and metastatic capacity in murine melanoma B16 variants at different stages of growth. **Melanoma Res**, v. 2, n. 4, p. 235-240, Nov 1992b.

LUTZ, N. W., COZZONE, P. J. Multiparametric optimization of  $(31)\text{P}$  NMR spectroscopic analysis of phospholipids in crude tissue extracts. 1. Chemical shift and signal separation. **Anal Chem**, v. 82, n. 13, p. 5433-40, Jul 2010a.

LUTZ, N. W., COZZONE, P. J. Multiparametric optimization of  $(31)\text{P}$  NMR spectroscopic analysis of phospholipids in crude tissue extracts. 2. Line width and spectral resolution. **Anal Chem**, v. 82, n. 13, p. 5441-6, Jul 2010b.

MAHROUS, E. A., LEE, R. B., LEE, R. E. A rapid approach to lipid profiling of mycobacteria using 2D HSQC NMR maps. **J Lipid Res**, v. 49, n. 2, p. 455-63, Feb 2008.

MANCIANTI, M. L. *et al.* Malignant melanoma simulants arising in congenital melanocytic nevi do not show experimental evidence for a malignant phenotype. **Am J Pathol**, v. 136, n. 4, p. 817-29, Apr 1990.

MARSH, M., HELENIUS, A. Virus entry: open sesame. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 729-40, Feb 2006.

MASTERS, J. W. *et al.* Melanoma: The Wistar Melanoma (WM) Cell Lines *Human Cell Culture*: Springer Netherlands, 2002. p. 259-274. (Human Cell Culture).

MEFFERT, G. *et al.* Elevated creatine kinase activity in primary hepatocellular carcinoma. **BMC Gastroenterol**, v. 5, p. 9, 2005.

MEIER, F. *et al.* Molecular events in melanoma development and progression. **Front Biosci**, v. 3, p. D1005-10, Sep 1998.

MENESES, P., GLONEK, T. High resolution  $31\text{P}$  NMR of extracted phospholipids. **J Lipid Res**, v. 29, n. 5, p. 679-89, May 1988.

MICHELL, R. H. Inositol derivatives: evolution and functions. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 9, n. 2, p. 151-61, Feb 2008.

MILLER, A. J., MIHM, M. C., JR. Melanoma. **N Engl J Med**, v. 355, n. 1, p. 51-65, Jul 6 2006.

MILNE, S. *et al.* Lipidomics: an analysis of cellular lipids by ESI-MS. **Methods**, v. 39, n. 2, p. 92-103, Jun 2006.

MJØS, S. A. The prediction of fatty acid structure from selected ions in electron impact mass spectra of fatty acid methyl esters. **Eur J Lipid Sci Technol**, v. 106, p. 550-560, 2004.

NAKAMURA, K. *et al.* Characterization of mouse melanoma cell lines by their mortal malignancy using an experimental metastatic model. **Life Sci**, v. 70, n. 7, p. 791-8, Jan 2002.

NAKAYASU, E. S. *et al.* GPIomics: global analysis of glycosylphosphatidylinositol-anchored molecules of *Trypanosoma cruzi*. **Mol Syst Biol**, v. 5, p. 261, 2009.

NASRALLAH, F., FEKI, M., KAABACHI, N. Creatine and creatine deficiency syndromes: biochemical and clinical aspects. **Pediatr Neurol**, v. 42, n. 3, p. 163-171, Mar 2010.

NOMURA, D. K. *et al.* Monoacylglycerol lipase regulates a fatty acid network that promotes cancer pathogenesis. **Cell**, v. 140, n. 1, p. 49-61, Jan 2010.

O'GORMAN, E. *et al.* Differential effect of depletion on the regulation of enzyme activities and on creatine stimulated mitochondrial respiration in the skeletal muscle, heart, and brain. **Biochem Biophys Acta**, v. 1276, p. 161-170, 1996.

OBA-SHINJO, S. M. *et al.* Identification of novel differentially expressed genes in human astrocytomas by cDNA representational difference analysis. **Brain Res Mol Brain Res**, v. 140, n. 1-2, p. 25-33, Oct 2005.

OBA-SHINJO, S. M. *et al.* Melanocyte transformation associated with substrate adhesion impediment. **Neoplasia**, v. 8, n. 3, p. 231-41, Mar 2006.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res**, v. 29, n. 9, p. e45, May 2001.

PISANO, M. *et al.* In vitro activity of the alphavbeta3 integrin antagonist RGDechi-hCit on malignant melanoma cells. **Anticancer Res**, v. 33, n. 3, p. 871-9, Mar 2013.

PLATHOW, C., WEBER, W. A. Tumor cell metabolism imaging. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 49, p. 43s-63s, Jun 2008.

PORTOUKALIAN, J., ZWINGELSTEIN, G., DORÉ, J. F. Lipid composition of human malignant melanoma tumors at various levels of malignant growth. **Eur J Biochem**, v. 94, n. 1, p. 19-23, Feb 1979.

RAMIN, S. L., TOGNOLA, W. A., SPOTTI, A. R. Proton magnetic resonance spectroscopy: clinical applications in patients with brain lesions. **Sao Paulo Med J**, v. 121, n. 6, p. 254-9, Nov 2003.

RETRA, K. *et al.* A simple and universal method for the separation and identification of phospholipid molecular species. **Rapid Commun Mass Spectrom**, v. 22, n. 12, p. 1853-62, Jun 2008.

RHEE, S. G. Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. **Annu Rev Biochem**, v. 70, p. 281-312, 2001.

RUGGIERI, S. *et al.* Lipid characteristics in metastatic cells. **Clin Exp Metastasis**, v. 17, n. 4, p. 271-6, Jun 1999.

SASSAKI, G. L. *et al.* A robust method to quantify low molecular weight contaminants in heparin: detection of tris(2-n-butoxyethyl) phosphate. **Analyst**, v. 136, n. 11, p. 2330-8, Jun 2011.

SASSAKI, G. L. *et al.* Application of acetate derivatives for gas chromatography-mass spectrometry: novel approaches on carbohydrates, lipids and amino acids analysis. **J Chromatogr A**, v. 1208, n. 1-2, p. 215-22, Oct 2008a.

SASSAKI, G. L. *et al.* Application of acetate derivatives for gas chromatography-mass spectrometry: novel approaches on carbohydrates, lipids and amino acids analysis. **J Chromatogr A**, v. 1208, n. 1-2, p. 215-222, Oct 2008b.

SCHROEDER, F., GARDINER, J. M. Membrane lipids and enzymes of cultured high- and low-metastatic B16 melanoma variants. **Cancer Res**, v. 44, n. 8, p. 3262-9, Aug 1984a.

SCHROEDER, F., GARDINER, J. M. Membrane lipids and enzymes of cultured high- and low-metastatic B16 melanoma variants. **Cancer Res**, v. 44, n. 8, p. 3262-3269, Aug 1984b.

SCOTT, M. C. *et al.* Human melanocortin 1 receptor variants, receptor function and melanocyte response to UV radiation. **J Cell Sci**, v. 115, n. Pt 11, p. 2349-55, Jun 2002.

SHAROV, V. G. *et al.* Protection of ischemic myocardium by exogenous phosphocreatine. I. Morphologic and phosphorus 31-nuclear magnetic resonance studies. **J Thorac Cardiovasc Surg**, v. 94, n. 5, p. 749-761, Nov 1987.

SKIPSKI, V. P. Thin-layer chromatography of neutral glycosphingolipids. **Methods Enzymol**, v. 35, p. 396-425, 1975.

SKIPSKI, V. P., SMOLOWE, A. F., BARCLAY, M. Separation of neutral glycosphingolipids and sulfatides by thin-layer chromatography. **J Lipid Res**, v. 8, n. 4, p. 295-9, Jul 1967.

SOUSA, J. F., ESPREAFICO, E. M. Suppression subtractive hybridization profiles of radial growth phase and metastatic melanoma cell lines reveal novel potential targets. **BMC Cancer**, v. 8, p. 19, 2008.

SPECTOR, A. A., YOREK, M. A. Membrane lipid composition and cellular function. **J Lipid Res**, v. 26, n. 9, p. 1015-35, Sep 1985.

SPITALER, M., CANTRELL, D. A. Protein kinase C and beyond. **Nat Immunol**, v. 5, n. 8, p. 785-90, Aug 2004.

STRANZL, A. *et al.* Low-density lipoprotein receptor mRNA in human breast cancer cells: influence by PKC modulators. **Breast Cancer Res Treat**, v. 42, n. 3, p. 195-205, Feb 1997.

SUD, M. *et al.* LMSD: LIPID MAPS structure database. **Nucleic Acids Res**, v. 35, n. Database issue, p. D527-32, Jan 2007.

SVIDERSKAYA, E. V. *et al.* p16/cyclin-dependent kinase inhibitor 2A deficiency in human melanocyte senescence, apoptosis, and immortalization: possible implications for melanoma progression. **J Natl Cancer Inst**, v. 95, n. 10, p. 723-32, May 2003.

THURNHOFER, S., VETTER, W. A gas chromatography/electron ionization-mass spectrometry-selected ion monitoring method for determining the fatty acid pattern in food after formation of fatty acid methyl esters. **J Agric Food Chem**, v. 53, n. 23, p. 8896-8903, Nov 2005.

THURNHOFER, S., VETTER, W. Application of ethyl esters and d3-methyl esters as internal standards for the gas chromatographic quantification of transesterified fatty acid methyl esters in food. **J Agric Food Chem**, v. 54, n. 9, p. 3209-3214, May 2006.

TRIBA, M. N. *et al.* Metabolomic profiling with NMR discriminates between biphosphonate and doxorubicin effects on B16 melanoma cells. **NMR Biomed**, v. 23, n. 9, p. 1009-1016, Nov 2010.

TUCKER, S. C., HONN, K. V. Emerging targets in lipid-based therapy. **Biochem Pharmacol**, v. 85, n. 5, p. 673-88, Mar 1 2013.

TYAGI, R. K. *et al.* Simultaneous extraction of cellular lipids and water-soluble metabolites: evaluation by NMR spectroscopy. **Magn Reson Med**, v. 35, n. 2, p. 194-200, Feb 1996.

VAN MEER, G. *et al.* The European lipidomics initiative: enabling technologies. **Methods Enzymol**, v. 432, p. 213-32, 2007.

VAN MEER, G., VOELKER, D. R., FEIGENSON, G. W. Membrane lipids: where they are and how they behave. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 9, n. 2, p. 112-124, Feb 2008.

VINAYAVEKHIN, N., HOMAN, E. A., SAGHATELIAN, A. Exploring disease through metabolomics. **ACS Chem Biol**, v. 5, n. 1, p. 91-103, Jan 2010.

VIVANCO, I., SAWYERS, C. L. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 2, n. 7, p. 489-501, Jul 2002.

WANG, H. *et al.* (1)H NMR-based metabolic profiling of human rectal cancer tissue. **Mol Cancer**, v. 12, n. 1, p. 121, 2013.

WEINER, L. M., MURRAY, J. C., SHUPTRINE, C. W. Antibody-based immunotherapy of cancer. **Cell**, v. 148, n. 6, p. 1081-4, Mar 2012.

- The Wellcome Trust Functional Genomics Cell Bank: holdings. v. - 23, n. - 1, p. - 150, 2010.

WILLKER, W., LEIBFRITZ, D. Assignment of mono- and polyunsaturated fatty acids in lipids of tissues and body fluids. **Magn Reson Chem**, v. 36, p. 79-84, 1998.

WYSS, M., KADDURAH-DAOUK, R. Creatine and creatinine metabolism. **Physiol Rev**, v. 80, n. 3, p. 1107-1213, Jul 2000.

ZHOU, X. P. *et al.* Epigenetic PTEN silencing in malignant melanomas without PTEN mutation. **Am J Pathol**, v. 157, n. 4, p. 1123-8, Oct 2000.

SANTANA-FILHO 2013 BIOQUÍMICA-  
UFPR

10. ANEXOS

SANTANA-FILHO 2013 BIOQUÍMICA-  
UFPR

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861711010666>

SANTANA-FILHO 2013 BIOQUÍMICA-  
UFPR