

Avaliação das alterações metabólicas de células tumorais de Sarcoma 180 (S180) após tratamento com protótipos antitumorais por RMN HR-MAS de ¹H

Bruno César Barbosa MARTINELLI^{*1}, Gláucia Braz Alcantara¹, Luciano Moraes LIÃO¹, Aline Lima OLIVEIRA¹, Elisângela de Paula SILVEIRA-LACERDA², Flávia de Castro PEREIRA².

¹Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear, Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

²Laboratório de Genética Molecular e Citogenética, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás.

*martinellibcb@gmail.com

Palavras chave: RMN, HR-MAS; METABOLISMO, SARCOMA 180 (S180)

Introdução

Câncer, consoante a definição do Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2011), é um nome empregado a um conjunto de mais de cem doenças que têm em comum o crescimento desordenado (maligno) de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores (acúmulo de células cancerosas) ou neoplasias malignas. Sarcoma é uma neoplasia maligna de ocorrência em ossos e tecidos conjuntivos.

No Brasil, desde 2003, as neoplasias malignas constituem a segunda maior causa de mortes na população, correspondendo em 2007 a 17% dos óbitos conhecidos, notificados no Sistema de Informações sobre Mortalidade - SIM (Ministério da Saúde, 2011). A compreensão e o controle das doenças malignas requerem conhecimentos científicos e experiências que vão desde o conhecimento dos complexos mecanismos de regulação molecular intracelular às escolhas individuais do estilo de vida.

Nesse contexto, a Ressonância Magnética Nuclear destaca-se pela potencialidade de caracterização do metabolismo celular, a qual tem sido empregada nos estudos de câncer por mais de duas décadas (GILLIES & MORSE, 2005).

A RMN é uma técnica capaz de refletir a bioquímica do tecido, podendo, então, obter o perfil metabólico dos tecidos sadios e cancerosos. Diversos estudos na tentativa de compreender as alterações metabólicas de células cancerosas são encontrados na literatura (BARTSCH *et al.*, 1991; PETIBOIS *et al.*, 2007; KIYOHARA *et al.*, 2002).

A partir de 1996, a RMN HR-MAS (High Resolution Magic Angle Spinning) tem despertado diversas aplicações em estudos de tecidos intactos (CHENG *et al.*, 1996) por aliar a vantagem da resolução espectral e possuir alta reprodutibilidade. Ademais, a sua natureza não destrutiva permite que as amostras de tecidos ou células animais sejam diretamente avaliadas por microscopia após a análise espectral, fazendo com que comparações diretas sobre as características morfológicas sejam praticáveis.

Materiais e métodos

Todos os espectros foram realizados em um espectrômetro Bruker Avance III 500 Ultra Shield de 11,75 tesla, provido da sonda HR-MAS de 4 mm com gradiente de campo. Rotores de óxido de zircônio de geometria cilíndrica e cavidade interna semiesférica, com capacidade volumétrica de 50 μ L, foram utilizados como porta-amostras.

A linhagem celular S180, proveniente do American Type Culture Collection - ATCC, Rockville, Maryland, USA, foi adquirida por uma parceria com o Laboratório de Genética Molecular e Citogenética (LGMC), situado no Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Goiás (UFG), onde foram realizados os controles positivos e negativos e enviados para o laboratório de RMN, situado no Instituto de Química (IQ) da UFG para aquisição dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H .

Para a aquisição dos espectros de RMN HR-MAS ^1H dos controles positivos e negativos, foram utilizadas dois tipos diferentes de sequências de pulso: CPPR (composite pulse) e CPMG (Carr-Purcell-Meiboon-Gill), ambas com supressão do sinal da água.

Durante a aquisição dos espectros, as amostras foram submetidas a um giro de 5 KHz, com uma inclinação de $54,7^\circ$ em relação à sonda, denominada ângulo mágico.

Como referência interna (δ 0.00) para os deslocamentos químicos, utilizou-se a solução de trimetilsililpropionato de sódio (TMSP-d4) em água deuterada (D₂O) (0,1% m.v⁻¹).

Para a sequência de pulso CPPR, foram utilizados os seguintes parâmetros: número de varreduras 512, TD de 64K, SI de 64K, janela espectral de 16 ppm e tempo de espera igual a 2.00 segundos.

Para sequência de pulso CPMG, foram utilizados os seguintes parâmetros: número de varreduras de 512, TD de 64K, SI de 64K, janela espectral de 20 ppm, tempo de espera igual a 4.00 segundos, tempo entre o pulso 180° em xy de 1ms e número de ciclos de 128. Todas as análises foram realizadas em triplicatas.

Resultados e discussão

A grande quantidade de água contida nas células implica na necessidade de uma boa supressão do seu sinal. Foram testadas quatro sequências de pulsos distintas com supressão (CPMGpr, zgcprr, cprr e noesy1dpr) para aquisição dos espectros de RMN HR-MAS de ¹H das células do S180. Observou-se que não há sinais de interesse próximo na região de δ 4.8, região da supressão da água. As sequências de pulsos aplicadas resultaram em diferenças significativas do sinal da água. A qualidade da supressão de água residual foi boa e semelhante para ambas as sequências de pulsos CPMGpr e cprr.

Por meio da sequência de pulso CPMG, a remoção de sinais com tempo de relaxação transversal curto foi possível, melhorando a resolução dos picos, principalmente na região dos aromáticos, auxiliando as atribuições.

As atribuições dos sinais nos espectros de RMN HR-MAS ¹H do controle negativo, figura1, foram realizadas com auxílio de experimentos de RMN HR-MAS TOCSY, padrões e confrontadas com dados da literatura.

Foram adquiridos espectros de RMN HR-MAS de ¹H do controle positivo com seis protótipos antitumorais e avaliados em relação controle negativo e foram observadas as seguintes variações metabólicas:

a) Tratamento Au08: δ 2.74, δ 2.73 (não atribuído); δ 1.34, δ 1.33 (lactato); δ 1.93

(acetato); δ 1.48 (alanina)

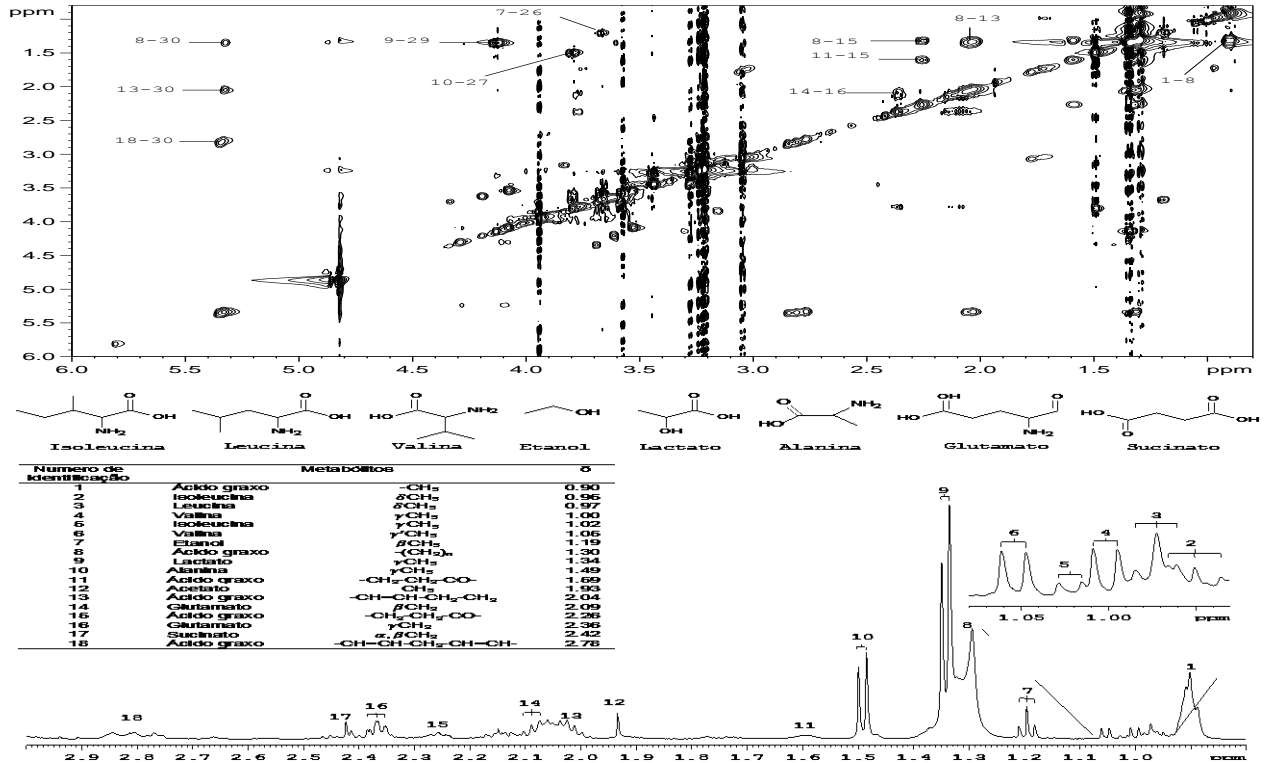
b) Tratamento Au10: δ 2.74, δ 2.73 (não atribuído); δ 1.34, δ 1.33 (lactato);

c) Tratamento Au14: δ 2.74, δ 2.73 (não atribuído); δ 1.34 δ 1.33 (lactato); δ 1.48(alanina).

d) Tratamento Au16: δ 2.74, δ 2.73 (não atribuído); δ 1.34, δ 1.33 (lactato); δ 1.48 (alanina); δ 3.57 (glicina); δ 3.04 (creatina).

e) Tratamento Au18: δ 2.74, δ 2.73 (não atribuído); δ 1.34 δ 1.33 (lactato); δ 3.24 (glicerofosfocolina); δ 3.04(creatina).

f) Tratamento Au21: δ 2.74, δ 2.73 (não atribuído); δ 3.24 (glicerofosfocolina); δ 1.48 (alanina); δ 3.57 (glicina); δ 1.33 (lactato); δ 2.24 (succinato).



Conclusões e perspectivas

A RMN HR-MAS de ¹H aliada à quimiometria mostrou ser uma ferramenta útil na observação de algumas variações metabólicas quando células S180 foram submetidas a tratamento com potenciais substâncias antitumorais, podendo oferecer informações

úteis para um melhor entendimento sobre o mecanismo de ação dos protótipos antitumorais e suas interações com as vias metabólicas.

Desta forma, espera-se que a conclusão deste trabalho possa aliar a interpretação bioquímica com as alterações observadas no item 4.4, auxiliando com uma proposta de mecanismo de inibição ou estagnação de tumores e suas interações com as vias metabólicas.

Pretende-se ainda, analisar o perfil metabólico de células de carcinoma alveolar de pulmão humano e compará-lo com células pulmonares normais, cujos espectros de RMN HR-MAS de ^1H dos tecidos pulmonar sadios já foram adquiridos.

Referências bibliográfica

Bartsch, H.; Petruzzelli S.; de Flora, S.; Hietanen, E.; Camus, A.M.; Castegnaro, M.; Geneste, O.; Camoirano, A.; Saraccu, R.; Giuntin, C. Mutation Research/ Fundamental and Molecular, 250, 103, 1991.

Cheng, L.L.; Lean, C.L.; Bogdanova, A.; Wright Jr., S.C.; Ackerman, J.L.; Brady, T.J.; Garrido, L., Magn. Reson. Med. 36, 653, 1996.

Gillies, R.J.; Morse, D.L. Annu. Rev. Biomed. Eng. 7, 287, 2005

INCA – Instituto Nacional do Câncer, 2011. Disponível em <http://www.inca.gov.br> Acessado em 19/maio/2011.

Kiyohara, C.; Otsu, A.; Shirakawa, T.; Fukuda, S.; Hopkin, J.M. Lung Cancer 37, 241, 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011. Disponível em <http://www.saude.gov.br>. Acessado em 19/maio/2011.

Mountford, C.; Lean, C.; Malycha, P.; Russell, P. Journal of Magnetic Resonance Imaging 24, 459, 2006.

Petibois, C.; Drogat, B.; Bikfalvi, A., Déléris, G.; Moenner, M. FEBS Letters 581, 5469, 2007.

FUNAPE, CAPES, CNPq, e FINEP