



**Universidade de Aveiro** Departamento de Química

Ano 2021

**Inês Margarida  
Cocharro Marques**

**Metabólica da osteogénese de células  
estaminais por GC-MS**



**Inês Margarida  
Cocharro Marques**

**Metabolómica da osteogénese de células  
estaminais por GC-MS**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, ramo de Bioquímica Clínica, realizada sob a orientação científica da Doutora Ana Maria Pissarra Coelho Gil, Professora Associada com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, do Doutor João Filipe Colardelle da Luz Mano, Professor Catedrático do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e da Doutora Mariana Braga de Oliveira, Investigadora Júnior do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

Esta dissertação foi realizada no âmbito do projeto BIOIM-PLANT (PTDC/BTM-ORG/28835/2017) cofinanciado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) através do programa COMPETE2020 e do fundo da União Europeia FEDER (POCI-01-0145-FEDER-028835). Estando também inserida em projetos do CICECO – Instituto de Materiais de Aveiro com as referências UIDB/50011/2020 & UIDP/50011/2020, financiados através de fundos nacionais FCT/MEC e cofinanciados por FEDER sob o PT2020 *Partnership Agreement*.

**o júri**

presidente

Professor Doutor Carlos Pedro Fontes Oliveira

Professor Auxiliar em Regime Laboral, Universidade de Aveiro

Doutora Sónia Andreia Oliveira Santos

Investigadora Doutorada (nível 1), Universidade de Aveiro

Professora Doutora Ana Maria Pissarra Coelho Gil

Professora Associada C/ Agregação, Universidade de Aveiro

**agradecimentos**

Gostaria de agradecer à minha orientadora, a Professora Ana Gil, pelo acompanhamento e dedicação ao longo da realização desta dissertação, deixando aqui também a minha gratidão aos meus coorientadores, a Doutora Mariana Oliveira e o Professor João Mano.

Agradeço o acompanhamento dado pelas minhas colegas do grupo de metabólica, especialmente o da Daniela Bispo, que se mostrou sempre pronta para ajudar.

Relativamente ao grupo de GC-MS, agradeço ao Professor Armando Silvestre e Doutora Sónia Santos pela disponibilidade para ajudar nesta área, deixando aqui o meu especial agradecimento à Doutora Patrícia Ramos pelo incansável apoio e esclarecimento de dúvidas.

Por fim, agradeço o apoio da minha família e amigos.

**Palavras-chave** Regeneração óssea, células estaminais mesenquimais (MSCs), metabóloma, osteogénese, cromatografia gasosa (GC), espectrometria de massa (MS)

**Resumo** A perda massiva ou fraturas extensas de osso estão associadas a graves consequências socioeconómicas e na qualidade de vida destes pacientes, representando ainda hoje grandes desafios clínicos, agravados pelo envelhecimento da população. Em engenharia de tecidos, o recurso a células estaminais (SCs) mesenquimais é uma alternativa menos invasiva do que as atuais abordagens de tratamento de lesões ósseas, frequentemente associadas a complicações pós-operatórias. A metabóloma mostra-se particularmente útil na supervisão do comportamento celular durante a diferenciação de SCs em células do tecido ósseo, tendo grande potencialidade na monitorização e encaminhamento da osteogénese de forma a desenvolver terapias mais eficientes. Os lípidos mostram-se intervenientes essenciais na regulação do comportamento de SCs, sendo precisamente estes o foco da presente dissertação de mestrado. Recorrendo-se a células mesenquimais estaminais provenientes de tecido adiposo humano (hAMSCs), estudou-se a evolução da osteoindução ao longo de 21 dias, a par da cultura de hAMSCs em meio basal (envelhecimento celular). Para isso analisaram-se os extratos intracelulares apolares destas células por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS) aos dias 1, 4, 7, 14 e 21. Alguns metabolitos em destaque na condição osteoindutiva foram o ácido esteárico, ácido palmitoleico, ácido oleico, 1-monomiristina, 1,3-dipalmitina, colesterol, pirofosfato e fosfoetanolamina, visto que estes variaram significativamente apenas em osteoindução e não na condição controlo. Em osteoindução verificou-se o catabolismo geral de glicerolípidos na terceira semana, o aumento mais acentuado (comparativamente à condição controlo) do ácido docosahexaenóico (com propriedades inibidoras da osteoclastogénese e estimuladoras da osteogénese), destacou-se o papel de compostos que contêm fosfato para a mineralização óssea (pirofosfato e fosfoetanolamina) e também o possível papel do ácido oleico como inibidor da apoptose induzida por ácido palmítico, que por sua vez é possível que se esterifique em triacilgliceróis.

**Keywords**

Bone regeneration, mesenchymal stem cells (MSCs), metabolomics, osteogenesis, gas chromatography (GC), mass spectrometry (MS)

**Abstract**

Massive bone loss or extensive fractures are associated with serious socioeconomic and quality of life consequences for these patients, representing, even today, major clinical challenges, aggravated by the aging population. In tissue engineering, the use of mesenchymal stem cells (SCs) is a less invasive alternative to current approaches to the treatment of bone lesions, often associated with postoperative complications. Metabolomics is particularly useful in supervising cellular behavior during the differentiation of SCs into bone tissue cells, having great potential in monitoring and guiding osteogenesis in order to develop more efficient therapies. Lipids are essential players in regulating the behavior of SCs, and these are precisely the focus of this master's thesis. Using mesenchymal stem cells from human adipose tissue (hAMSCs), the evolution of osteoinduction was studied over 21 days, along with the culture of hAMSCs in basal medium (cellular aging). Thus, the nonpolar intracellular extracts of these cells were analyzed by gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS) on days 1, 4, 7, 14 and 21. Some metabolites highlighted in the osteoinductive condition were stearic acid, palmitoleic acid, oleic acid, 1-monomiristin, 1,3-dipalmitin, cholesterol, pyrophosphate and phosphoethanolamine, as these varied significantly only in osteoinduction and not in the control group. In osteoinduction there was a general catabolism of glycerolipids in the third week, a greater increase (compared to the control condition) of docosahexaenoic acid (with osteoclastogenesis inhibiting and osteogenesis stimulating properties), the role of phosphate-containing compounds (pyrophosphate and phosphoethanolamine) was highlighted in the context of bone mineralization and also the possible role of oleic acid was suggested as an inhibitor of apoptosis induced by palmitic acid, which in turn could be esterified in triacylglycerols.

## Abreviaturas e Simbologia

$\mu$	Velocidade da fase móvel ao longo do sistema GC da equação de Van Deemter
A	Difusão de Eddy da equação de Van Deemter
ADA	Do inglês <i>Alginate di-aldehyde</i>
AKT	Do inglês <i>Protein kinase B</i>
ALP	Fosfatase alcalina (do inglês <i>ALkaline Phosphatase</i> )
AMSC	MSC proveniente de tecido adiposo
ANOVA	Análise da variância (do inglês <i>Analysis of variance</i> )
APCI	Ionização química à pressão atmosférica (do inglês <i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i> )
APPI	Fotoionização à pressão atmosférica (do inglês <i>Atmospheric Pressure Photo Ionization</i> )
B	Difusão molecular da equação de Van Deemter
BMMSC	Célula estaminal mesenquimal da medula óssea (do inglês <i>Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell</i> )
BMP	Proteína morfogenética óssea (do inglês <i>Bone morphogenetic protein</i> )
BSTFA	N,O-bistrifluoroacetamida
C	Resistência à transferência de massa da equação de Van Deemter
CB	Recetor canabinóide
CCL2	Ligando 2 da quimiocina com motivo C-C (do inglês <i>Chemokine (C-C motif) ligand 2</i> )
CD105	Endogлина (do inglês <i>Cluster of Differentiation 105</i> )
CD11b	Integrina $\alpha$ M (do inglês <i>Cluster of Differentiation 11b</i> )
CD14	Proteína codificada pelo gene CD14 (do inglês <i>Cluster of Differentiation 14</i> )
CD19	Antígeno de Linfócito B CD19 (do inglês <i>Cluster of Differentiation 19</i> )
CD34	Proteína codificada pelo gene CD34 (do inglês <i>Cluster of Differentiation 34</i> )
CD45	Proteína Tirosina Fosfatase, Tipo Recetor, C (do inglês <i>Cluster of Differentiation 45</i> )
CD73	5'-nucleotidase (do inglês <i>Cluster of Differentiation 73</i> )
CD79 $\alpha$	Cadeia Alfa da Proteína Associada ao Complexo Recetor de Antígenos dos Linfócitos B (do inglês <i>Cluster of Differentiation 79<math>\alpha</math></i> )
CD90	Antígeno 1 de Diferenciação de Timócitos (do inglês <i>Cluster of Differentiation 90</i> )
CI	Ionização química (do inglês <i>Chemical Ionization</i> )
CoA	Coenzima A
CV	Coeficiente de variação (Equação 6)
d	Separação entre dois picos consecutivos do cromatograma
DG	Diacilglicerol

<b>DHA</b>	Ácido docosa-hexaenóico (do inglês <i>Docosahexaenoic acid</i> )
<b>ECD</b>	Detetor de captura de elétrões
<b>EI</b>	Ionização por impacto de elétrões (do inglês <i>Electron Impact Ionization</i> )
<b>EM</b>	Multiplicador de elétrões (do inglês <i>Electron Multiplier</i> )
<b>ERK1/2</b>	Do inglês <i>Extracellular signal-Related Kinase 1/2</i>
<b>ES</b>	Effect size (Equação 7)
<b>ESI</b>	Ionização por eletrospray (do inglês <i>Electrospray Ionization</i> )
<b>FGF-2</b>	Fator de crescimento fibroblástico 2 (do inglês <i>Fibroblast growth factor 2</i> )
<b>FID</b>	Detetor de ionização de chama
<b>FPD</b>	Detetor fotométrico de chama
<b>GC</b>	Cromatografia gasosa (do inglês <i>Gas Chromatography</i> )
<b>GC-MS</b>	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa
<b>GHK</b>	Péptido de glicina-histidina-lisina
<b>hBMMSC</b>	Célula estaminal mesenquiml da medula óssea de humano (do inglês <i>human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell</i> )
<b>hBMMSC</b>	BMMSC de humano
<b>HETP</b>	Altura equivalente a um prato teórico (do inglês <i>Height Equivalent to a Theoretical Plate</i> )
<b>HH</b>	Do inglês <i>HedgeHog</i>
<b>HIF-1<math>\alpha</math></b>	Fator induzível por hipóxia 1 $\alpha$ (do inglês <i>Hypoxia-inducible factor 1-alpha</i> )
<b>HLA-DR</b>	Recetor de Superfície Celular do Complexo Principal de Histocompatibilidade II (do inglês <i>Human Leukocyte Antigen - DR isotype</i> )
<b>hMSC</b>	MSC de humano
<b>HSC</b>	Célula estaminal hematopoiética (do inglês <i>Hematopoietic stem cell</i> )
<b>IB</b>	Corpos de inclusão bacteriana
<b>IC</b>	Intervalo de confiança (Equação 8)
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interleucina 1 $\beta$ (do inglês <i>Interleukin 1 beta</i> )
<b>IL-6</b>	Interleucina 6 (do inglês <i>Interleukin 6</i> )
<b>ILK</b>	Cinase ligada à integrina
<b>iNOS</b>	Do inglês <i>Inducible Nitric Oxide Synthase</i>
<b>iPSC</b>	Célula estaminal pluripotente induzida (do inglês <i>Induced pluripotent stem cell</i> )
<b>JNK</b>	Do inglês <i>c-Jun N-terminal kinase</i>
<b>L</b>	Comprimento da coluna cromatográfica
<b>LC</b>	Cromatografia líquida (do inglês <i>Liquid Chromatography</i> )
<b>LC-MS</b>	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa



<b>LDL</b>	Do inglês <i>Low-Density Lipoprotein</i>
<b>M</b>	Média (Equação 7)
<b>MALDI</b>	Ionização e dessorção a laser assistida por matriz (do inglês <i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization</i> )
<b>MAPK</b>	Cinase proteica ativada por mitógenos (do inglês <i>Mitogen-activated protein kinase</i> )
<b>M-CSF</b>	Fator estimulante de colônias de macrófagos (do inglês <i>Macrophage colony-stimulating factor</i> )
<b>MG</b>	Monoacilglicerol
<b>MMSC</b>	MSC proveniente de tecido muscular
<b>MS</b>	Espectrometria de massa
<b>MSC</b>	Célula estaminal mesenquimal (do inglês <i>Mesenchymal Stem Cell</i> )
<b>mTOR</b>	Do inglês <i>Mammalian target of rapamycin</i>
<b>n</b>	Número de amostras (Equação 7 e Equação 8)
<b>N</b>	Número de pratos teóricos
<b>NAPE</b>	<i>N</i> -Acilfosfatidiletanolamina (do inglês <i>N-AcylPhosphatidylEthanolamine</i> )
<b>NAPE-PLD</b>	Do inglês <i>N-acyl-Phosphatidyl Ethanolamine-specific PhosphoLipase D</i>
<b>NFκB</b>	Do inglês <i>Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
<b>NIST</b>	Do inglês <i>National Institute of Standards and Technology</i>
<b>NPD</b>	Detetor de azoto e fósforo
<b>PCA</b>	Análise de componentes principais (do inglês <i>Principal Component Analysis</i> )
<b>PDGF</b>	Fator de crescimento derivado de plaquetas (do inglês <i>Platelet-derived growth factor</i> )
<b>PI3K</b>	Do inglês <i>Phosphoinositide 3-kinase</i>
<b>PKC</b>	Do inglês <i>Protein Kinase C</i>
<b>PLS-DA</b>	Análise discriminante pelo método de mínimos quadrados parciais (do inglês <i>Partial Least Squares Discriminant Analysis</i> )
<b>PPP</b>	Via das pentose fosfato
<b>PUFA</b>	Ácido gordo polinsaturado (do inglês <i>Polyunsaturated fatty acid</i> )
<b>R</b>	Resolução do cromatograma
<b>RANK</b>	Recetor Ativador do fator Nuclear κ B (do inglês <i>Receptor activator of nuclear factor κ B</i> )
<b>RANKL</b>	Ligando do RANK (do inglês <i>Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand</i> )
<b>RF</b>	Fator de resposta (Equação 5)
<b>RMN</b>	Ressonância magnética nuclear
<b>ROS</b>	Do inglês <i>Reactive Oxygen Species</i>
<b>RUNX2</b>	Fator de transcrição 2 relacionado ao Runt (do inglês <i>Runt-related transcription factor 2</i> )

<b>SC</b>	Célula estaminal (do inglês <i>Stem Cell</i> )
<b>SD</b>	Desvio padrão (Equação 7)
<b>SFA</b>	Ácido gordo saturado
<b>SOD</b>	Superóxido Dismutase
<b>TCD</b>	Detetor de condutividade térmica
<b>TG</b>	Triacilglicerol
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Fator de transformação do crescimento $\beta$ (do inglês <i>Transforming growth factor beta</i> )
<b>TMCS</b>	Clorotrimetilsilano
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral alfa (do inglês <i>Tumor necrosis factor alpha</i> )
<b>tR</b>	Tempo de retenção
<b>TRPV</b>	Do inglês <i>Transient Receptor Potential cation channel</i>
<b>UFA</b>	Ácido gordo insaturado
<b>VEGF</b>	Fator de crescimento vascular endotelial (do inglês <i>Vascular endothelial growth factor</i> )
<b>W1</b>	Largura de base do pico cromatográfico 1
<b>W2</b>	Largura de base do pico cromatográfico 2
<b>Wb</b>	Largura de base do pico cromatográfico
<b>Wnt</b>	Do inglês <i>Wingless-related integration site</i>

## Índice

Abreviaturas e Simbologia .....	VII
1. Introdução.....	1
1.1. Conceitos base e classificação de células estaminais (SCs).....	2
1.2. Homeostasia e regeneração óssea - papel do metabolismo das SCs .....	3
1.3. Aplicabilidade de SCs mesenquimais na engenharia de tecido ósseo .....	5
1.4. Fundamentos de metabolómica e principais técnicas analíticas .....	7
1.5. Estado da arte de estudos metabolómicos na osteogénese de SCs estaminais (MSCs) ....	19
1.5.1. Estudos por LC-MS.....	20
1.5.2. Estudos por GC-MS.....	26
1.6. Objetivos da presente dissertação .....	29
2. Materiais e métodos .....	30
2.1. Expansão de MSCs de tecido adiposo humano (hAMSCs) .....	30
2.2. Indução da diferenciação osteogénica .....	30
2.3. Extração de metabolitos intracelulares.....	30
2.4. Análise de extratos lipídicos por GC-MS.....	31
2.5. Identificação dos metabolitos e tratamento de dados .....	33
3. Resultados e discussão .....	34
3.1. Identificação de picos de cromatogramas GC-MS de hAMSCs durante a osteoindução.....	34
3.2. Efeitos do envelhecimento de hAMSCs no metaboloma lipídico .....	37
3.2.1. Descrição dos resultados.....	37
3.2.2. Proposta de interpretação bioquímica .....	41
3.3. Metabolómica na osteoindução de hAMSCs.....	47
3.3.1. Descrição dos resultados.....	47
3.3.2. Proposta de interpretação bioquímica .....	54
4. Conclusões e perspetivas futuras .....	59
5. Referências .....	60

## 1. Introdução

As lesões ósseas podem ocorrer não só por trauma, mas também como consequência de doenças congénitas ou não-congénitas (como tumores ósseos e osteoporose) [1]. Ainda que na maioria dos casos ocorra uma regeneração óssea espontânea, os casos de perda massiva ou fraturas extensas de osso permanecem grandes desafios clínicos. Em Portugal, o número de fraturas osteoporóticas tem vindo a aumentar ao longo dos anos, pensando-se que a crescente esperança média de vida seja a sua causa principal e que o envelhecimento da população tenderá a piorar este cenário [2]. Recentemente, Silva *et al.* destacou o custos das fraturas osteoporóticas no país, com despesas de mais de 1M € no primeiro ano após fratura, em apenas 100 pacientes avaliados [3]. A probabilidade de fraturas ósseas não se curarem corretamente (não-união) é de ~2%, podendo chegar perto dos 10% em adultos jovens e de meia-idade nos ossos longos (tíbia e clavícula) [4]. O enxerto ósseo autólogo (proveniente do próprio paciente) é atualmente o mais usado em abordagens de tratamento por ser biocompatível, biodegradável, osteocondutivo (contém matriz de tecido conetivo que abriga as células que irão formar o osso) e osteoindutivo, havendo, no entanto, complicações em quase 30% das cirurgias (infecção, necessidade de nova cirurgia, dores prolongadas por mais de 6 meses, perda de sensação, entre outras) [5]. As consequências socioeconómicas e o grave impacto na qualidade de vida destes pacientes, tornam imperativa a busca de alternativas mais eficazes e menos dispendiosas. Neste contexto, a engenharia de tecidos ósseos tem gerado grande interesse pela comunidade científica, onde o potencial recurso a células estaminais (SCs, do inglês *Stem Cells*), com vista à regeneração óssea, surge como alternativa menos invasiva, mais versátil e mais rápida [6]. Assim, torna-se extremamente benéfico entender os processos subjacentes à regeneração óssea a partir de células estaminais, com vista a monitorizar e guiar o seu comportamento de forma a desenvolver terapias mais eficientes. Tal pode ser alcançado recorrendo-se à metabolómica, onde o estudo de metabolitos (intra- e/ou extra-celulares) elucidam as vias metabólicas mais relevantes neste contexto, o que é particularmente útil na supervisão do comportamento celular durante a diferenciação de SCs em células do tecido ósseo [7]. Esta introdução começa por apresentar conceitos base referentes às principais classes de SCs, destacando as SCs mesenquimais e sua diferenciação em osteoblastos, seguindo-se a exposição de alguns conceitos teóricos referentes às principais estratégias metabolómicas, terminando com uma detalhada revisão do estado da arte dos estudos metabolómicos centrados na osteogénese de SCs, com grande foco nas espécies lipídicas.

## 1.1. Conceitos base e classificação de células estaminais (SCs)

As SCs são células indiferenciadas, caracterizando-se pela capacidade de se autorrenovarem e de se diferenciarem em células especializadas (diferenciadas), essenciais no desenvolvimento e manutenção de tecidos, desde o zigoto até à idade adulta [8]. Consoante a sua capacidade de se diferenciarem em linhagens celulares específicas (potência), as SCs podem ser classificadas em (Fig. 1): a) totipotentes, células embrionárias (com 1-3 dias após a fecundação do oócito) que conseguem dar origem a todos os órgãos embrionários, incluindo a placenta; b) pluripotentes, células embrionárias do blastocisto (dias 4-14 após a fecundação) que se conseguem diferenciar em tecidos embrionários da camada celular interna, nomeadamente, ectoderme, mesoderme e endoderme; c) multipotentes, células formadas a partir do dia 15 após a fecundação e que dão origem a tecidos derivados de apenas uma das três camadas germinativas: ectoderme, mesoderme ou endoderme [9]. Em alternativa, as SCs também podem ser organizadas de acordo com o seu tecido de origem (Fig. 1), existindo SCs hematopoiéticas (HSCs), neurais, gastrointestinais, epidermais, hepáticas, pancreáticas e ainda mesenquimais, podendo estas últimas ser extraídas a partir de diferentes tecidos [10]. Pelo seu papel essencial na regeneração óssea (detalhado adiante), bem como a sua relativamente fácil recolha/expansão e poucas questões éticas associadas, no presente trabalho destacam-se as células estaminais mesenquimais (MSCs, do inglês *Mesenchymal Stem Cells*), que são células multipotentes capazes de se diferenciarem em células derivadas da camada germinativa mesoderme [11,12]. Para serem consideradas MSCs, os seguintes critérios têm que ser alcançados: a) serem aderentes ao plástico; b) expressarem os antígenos de superfície celular CD105, CD90 e CD73; c) não expressarem os antígenos de superfície celular CD45, CD19, CD14, CD11b, CD34, CD79α e HLA-DR; d) terem a capacidade de se diferenciarem em osteoblastos (osso), condrócitos (cartilagem) e adipócitos (tecido adiposo) [11].

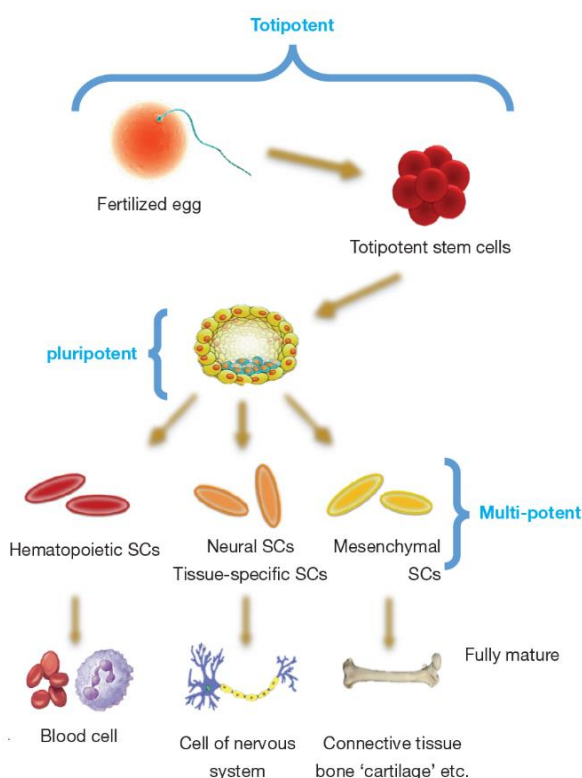


Fig. 1 – Principais tipos de células estaminais. Adaptado de [8].

## 1.2. Homeostasia e regeneração óssea - papel do metabolismo das SCs

O osso é um órgão complexo e dinâmico que oferece suporte estrutural, hospeda a hematopoiese e acumula minerais. Nesta seção apresentar-se-ão os processos de homeostasia em osso normal [7,13] e de regeneração óssea de fraturas [14], ambos fulcrais para se compreender a importância das SCs na formação e manutenção do osso [15].

### Homeostasia em osso saudável

A remodelação óssea (homeostasia) requer um equilíbrio dinâmico entre a reabsorção e a formação de osso (Fig. 2), que são desempenhadas pelos osteoclastos e osteoblastos, respectivamente [7]. Em resposta a sinais bioquímicos como hormonas (paratiroide, por exemplo) ou sinais mecânicos (como danos ósseos), os precursores de osteoclastos são ativados através de citocinas libertadas por células do revestimento ósseo, como o RANK (Recetor Ativador do fator Nuclear  $\kappa$  B) e o M-CSF (fator estimulante de colónias de macrófagos). Os osteoclastos sobrevivem 2 semanas, entrando em apoptose depois deste período [16,17]. A reabsorção óssea termina com a formação de lacunas de *Howship* cavadas na matriz óssea. Já os osteoblastos depositam uma matriz óssea recém-formada (osteóide) no local reabsorvido, que posteriormente mineraliza. Em seguida, os osteoblastos entram em apoptose ou são circundados por novas camadas de osso, designando-se osteócitos. Desequilíbrios nestes processos levam a doenças ósseas, como osteoporose.

A diferenciação celular é parte integral da homeostasia óssea (Fig. 2), uma vez que os osteoclastos são derivados de HSCs e os osteoblastos de MSCs da medula óssea (BMMSCs). Em geral, pensa-se que as BMMSCs utilizem a glicólise como principal fonte de energia, havendo um aumento da fosforilação oxidativa durante a osteogénese em paralelo com uma diminuição ou manutenção da glicólise [18,19]. Este acontecimento é regulado pelo fator induzível por hipóxia  $1\alpha$  (HIF- $1\alpha$ ), que está mais ativo em células indiferenciadas e consegue promover a glicólise e inibir a fosforilação oxidativa [20,21]. No fim da diferenciação, também nos osteoblastos maduros, a glicólise produz a maior parte da energia necessária para a sua atividade [22]. Por outro lado, na osteoclastogénese (diferenciação em osteoclastos), ambas as vias da glicólise e da fosforilação oxidativa aceleram [23]. Também o metabolismo lipídico é essencial para o equilíbrio entre a reabsorção e a formação de osso. Por exemplo, ácidos gordos polinsaturados (PUFAs) de cadeia longa, como o

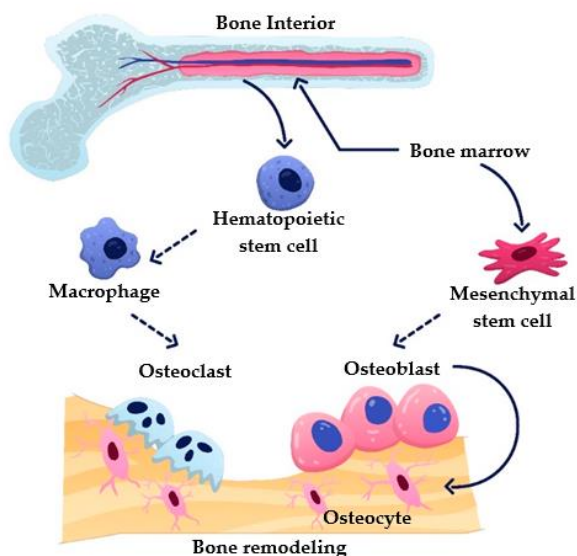


Fig. 2 – Células intervenientes no processo de remodelação óssea. Adaptado de [7].

ácido docosa-hexaenóico (DHA) e ácido araquidónico, suprimem diretamente a diferenciação/atividade de osteoclastos, promovendo a formação de osteoblastos [24,25]. Como parte constituinte das *lipid rafts*, o colesterol consegue alterar a sinalização RANK-RANKL (a proteína RANKL é libertada pelos osteoblastos, induzindo a osteoclastogénese quando se liga ao seu recetor transmembranar RANK, em células precursoras de osteoclastos), sendo que a diminuição deste esterol, na membrana de osteoclastos, resulta numa menor reabsorção óssea por parte destes [26]. Outro lípido de membrana, a fosfoinositida (Fig. 3B), influencia a diferenciação osteoclástica, havendo menor osteoclastogénese quando há deficiência da quinase PI3K $\beta$  (fosforila a posição 3 do anel inositol de derivados de fosfatidilinositol - Fig. 3) [27]. A existência de baixos níveis lipídicos no ambiente das MSCs leva à condrogénese, em vez de osteogénese, devido à dependência da oxidação de ácidos gordos por parte dos osteoblastos [28].

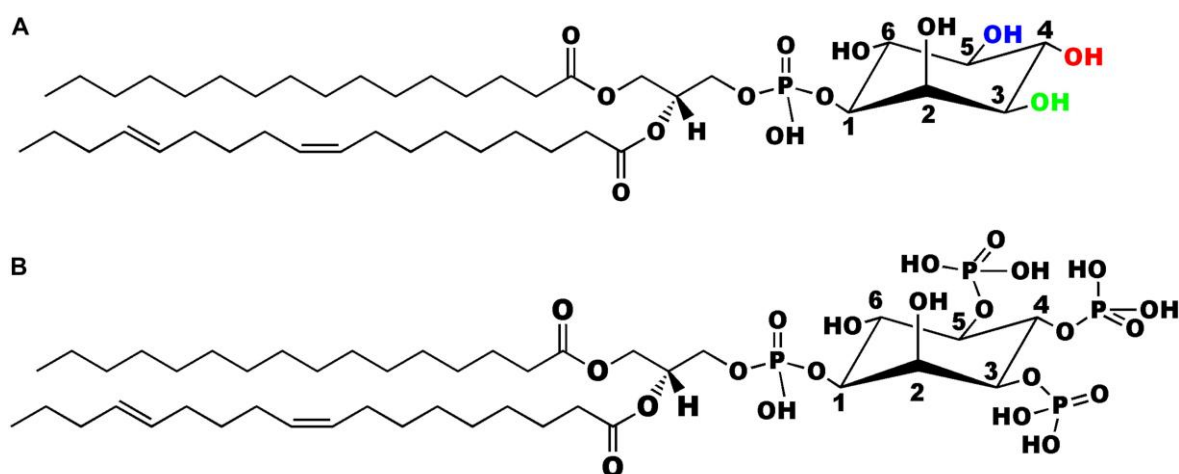


Fig. 3 – Estrutura do fosfatidilinositol (A) e fosfoinositida sua derivada (B). A) Fosfatidilinositol – Os grupos hidroxilo das posições 3, 4 e 5 do anel inositol são passíveis de fosforilação, resultando em fosfoinositidas. B) Fosfoinositida onde as posições 3, 4 e 5 do anel inositol foram fosforiladas. Adaptado de [121].

#### Regeneração óssea decorrente de lesões

O processo de regeneração óssea desencadeado por uma fratura engloba 6 fases principais (Fig. 4): a) hematoma seguido de inflamação aguda; b) tecido de granulação; c) formação do calo cartilaginoso (calo ósseo suave); d) formação do calo ósseo (rígido); e) remodelação [14]. A primeira fase (hematoma) surge com a ativação da cascata de coagulação sanguínea, seguida da formação de uma matriz provisória de fibrina, que serve de suporte para o influxo de células inflamatórias (como monócitos e macrófagos), dando início à fase de inflamação aguda. Estas células são recrutadas por complexas vias de sinalização que vão além do foco desta dissertação, destacando-se os sinais provenientes de células necróticas. Posteriormente, os macrófagos fagocitam a matriz de fibrina provisória e as células necróticas, enquanto os osteoclastos (derivados de monócitos)

reabsorvem fragmentos ósseos necróticos do osso fraturado. Além disso, os macrófagos recrutam fibroblastos, MSCs e células osteoprogenitoras, através de mediadores quimiotáticos e inflamatórios, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), a interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), a interleucina 6 (IL-6) e o ligando 2 da quimiocina com motivo C-C (CCL2) [29–31]. Existem ainda outras moléculas sinalizadoras provenientes da matriz extracelular que guiam a proliferação/diferenciação de MSCs e células osteoprogenitoras, como o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), o fator de crescimento fibroblástico 2 (FGF-2) e alguns membros da família do fator de transformação do crescimento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), incluindo as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) [32,33].

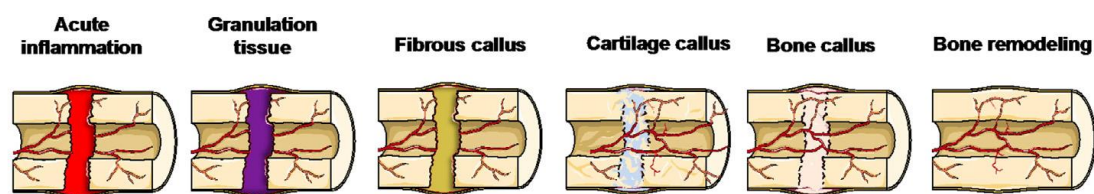


Fig. 4 – Esquema representativo das principais etapas da regeneração óssea desencadeada por uma fratura. Adaptado de [14].

Cerca de uma semana depois da fratura óssea, dá-se início à fase do tecido de granulação, tecido rico em MSCs proliferativas e neovasculatura em desenvolvimento, suportadas por uma matriz de colagénio desorganizada [34–37]. Na fase seguinte há a diferenciação de MSCs em condrócitos, produzindo-se cartilagem que abrange o interior da fratura (região menos oxigenada), ligando as extremidades do osso fraturado. Este tecido cartilaginoso (calo ósseo suave) oferece uma estabilidade mecânica inicial [14]. Depois, as MSCs presentes na superfície externa do osso (periósteo) começam a diferenciar-se em osteoblastos, envolvendo o calo ósseo suave [30,35,38]. Os condrócitos aí presentes entram em apoptose, secretando cálcio e mediadores que estimulam o crescimento vascular no interior do calo suave, o que resulta numa matriz extracelular formada por cartilagem parcialmente calcificada [33,39]. Daqui advém um aumento do fluxo sanguíneo, acompanhado pela diferenciação osteogénica e pela deposição de mais tecido ósseo na matriz cartilaginosa, formando-se assim o calo ósseo rígido [34,35]. À medida que a mineralização da cartilagem avança, a estabilidade mecânica do local da fratura aumenta. Na última fase da regeneração óssea, a remodelação, o tecido ósseo ainda imaturo e a matriz cartilaginosa adjacente são removidos por osteoclastos, até que se estabelece uma estrutura óssea normal, podendo este processo demorar vários meses ou até anos, em casos muito graves [14]. No final, o osso volta à forma e integridade normal, o que termina o processo de regeneração óssea.

### 1.3. Aplicabilidade de SCs mesenquimais na engenharia de tecido ósseo

Em engenharia de tecidos, a osteogénese de MSCs é frequentemente alcançada *in vitro* pela suplementação do meio de cultura com um cocktail osteoindutivo que inclui dexametasona,



ácido ascórbico e beta-glicerofosfato [40]. A dexametasona induz a osteogénese por ativar a sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina e BMP, com o consequente aumento do fator de transcrição 2 relacionado ao Runt (RUNX2) e do colagénio I [41]. O ácido ascórbico, juntamente com a lisina e prolina, é necessário para que o colagénio se forme na hélice apropriada [42]. A interação dos osteoblastos com o colagénio da matriz extracelular desencadeia a sinalização MAPK (cinase proteica ativada por mitógenos), que também ativa a fosforilação do RUNX2, levando à diferenciação osteoblástica [42]. Já o beta-glicerofosfato, é uma importante fonte de fosfato para a formação de cristais de hidroxapatite, um dos constituintes maioritários da estrutura do osso [42].

A aplicabilidade das MSCs na regeneração óssea tem sido explorada em diferentes contextos clínicos, por exemplo, não-uniões de fraturas, osteoartrite, osteogénese imperfeita (doença hereditária) ou osteoporose, podendo estas células ser administradas de diferentes formas (Fig. 5) [15]. Apesar da seleção das SCs a utilizar dependa grandemente do objetivo de estudo, existem algumas características gerais as tornam melhores candidatas em medicina regenerativa: a) disponibilidade em grandes quantidades; b) capacidade de diferenciação múltipla; c) isolamento indolor e em cumprimento das orientações de boas práticas; d) possibilidade de transplante autólogo (do próprio paciente) ou alogénico (de uma pessoa diferente) [15]. A fonte de MSCs mais investigada até à data é a medula óssea, mas a sua colheita é dolorosa, havendo o risco acrescido de sangramento e infeção. Por outro lado, a colheita de tecido adiposo é menos invasiva, sendo frequentemente descartado como resíduo hospitalar. Apesar de terem relativamente menos capacidade osteogénica que as BMMSCs, o facto das MSCs de tecido adiposo proliferarem mais rápido, serem mais abundantes e de mais fácil acesso, tem despertado um interesse crescente na regeneração óssea [12].

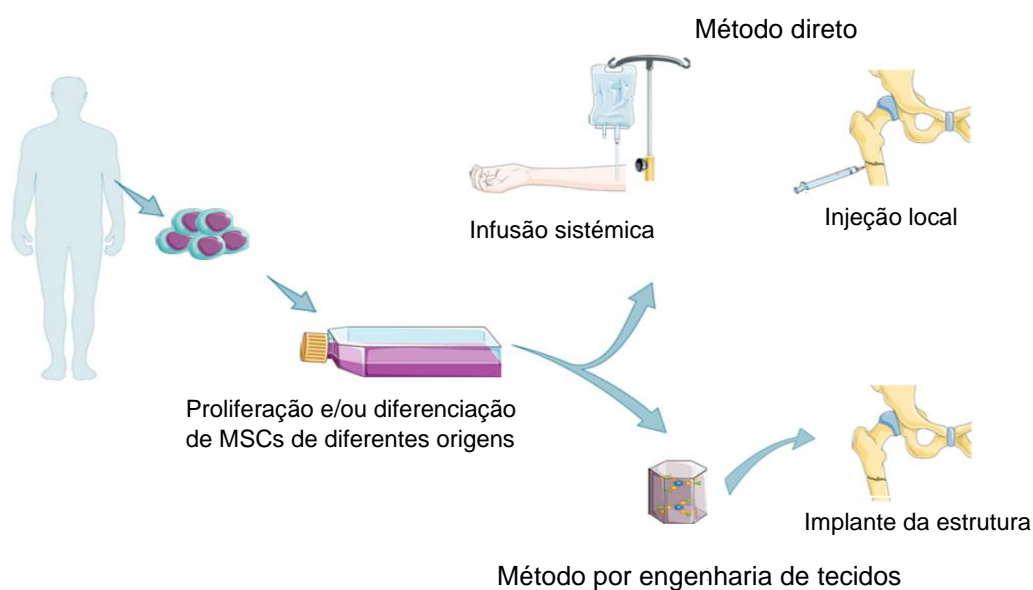


Fig. 5 – Recolha, expansão e formas de administração das MSCs na regeneração óssea. Adaptado de [15]

#### 1.4. Fundamentos de metabolómica e principais técnicas analíticas

A metabolómica define-se como o estudo minucioso do metaboloma (conjunto de compostos de baixa massa molecular, os metabolitos) presente num sistema biológico (célula, tecido, órgão, fluido biológico ou organismo) num dado ponto temporal [43]. Ainda que a grande parte dos estudos metabolómicos analisem biofluidos, também já existem protocolos bem estabelecidos para a recolha de células e *quenching* (interrupção imediata da atividade enzimática), permitindo a análise tanto de extratos celulares (endo-metaboloma), como de meio de cultura (exo-metaboloma) [44]. A lipidómica é uma subsecção da metabolómica centrada especificamente na análise de espécies lipídicas [43], cuja importância vai além de serem os principais componentes estruturais da membrana celular, destacando-se o seu papel no armazenamento de energia e como moléculas de sinalização [45].

Tipicamente, os estudos metabolómicos recorrem a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) e/ou espetrometria de massa (MS), aliadas a métodos de estatística univariada e multivariada [46,47]. Em espectroscopia de RMN as moléculas são expostas a um forte campo magnético, que interage com os núcleos dos átomos, resultando um espetro com informações da absorvância da radiação eletromagnética de cada tipo de átomo. Por outro lado, em MS (técnica explorada adiante) as moléculas são ionizadas, sendo posteriormente separadas por razão massa iónica/carga ( $m/z$ ). Como estas técnicas são complementares, a sua seleção depende dos objetivos, tendo ambas vantagens e desvantagens. A espectroscopia de RMN apresenta maior reprodutibilidade e a amostra pode não ser destruída, enquanto que MS é mais sensível (<pM vs. mM), requerendo menor quantidade de amostra, sendo comum haver passos adicionais de preparação destrutivos. Pode optar-se por abordagens não-direcionadas caracterizadas por uma visão holística do perfil metabólico, ou direcionadas para metabolitos previamente apontados como relevantes (frequentemente por MS).

##### Cromatografias líquida e gasosa acopladas a espetrometria de massa (LC-MS e GC-MS)

O acoplamento de cromatografias a MS é extremamente usual, tirando-se partido das vantagens da cromatografia, nomeadamente a alta seletividade e eficiência de separação e, portanto, facilitando a identificação e/ou quantificação dos compostos presentes na amostra [48]. As cromatografias líquida (LC, do inglês *Liquid Chromatography*) e gasosa (GC, do inglês *Gas Chromatography*) são as mais frequentes em estudos metabolómicos, permitindo a separação dos compostos numa coluna cromatográfica de acordo com um gradiente (geralmente de polaridade), dependendo da fase estacionária e outros fatores. Consoante a quantidade de moléculas a sair da coluna a cada instante, o detetor (MS) fornece um cromatograma da intensidade do sinal em função do tempo de retenção. LC e GC distinguem-se pelo estado da fase móvel que possuem na coluna (líquido em LC e gasoso em GC), apresentando claras vantagens e desvantagens detalhadas na Tabela 1, portanto a escolha da cromatografia depende dos objetivos em estudo e do tipo de amostra.

Tabela 1 – Vantagens e desvantagens de GC-MS e LC-MS. Baseado em [48].

<b>Técnica</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
<b>GC-MS</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tecnologia robusta e madura</li> <li>• Relativamente barato</li> <li>• Baixo volume de amostra (50 µL)</li> <li>• Boa sensibilidade (100 nM)</li> <li>• Excelente reprodutibilidade</li> <li>• Deteta compostos voláteis</li> <li>• Cobertura relativamente larga de metabolitos</li> <li>• Excelente poder de resolução</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Destrutivo para a amostra</li> <li>• Requer derivatização da amostra</li> <li>• Requer separação</li> <li>• Intervalo de massas limitado (&lt;500 Da)</li> <li>• Resolução de massa limitada</li> </ul>
<b>LC-MS</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Excelente sensibilidade (1 nM)</li> <li>• Muito baixo volume de amostra (5 µL)</li> <li>• Tecnologia muito flexível</li> <li>• Pode ser feito sem separação</li> <li>• Excelente para análise de lípidos</li> <li>• Cobertura de metabolitos muito larga</li> <li>• Largos intervalos de massas</li> <li>• Excelente poder de resolução</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Destrutivo para a amostra</li> <li>• Caro</li> <li>• Reprodutibilidade modesta</li> <li>• Instrumento menos robusto</li> <li>• Não deteta compostos voláteis</li> </ul>

Comparativamente a LC-MS, GC-MS é menos utilizada em metabolómica possivelmente por requerer a volatilização de compostos termicamente estáveis. Ainda assim, GC-MS apresenta mais robustez e menor custo [49]. Apesar de todas estas diferenças importantes, apenas serão apresentadas em seguida as principais etapas de GC-MS (técnica eleita nesta tese de mestrado), já que estas cromatografias também apresentam aspetos análogos, com a exceção da necessidade de volatilização característica apenas em GC.

De modo a facilitar a volatilização dos compostos presentes na amostra, deve-se recorrer a protocolos de derivatização, onde os hidrogénios ativos (ligados a O, N ou S) de dada molécula são substituídos por grupos que a tornam mais volátil, menos polar e mais termicamente estável [50]. Algumas das derivatizações encontradas na literatura são a acilação, alquilação ou a sililação, sendo que a sua escolha recai nos objetivos e no tipo de amostra. No caso dos lípidos (objeto de estudo desta tese de mestrado), a acilação não é reativa para ácidos carboxílicos e as condições da alquilação podem ser muito destrutivas, o que torna a sililação a opção mais apelativa em lipidómica. Nesta reação há a substituição do hidrogénio ativo por um grupo sililo. Algumas vantagens práticas de se usarem moléculas derivatizadas em GC são a sua mais fácil deteção, melhor resolução e diminuição das caudas dos picos do cromatograma.

O cromatógrafo de GC (Fig. 6) pode dividir-se em 3 partes principais: a) porta de injeção (acoplada a uma fonte de gás portador); b) coluna cromatográfica (dentro de um forno); c) detetor (MS no caso da metabolómica) ligado a um sistema de dados (computador) [51]. Resumidamente, a amostra é aspirada por uma seringa, cuja agulha se move até ao *liner* da porta de injeção (Fig. 7), onde é aquecida (a mais de 200°C) e injetada sob a forma de vapor, entrando na coluna com a ajuda do gás portador [52]. A injeção na coluna pode realizar-se em modo *splitless* ou *split*, sendo que no primeiro toda a amostra é encaminhada para a coluna e no segundo parte da amostra é purgada para os resíduos (geralmente numa razão entre 1:10 e 1:400) [52,53]. O modo de injeção deve ser escolhido consoante a quantidade

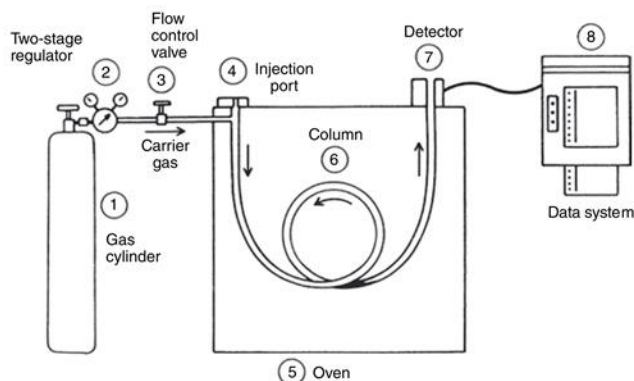


Fig. 6 - Esquema representativo de um GC-MS típico. Adaptado de [51].

de amostra disponível, a concentração dos analitos e o nível de sensibilidade requerido na análise, tendo em conta que quanto melhor se detetarem os compostos minoritários, também mais acentuadas se apresentarão as impurezas.

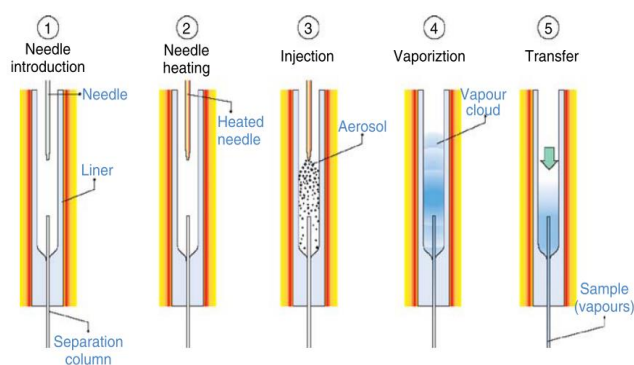


Fig. 7 - Etapas sequenciais numeradas de 1 a 5 que ocorrem na porta de injeção de GC. Adaptado de [52].

de amostra disponível, a concentração dos analitos e o nível de sensibilidade requerido na análise, tendo em conta que quanto melhor se detetarem os compostos minoritários, também mais acentuadas se apresentarão as impurezas.

Após a injeção da amostra na coluna (Fig. 8), cada composto particiona-se entre a fase móvel e fase estacionária [51,52]. As substâncias que têm menos afinidade para a fase estacionária da coluna, infiltram-se menos nesta e permanecem mais na fase móvel, eluindo primeiro (como o composto A da Fig. 8). Por outro lado, compostos que se distribuem mais pela fase estacionária (como o composto B da Fig. 8), saem mais tardiamente da coluna por se moverem mais lentamente dentro desta [51]. Note-se que a tendência de um composto ser atraído para a fase estacionária depende da temperatura, eluindo mais com o fornecimento de calor. No final da corrida GC encontra-se um detetor como MS, sendo que se podem usar outros como detetores de condutividade térmica (TCD), de ionização de chama (FID), de azoto e fósforo (NPD), de captura de eletrões (ECD) ou fotométrico de chama (FPD). Nos cromatogramas resultantes (intensidade do sinal em função do tempo de retenção) a área de cada pico é proporcional à quantidade de composto injetada.

Uma coluna cromatográfica diz-se tanto mais eficiente quanto mais finos forem os picos do cromatograma obtido, o que se relaciona com um maior número de pratos teóricos ( $N$ , Equação 1), onde " $t_R$ " é tempo de retenção de um pico e " $W_b$ " se refere à largura da base desse pico [54].

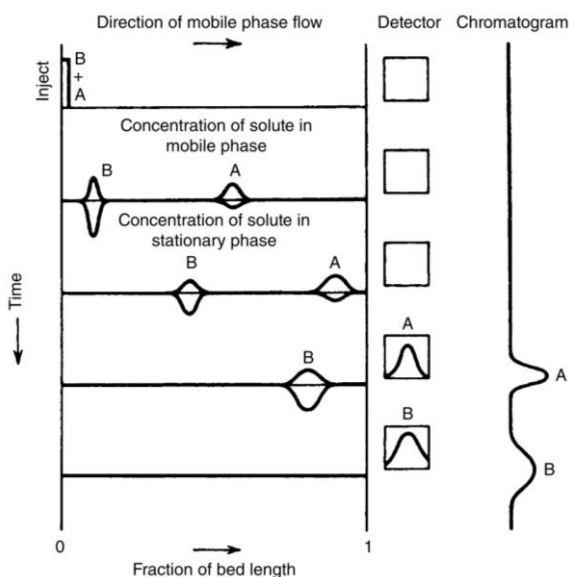


Fig. 8 – Representação da corrida de analitos através da coluna cromatográfica até ao detetor, obtendo-se o respetivo cromatograma. Note-se que cada composto (A e B) se partilha entre a fase móvel (pico acima da linha horizontal) e fase estacionária (pico abaixo da linha horizontal), sendo a linha horizontal a superfície da fase estacionária. Adaptado de [51].

Também a altura equivalente a um prato teórico (HETP, do inglês *Height Equivalent to a Theoretical Plate*) é uma medida comum da eficiência da coluna. Segundo a Equação 2, onde “L” é o comprimento da coluna, quanto maior a eficiência da coluna, maior o valor de N e, por isso, menor será o valor de HETP.

$$N = 16 \times \left(\frac{t_R}{W_b}\right)^2 \dots\dots\dots \text{Equação 1}$$

$$HETP = \frac{L}{N} \dots\dots\dots \text{Equação 2}$$

$$HETP = A + \frac{B}{\mu} + C \times \mu \dots\dots\dots \text{Equação 3}$$

A HETP é ainda expressa pela equação de Van Deemter (Equação 3). Aqui a variável “A” representa a difusão de Eddy (apenas aplicável a colunas empacotadas), a variável “B” representa a difusão molecular, a variável “C” correlaciona-se com a resistência à transferência de massa e a variável “μ” é a velocidade da fase móvel ao longo do sistema GC [54]. A partir da equação de Van Deemter (Equação 3) obtém-se a Fig. 9, sendo possível comparar a eficiência dos 3 gases portadores mais usados em GC. Com azoto, obtém-se a eficiência máxima (HETP mínima) a uma velocidade mais baixa que com os outros dois gases. A vantagem do hélio e hidrogénio é terem curvas menos acentuadas, sendo possível aumentar a velocidade linear sem que se perca muita eficiência. Geralmente utiliza-se o hélio em vez do hidrogénio por questões de segurança e também porque a maioria dos aparelhos MS estão preparados para serem usados com este gás [53].

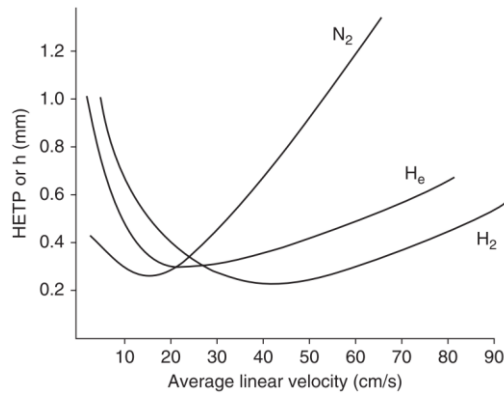


Fig. 9 – O gráfico apresenta as curvas de Van Deemter para os gases portadores azoto, hélio e hidrogénio, numa coluna de 30m de comprimento, 0,25mm de diâmetro interno e 0,25µm de espessura de filme. Adaptado de [52].

A resolução (R) do cromatograma é a medida da separação de dois picos consecutivos e representa-se pela Equação 4, onde “d” representa a separação entre dois picos e “W<sub>1</sub>” e “W<sub>2</sub>” são as larguras de base dos dois picos em questão. [54]

$$R = \frac{2 \times d}{W_1 + W_2} \dots \dots \dots \text{Equação 4}$$

Com base nos conceitos acima referidos, existem algumas considerações práticas importantes a ter em conta na seleção da coluna GC, dependendo claro do que for pretendido. A alteração de características como espessura de filme, diâmetro interno e comprimento da coluna têm efeitos nas curvas de Van Deemter do Hélio (Fig. 10) e, portanto, na eficiência do sistema. Por exemplo, quanto menor o diâmetro interno, mais pratos teóricos existirão por metro de coluna mas mais lento será o fluxo ótimo. Simultaneamente, haverá uma

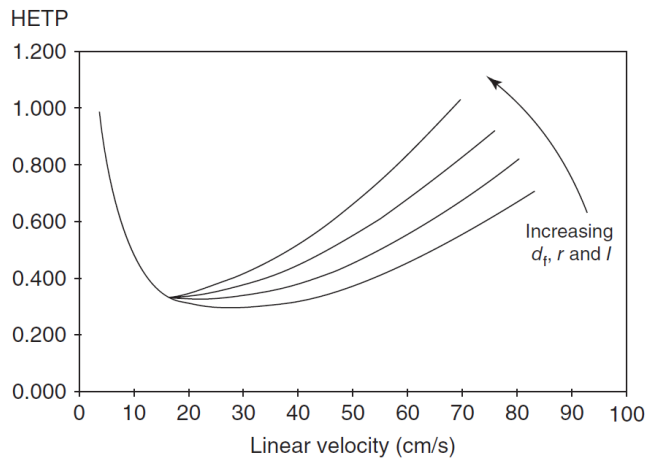


Fig. 10 – Efeitos do aumento da espessura de filme (df), diâmetro interno (r) e comprimento (l) sobre as curvas de Van Deemter do Hélio. Adaptado de [52]

menor capacidade de amostra suportada pela coluna, o que pode ser vantajoso se houver pouca (dezenas de ng), mas poderá levar ao “entupimento” da coluna se houver maior quantidade de amostra [52]. A capacidade de amostra aumenta com o aumento do diâmetro interno da coluna, o aumento da espessura do filme e o aumento da solubilidade [52]. Dada a mesma espessura do filme, quanto menor o diâmetro interno, maior será a resolução e menor será o tempo de análise. O aumento da espessura do filme melhora a resolução de compostos voláteis e aumenta as temperaturas de eluição dos analitos, mas aumenta o tempo de análise. Quanto mais polar for a fase

estacionária, mais fraca será a retenção de compostos não polares e maior será a retenção de compostos polares. [52]

### Espetrometria de massa (MS)

Os principais compartimentos de MS (Fig. 11) são a câmara de ionização (onde as moléculas são ionizadas), o analisador de massa (onde ocorre a separação das moléculas) e o detetor propriamente dito, que transmite os sinais detetados para um computador [51].

Existem diversas formas de ionização, dependendo da fonte usada [55]. Em amostras gasosas pode-se usar a ionização por impacto de elétrons (EI, do inglês *Electron Impact Ionization*) ou a ionização química (CI, do inglês *Chemical Ionization*). Nas amostras líquidas alguns métodos usados são a ionização por eletrospray (ESI, do inglês *Electrospray Ionization*), a ionização química à pressão atmosférica (APCI, do inglês *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*) ou a fotoionização à pressão atmosférica (APPI, do inglês *Atmospheric Pressure Photo Ionization*). Já nas amostras sólidas, recorre-se mais frequentemente à ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI, do inglês *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization*).

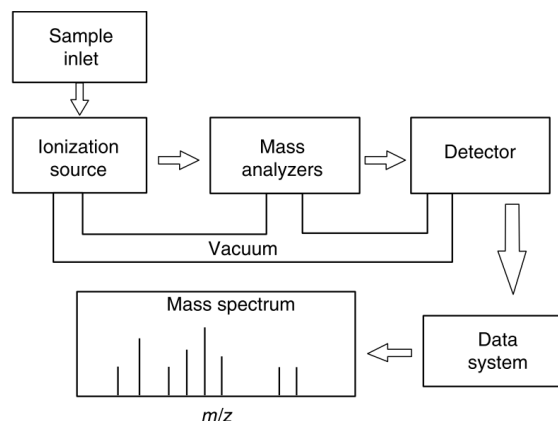


Fig. 11 – Componentes de MS. Adaptado de [51].

Na Fig. 12a encontra-se representada uma câmara de ionização onde acontece a EI. Resumidamente, há um fluxo de elétrons a serem emitidos em direção ao fluxo de amostra vindo da coluna GC e que são acelerados à diferença de potencial de 70 elétrons Volt (convenção usada para que a biblioteca dos espectros possa ser mais facilmente comparada entre diferentes sistemas MS) [54]. O embate dos elétrons com as moléculas vindas do GC leva a que estas percam um elétron e ganhem alguma energia, resultando em íons positivos. Devido ao excesso de energia, alguns destes íons poderão ainda fragmentar-se ou rearranjar-se. Por sua vez, o “repelente” (Fig. 12a) encaminha os íons da câmara de ionização para o analisador de massa (Fig. 12b), onde as moléculas progridem por ordem de  $m/z$  (razão massa/carga). Existem vários tipos de analisadores de massa disponíveis, com diferentes geometrias, estando os mais comuns comparados na

Tabela 2 [56]. O quadrupolo é dos analisadores mais simples, baratos e robustos, sendo uma escolha frequente em acoplamentos GC-MS [51,56], à semelhança do que ocorre no presente trabalho. Este analisador (Fig. 12b) é composto por 4 cilindros paralelos, onde se aplica uma corrente de tensão contínua (cilindros adjacentes têm sinais opostos) e os sinais da tensão são rapidamente revertidos, o que provoca uma rápida atração e repulsão entre cilindros, por parte dos íons. Além disso, também se aplica uma radiofrequência aos cilindros e a sua combinação com a tensão faz com que íons de apenas uma razão  $m/z$  (íons ressonantes à radiofrequência aplicada) passem

através do quadrupolo até ao detector. Os restantes iões (não ressonantes) são destruídos ao atingirem os cilindros ou sugados pelo vácuo. Diferentes razões radiofrequência/tensão são usadas para se filtrarem rapidamente diferentes razões  $m/z$ .

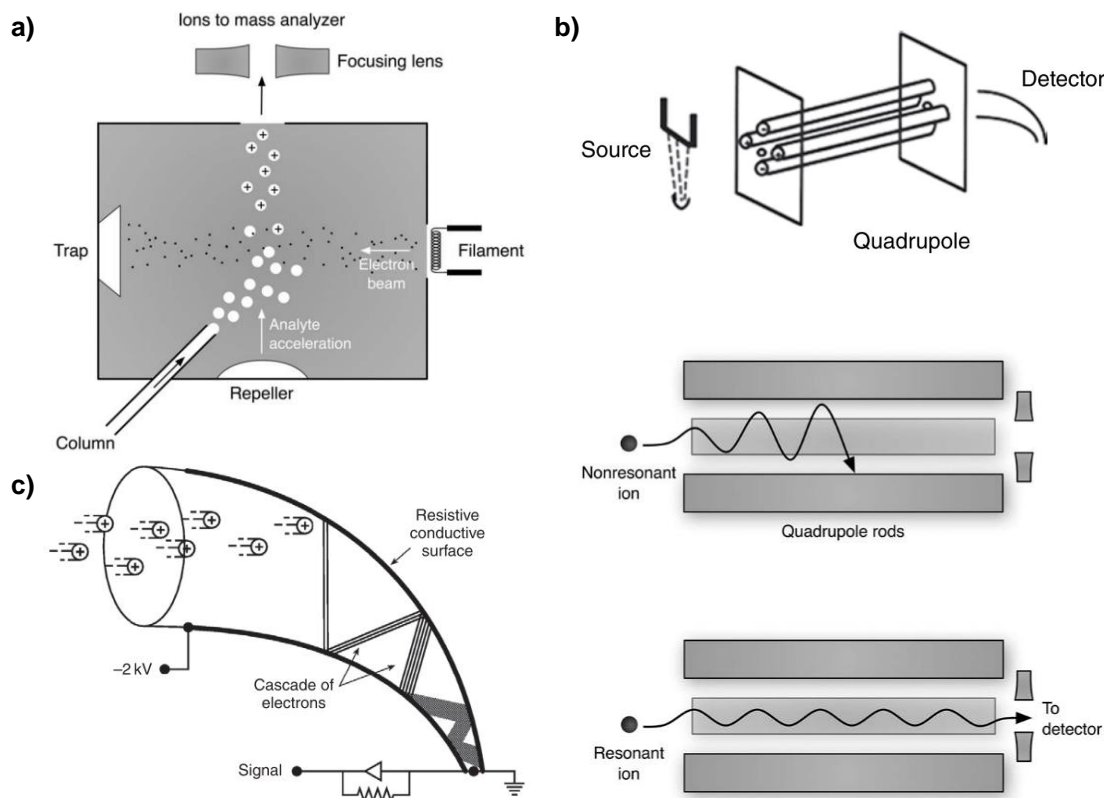


Fig. 12 – Funcionamento dos principais constituintes de MS: a) fonte de ionização por impacto de eletrões, Adaptado de [54]; b) Analisador de massa, quadrupolo, Adaptado de [51][54]; c) Detetor, multiplicador de eletrões de dínodo contínuo. Adaptado de [122].

Tabela 2 - Comparação entre os analisadores de massa mais usados. Adaptado de [56].

	Quadrupolo	Trapa de iões	Tempo de voo	Orbitrap	FT-ICR
<b>Intervalo <math>m/z</math> (amu)</b>	< 3 000	< 20 000	Virtualmente infinito	< 6 000	< 30 000
<b>Exatidão da massa (ppm)</b>	> 100	< 30	5 – 100	< 1 – 2	< 0,6
<b>Resolução da massa (FWHM)</b>	< 3 000	< 5 000	5 000 – 40 000	> 240 000	$2,5 \times 10^6$
<b>Taxa de scans (Hz)</b>	0,5 – 4	1 – 10	20 – 200	0,3	1
<b>Quantificação</b>	Boa – Muito boa	Fraca	Média – Boa	Média	Média
<b>Manuseamento</b>	Fácil	Fácil	Fácil – Médio	Médio	Difícil
<b>Custos (k€)</b>	< 150	< 150	< 250	< 500	< 1 000



Por fim, com a chegada ao detetor, a intensidade de cada tipo de ião é detetada e transformada em sinais elétricos, posteriormente convertidos em sinais digitais que são enviados para um computador [51]. Dos vários disponíveis, o multiplicador de eletrões (EM, do inglês *Electron Multiplier*) de dínodo contínuo é o mais usado (Fig. 12c). Neste caso, os iões vindos do analisador de massa embatem contra a superfície semicondutora do detetor EM e libertam uma cascata de eletrões. Estes são acelerados, através de uma diferença de potencial, para uma outra porção (cada vez mais próxima do final da estrutura do detetor) da superfície semicondutora, onde se liberta uma nova cascata de eletrões, ainda maior que a anterior. O processo repete-se até que a intensidade do sinal original tenha sido amplificada cerca de 1 milhão de vezes.

Como se observa na Fig. 13, no final de todas as etapas de MS, acoplada a uma cromatografia existe um espectro de massa (com a intensidade de cada tipo de ião em função da razão  $m/z$ ) associado a cada ponto temporal do cromatograma. Cada composto tem um padrão de fragmentação único, havendo bibliotecas (como NIST e HMDB) e softwares (como GCMS Postrun Analysis) que ajudam na identificação das moléculas. Especificamente em EI, existem dois mecanismos possíveis para se clivar cadeias de carbono após ionização: por clivagem  $\alpha$  e por formação de carbocatiões [52]. É ainda possível a fragmentação de um ião através da perda de partículas neutras estáveis, como  $H_2O$ ,  $CO$ ,  $CO_2$ ,  $NO$ ,  $HCN$ ,  $HCl$ ,  $R-COOH$  e alcenos [52].

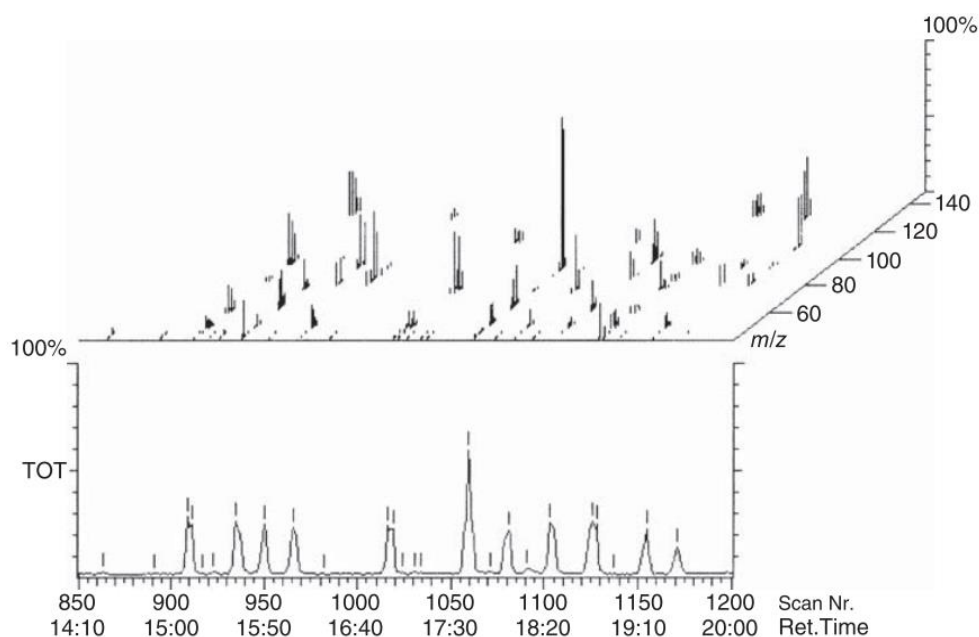


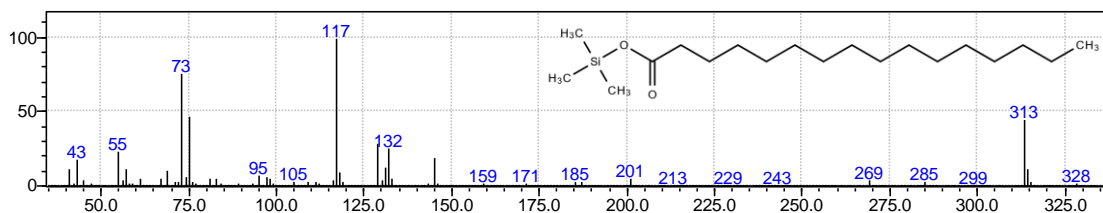
Fig. 13 – Esquema de um cromatograma (abaixo) com os vários espectros de massa associados (acima). Adaptado de [52].

Durante a interpretação dos espectros é importante ter em conta a possível coeluição de moléculas diferentes mas com propriedades semelhantes (polaridade ou temperatura de ebulição, por exemplo), a deteção de contaminantes externos (como ftalatos de plásticos usados em passos preparativos da amostra) ou internos ao sistema GC-MS (como silanos resultantes do “sangramento” da fase estacionária da coluna capilar), entre outros.

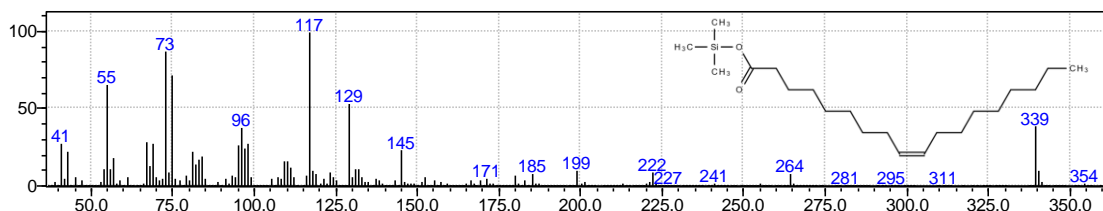
### Identificação de espécies lipídicas trimetilsililadas através de espectros EI-Q-MS

À semelhança do ácido palmítico (Fig. 14a), os espectros de massa de SFAs derivatizados por trimetilsililação são caracterizados pelos iões  $[M - 15]^+$ , 73, 75, 117, 129, 132 e 145 que se obtêm segundo os mecanismos presentes na Fig. 15 [57]. Neste ácido gordo em particular (Fig. 14a), os iões com  $m/z$  117, 129, 132 e 145 apresentam as abundâncias respectivas de 100%, 28,58%, 25,88% e 19,10%. O ião molecular  $M^+$  ( $m/z$  328) tem uma abundância relativa de 1,93% e

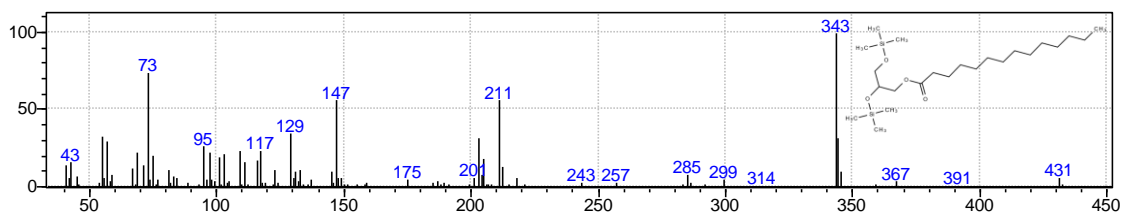
#### a) Ácido palmítico



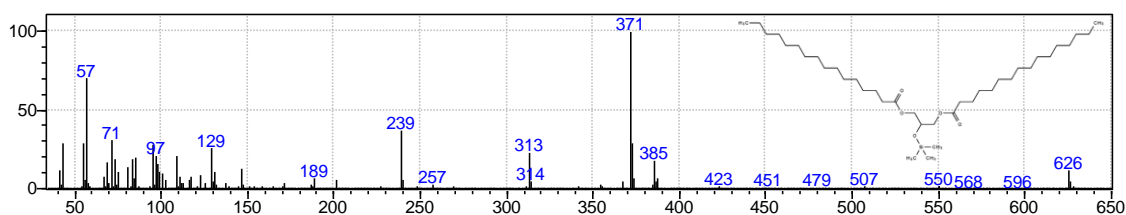
#### b) Ácido oleico



#### c) 1-Monomiristina



#### d) 1,3-Dipalmitina



#### e) Colesterol

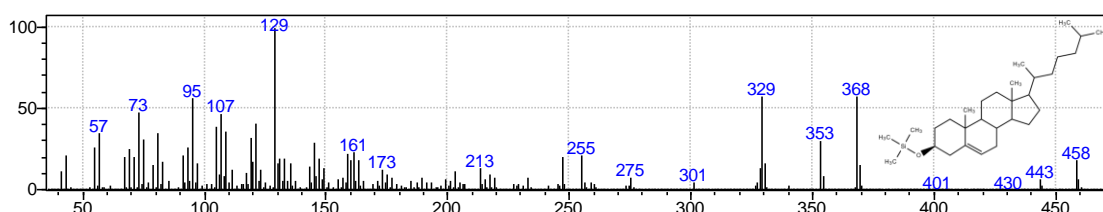


Fig. 14 – Espectros de massa de 5 compostos pertencentes às hAMSCs osteoinduzidas (dia 1) deste trabalho. a) Espectro de ácido palmítico trimetilsililado. b) Espectro de ácido oleico trimetilsililado. c) Espectro de 1-monomiristina trimetilsililada. d) Espectro de 1,3-dipalmitina trimetilsililada. e) Espectro de colesterol trimetilsililado.

ião  $[M - 15]^+$  ( $m/z$  313), que resulta da clivagem de um grupo metilo (Fig. 15), tem uma abundância relativa de 45,43%, fazendo parte dos picos mais intensos. Verifica-se ainda a existência dos íons com  $m/z$  73 e 75 (muito comuns nos espectros da maioria dos compostos derivatizados por

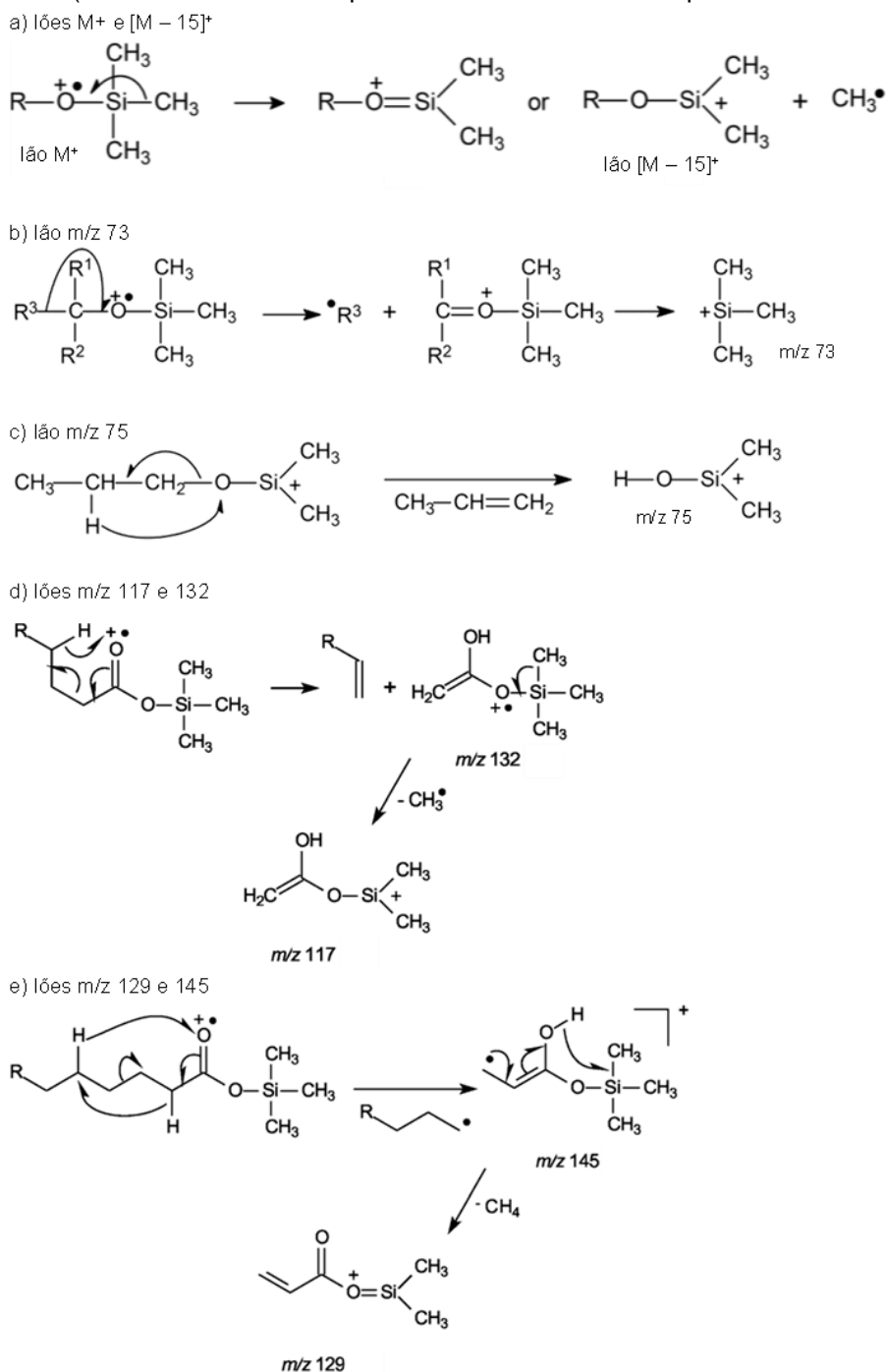


Fig. 15 – Fragmentações que originam os vários íões visíveis em espectros de massa por EI, comuns em ácidos gordos livres e outros compostos trimetilsililados. a) Origem do íão  $[M-15]^+$  a partir do íão molecular  $M^+$ , ambos comuns nos espectros de todos os compostos trimetilsililados. b) Origem do catião  $m/z$  73, comum em muitos compostos trimetilsililados. c) Origem do catião  $m/z$  75, comum em muitos compostos trimetilsililados. d) Origem do catião radical  $m/z$  132, que por sua vez dá origem ao catião  $m/z$  117, tipicamente associados a ácidos gordos livres trimetilsililados. e) Origem do catião radical  $m/z$  145, que por sua vez dá origem ao catião  $m/z$  129, tipicamente associados a ácidos gordos livres trimetilsililados. Adaptado de [57].

trimetilsilação), com abundâncias relativas de 76,12% e 47,66%, respectivamente. Por outro lado, os UFAs são de mais difícil identificação por sofrerem migração das ligações duplas sob condições de ionização EI [58], podendo recorrer-se padrões externos para facilitar este processo. Por exemplo, no espectro do ácido oleico trimetilsililado (Fig. 14b) notam-se os picos dos iões com  $m/z$  73, 75, 117, 129, 145 e 339 ( $[M - 15]^+$ ). Note-se que, em colunas cromatográficas pouco polares (como a utilizada neste trabalho), a conformação *cis* dos FAs monoinsaturados (ex: ácido oleico C18:1) elui antes da conformação *trans* (ex: ácido elaídico C18:1) [59]. Além disso, a ordem de eluição dos FAs é feita por ordem crescente do tamanho da cadeia de carbonos [59]. Os UFAs com o mesmo número de carbonos eluem antes do SFA correspondente e quantas mais ligações duplas, mais cedo saem da coluna [59]. Exemplo disso são os FAs de 18 carbonos C18:2, C18:1 *cis*, C18:1 *trans* e C18:0.

No caso dos MGs trimetilsililados (Fig. 14c, Fig. 16 e Fig. 17), os seus espectros característicos diferem consoante o MG seja alfa (FA ligado ao primeiro grupo hidroxilo do glicerol) ou beta (FA ligado ao segundo grupo hidroxilo do glicerol). No exemplo dado na Fig. 14c, a 1-Monomiristina é um MG alfa e os seus iões diagnósticos são  $m/z$  205 e 343, tal como o ião  $[M - 15]^+$  de  $m/z$  431 [57]. Um exemplo da formação destes primeiros fragmentos está representado na Fig. 16, sendo que o pico  $m/z$  343, neste caso advém da soma do peso molecular do ácido mirístico (228 g/mol) a  $m/z$  115. Por outro lado, os MG beta (Fig. 17) têm como picos principais os  $m/z$  103, 129, 191, 203 e 218, bem como os iões  $[M - 15]^+$  e  $[FA - H + Si(CH_3)_2]^+$  ( $m/z$  313 no caso do ácido palmítico, por exemplo) [57].

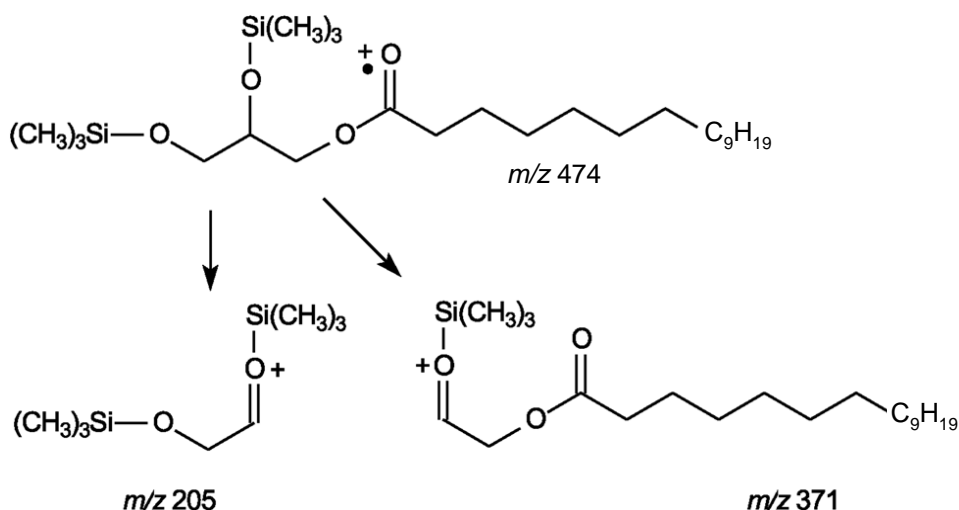


Fig. 16 – Iões típicos provenientes de MGs alfa. Exemplo dado com 1-monopalmitina, formando-se o ião  $m/z$  205 comum em todos os MGs alfa e o ião  $m/z$  371, específico da 1-monopalmitina. Este último advém da soma entre o peso molecular do FA em questão (ácido palmítico – 256 g/mol) e 115. Adaptado de [57].

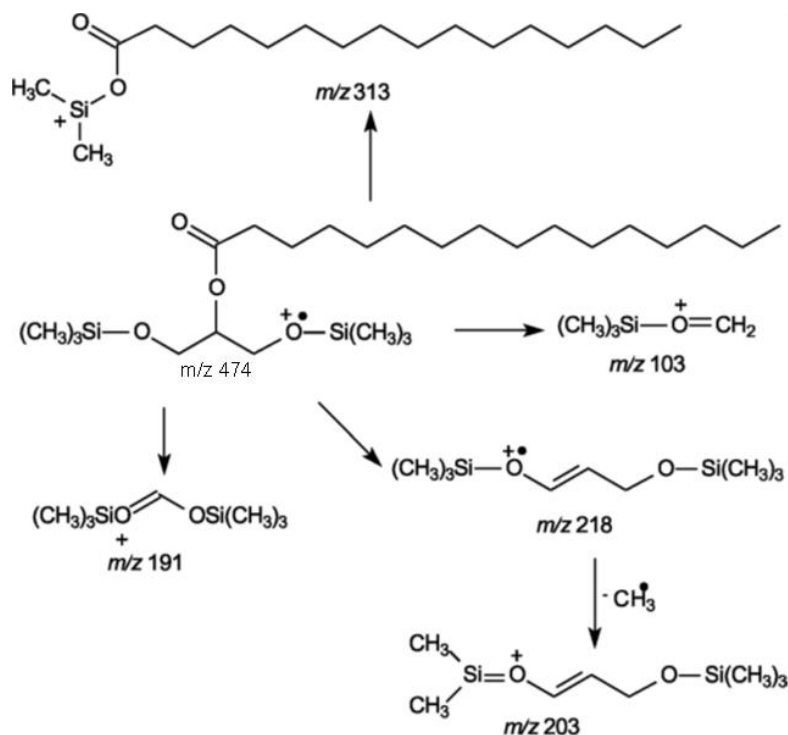


Fig. 17 – Formação dos íons característicos de um MG beta trimetilsililado, neste caso exemplifica-se a 2-monopalmitina, com o íon específico [FA – H + Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]<sup>+</sup> de *m/z* 313 e os íons *m/z* 103, 191, 203 e 218 comuns a todos os MG beta. Adaptado de [57].

Os DGs trimetilsililados também se fragmentam de modo diferente caso os ácidos gordos estejam ligados aos grupos hidroxilo 1 e 2 ou 1 e 3. Neste trabalho identificou-se o DG 1,3-Dipalmitina (Fig. 14d) sendo os íons mais importantes o [M – 15]<sup>+</sup> (*m/z* 626), o [M – acilo]<sup>+</sup> (*m/z* 385), o *m/z* 371 (Fig. 16) e o *m/z* 313 (Fig. 17) [57].

Por fim, o colesterol trimetilsililado tem como picos característicos o íon molecular M<sup>+</sup> (*m/z* 458), o íon [M – 15]<sup>+</sup> (*m/z* 443), o íon [M – (TMS-OH)]<sup>+</sup> (*m/z* 368), o íon [M – (TMS-OH) – CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (*m/z* 353), o íon [M – 129]<sup>+</sup> (*m/z* 329) e o íon *m/z* 129 (fragmentação ilustrada na Fig. 18) [57].

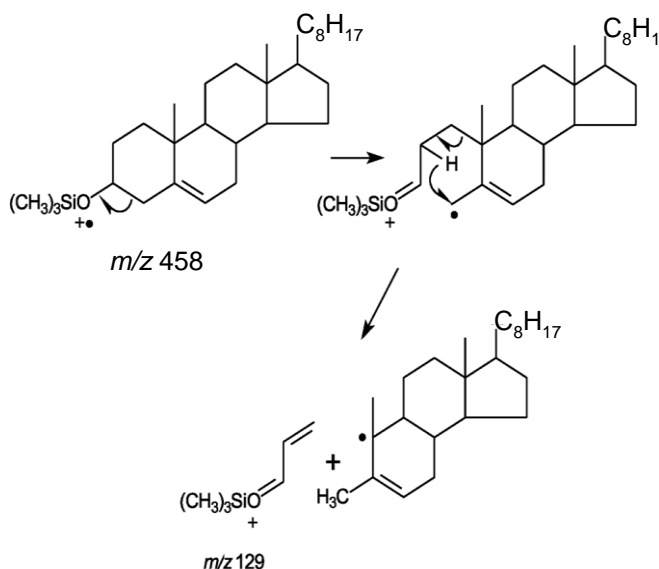


Fig. 18 – Fragmentação do colesterol trimetilsililado no íon *m/z* 129. Adaptado de [57].

### Análise estatística dos dados

Devido à grande quantidade de dados gerados em análises lipidômicas baseadas na técnica MS, há vários métodos estatísticos de tratamento de dados que facilitam a interpretação dos resultados e a comparação com outros estudos [60]. Temos à nossa disposição ferramentas que permitem a análise de variáveis individualmente ou em conjunto (análise univariada e multivariada, respetivamente).

Os testes univariados são mais facilmente interpretados, sendo por vezes usados para uma triagem preliminar ou de forma a complementar a análise multivariada [61]. No caso de dados com distribuição normal, pode-se aplicar testes *t* ou ANOVA (Análise de variância), por exemplo. Se os dados não tiverem uma distribuição normal (ou se a distribuição normal não se possa avaliar devido ao pequeno número de amostras), recorre-se a testes não paramétricos como o teste *Wilcoxon rank-sum* ou o teste *Kruskal-Wallis*. Entre as técnicas estatísticas multivariadas, geralmente começa-se por métodos supervisionados como a análise de componentes principais (PCA, do inglês *Principal Component Analysis*), para capturar diferenças intrínsecas independentes das classes em estudo. Em seguida aplicam-se métodos não supervisionados, como a análise discriminante pelo método de mínimos quadrados parciais (PLS-DA, do inglês *Partial Least Squares Discriminant Analysis*), de forma a otimizar a separação metabólica entre os grupos em estudo.

### **1.5. Estado da arte de estudos metabolómicos na osteogénese de SCs estaminais (MSCs)**

Os estudos metabolómicos em SCs recorreram maioritariamente a MS, comparativamente a espectroscopia de RMN, tal como se pode observar na Fig. 19A, onde também é claro o crescente interesse nesta área, especialmente nos últimos 6 anos [62]. Apesar de haver outros tópicos importantes a serem explorados (detalhados na Fig. 19B), a diferenciação tem sido até agora o foco principal da maioria dos estudos. Como a presente tese incide especificamente na osteogénese, neste capítulo serão descritos os estudos metabolómicos realizados até ao momento centrados neste tipo de diferenciação. Como os lípidos desempenham um papel essencial como componentes estruturais e na regulação do comportamento de SCs [63], a lipidómica é uma área emergente neste contexto específico, contudo ainda existem relativamente poucos estudos dedicados à diferenciação osteogénica. Desta forma, tentar-se-á sempre que possível relacionar o metaboloma apolar e polar.

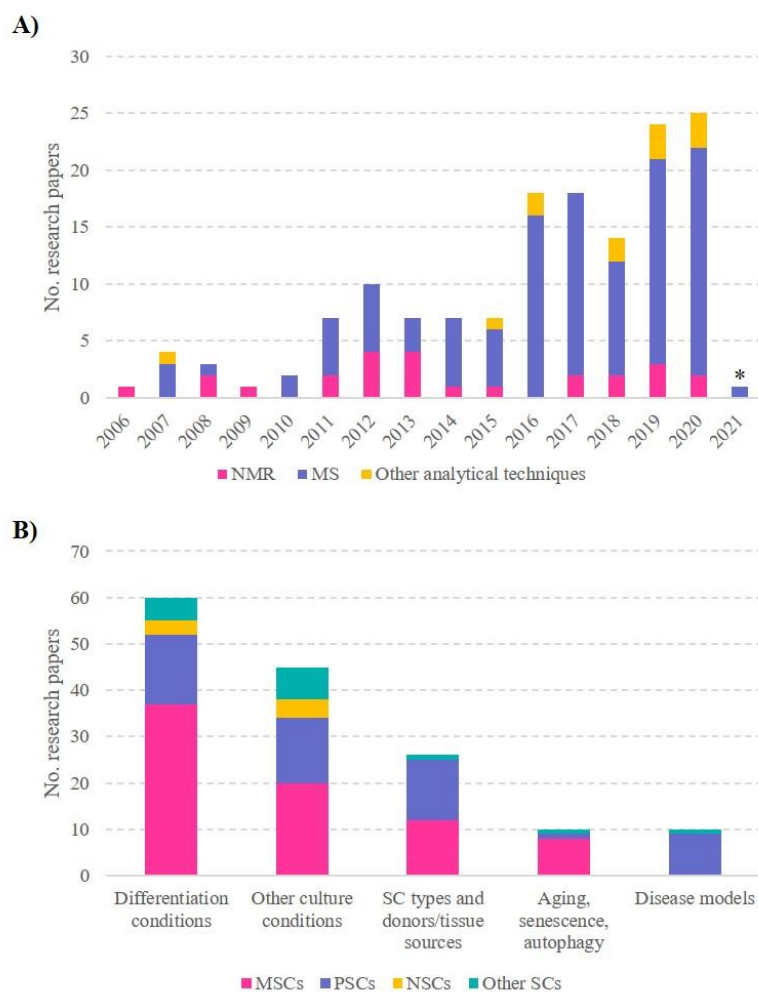


Fig. 19 – Estudos metabolômicos em células estaminais. (A) Número de estudos por ano em função da técnica analítica empregue. (B) Número de estudos nos principais tópicos estudados até à data. Adaptado de [62].

### 1.5.1. Estudos por LC-MS

Provavelmente devido à mais ampla deteção de moléculas, especialmente de moléculas maiores de difícil volatilização (processo necessário em GC-MS) [64], a técnica LC-MS tem sido a mais empregue nos artigos de exploração metabolómica no contexto da osteogénese. Até à data, a maioria dos estudos incidentes na osteogénese recorreram a MSCs isoladas da medula óssea [25,65–68]. Regra geral, analisaram-se compostos polares [65–67], seguindo-se alguns exemplos onde estudaram apolares [69–71], sendo raro o estudo completo e detalhado dos perfis lipídicos. Enquanto alguns estudos promoveram a osteogénese em meios osteoindutivos mais clássicos [65,68,71,72], a maioria dos estudos encontrados tiraram partido das propriedades físicas dos bio-materiais, induzindo-se a osteogénese principalmente através de nanotopografia e estímulos mecânicos [66,69,70,73–78].

### Indução osteogénica em superfícies nanotopográficas

As superfícies nanotopográficas foram das primeiras estratégias indutoras de osteogénese a ser abordadas em estudos metabólicos [67,73,79]. Inicialmente, estudou-se o efeito de substratos derivados de titânio formados por nanopilares de diferentes alturas durante 7 dias, com 15 nm a demonstrar o processo de osteogénese mais eficaz em hBMMSCs [66]. Nesta condição, os autores pensam que o aumento de ácido linoleico e lipoato (antioxidantes) ajudaram na promoção da osteogénese, uma vez que a modulação do estado redox foi previamente sugerido como requisito na diferenciação de outras SCs [80]. Além da sua função antioxidante, o ácido lipóico (ácido conjugado do lipoato) é um importante cofator na cadeia transportadora de eletrões da respiração aeróbica, pensando-se que o seu aumento facilitou a transição de um estado indiferenciado para células diferenciadas [81]. O aumento da esfingosina (lípidio membranar) observado foi relacionado com a prevenção da acumulação de osteoclastos *in vivo* na interface osso-implante [66]. Por último, o aumento da maioria dos aminoácidos está em concordância com outros estudos em que houve um aumento geral da demanda metabólica de células durante o processo de osteogénese [82]. Noutro estudo [78], recorrendo a nanosuperfícies com pontos, observou-se que o espaçamento irregular entre estes se traduzia na osteoindução (por se formarem adesões mais compridas), enquanto que o espaçamento equidistante dos pontos resultava na manutenção do estado de multipotência de hMSCs (células com adesões mais curtas). Adicionalmente, os autores identificaram a integrina  $\beta 3$  (recetor transmembranar envolvido em adesões célula-célula e célula-matriz extracelular) como responsável pela sensibilidade ao ambiente topográfico (pontos mais ou menos distantes, neste caso). Enquanto que o perfil metabólico das hMSCs cultivadas em pontos equidistantes sofreu poucas alterações nos primeiros 3 dias de culturas, a nanotopografia irregular promotora de osteogénese resultou no aumento de metabolitos envolvidos no metabolismo de aminoácidos (ornitina, pantoténato, oxoprolina, colina, 4-guanidinobutanoato, entre outros), de hidratos de carbono (arabinonato, xilulose, ácido glucónico, entre outros) e de lípidos (dietanolamina, acetilcolina, entre outros) [78]. Os autores sugeriram que estas diferenças metabólicas se possam relacionar com as vias de sinalização ERK1/2 (do inglês *Extracellular signal-Related Kinase 1/2*), JNK (do inglês *c-Jun N-terminal kinase*) e LDL (do inglês *Low-Density Lipoprotein*).

Posteriormente, recorreram a superfícies nanotopográficas baseadas em policaprolactona e corpos de inclusão bacteriana (IB) com propriedades variáveis (topografia, rigidez e molhabilidade) por forma a induzir a osteogénese de MSCs [73]. Como pode observar-se na Fig. 20, ao fim de 7 dias de cultura notou-se uma hiperatividade metabólica generalizada (principalmente em IB do tipo ClpA, os mais osteoindutivos), caracterizada pelo aumento de metabolitos importantes no metabolismo de hidratos de carbono como a frutose/manose (sorbitol) e o glioxilato/dicarboxilato (2-hidroxi-3oxoadipato), metabolismo de nucleótidos (envolvidos no metabolismo da purina e pirimidina), metabolismo de lípidos (como a citidina difosfato etanolamina, necessária na síntese de glicerosfosfolípidos) e da biossíntese de ácidos gordos [73]. Posteriormente, avaliaram-se hBMMSCs cultivadas em nanointerfaces com regulação da percentagem de adesão célula-nanointerface, sendo que mais



adesões promoveram a diferenciação osteogénica (devido ao aumento das tensões intracelulares) e menos adesões induziram a adipogénese [74]. Nas hBMSCs osteoinduzidas, verificou-se uma diminuição de lípidos insaturados (4-hidroxinonal, 3-nonal, ácido 2E,4E-undecadienóico, 2-heptanal, ácido (+)-7-isojasmónico, (2E,4E)-hepta-2,4-dienal) ao longo dos 7 dias analisados, o que vai de encontro de outros estudos que associam a diferenciação de vários tipos de SCs a um perfil lipídico cada vez mais saturado [63]. Contudo, analisando MSCs num estado mais avançado de osteogénese, Levental *et al.* [25] demonstra o enriquecimento em ácidos gordos longos e insaturados ao longo da diferenciação.

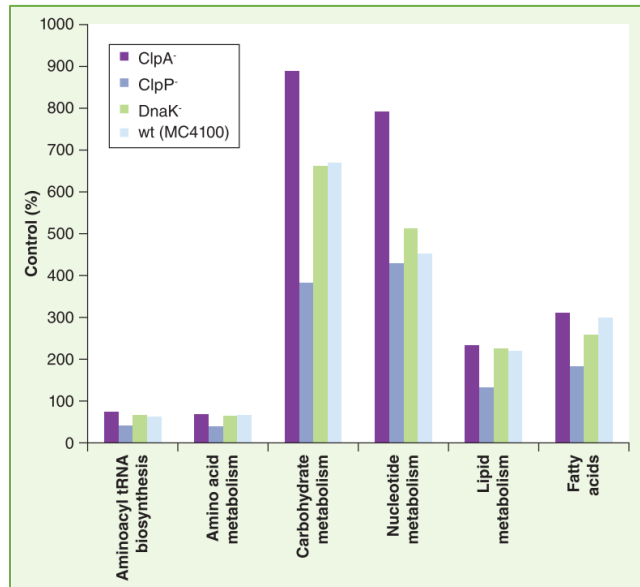


Fig. 20 – Principais vias metabólicas alteradas durante a osteogénese promovida por corpos de inclusão bacteriana de diferentes características derivados do wild-tipe (wt), nomeadamente ClpA<sup>-</sup>, ClpP<sup>-</sup> e DnaK<sup>-</sup>. Adaptado de [73].

Estudou-se também a interação entre hAMSCs e um nanocomposto 3D formado por poliuretano, nano-hidroxiapatita e partículas de osso descelularizadas, durante 5 dias [75]. A partir de dados metabolómicos e transcriptómicos, os autores notaram a importância das vias de sinalização

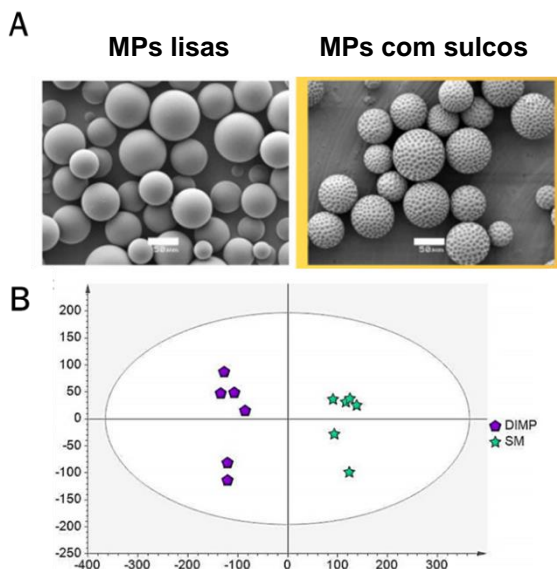


Fig. 21 – A) Imagem de microscopia eletrónica de varredura das micropartículas (NPs) lisas e com sulcos. B) Gráficos de scores de PLS-DA ortogonal a comparar os exometabolomas das células cultivadas com NPs lisas (SM) e NPs com sulcos (DIMP). Adaptado de [77].

de HH (do inglês *HedgeHog*), Wnt (do inglês *Wingless-related iNTEgration site*) e BMP na osteogénese neste nanocomposto 3D [75]. Numa publicação muito recente [77] estudou-se o efeito de micropartículas nanotopograficamente texturizadas (Fig. 21A) na indução osteogénica de hBMSCs, analisando-se o exometaboloma ao dia 15, sendo que as células exibiram exometabolomas claramente diferentes consoante as micropartículas em que eram cultivadas (Fig. 21B). As células cultivadas sobre micropartículas texturizadas com sulcos apresentaram a resposta osteogénica mais intensa, caracterizando-se por hiperatividade das vias da biossíntese de aminoacil-tRNA, do metabolismo de aminoácidos e metabolismo energético, bem como o aumento de diversas

espécies lipídicas, incluindo um derivado da vitamina D3, a lisofosfatidilcolina(18:0) e diversos ácidos gordos (como os ácidos araquidónico, 2-amino-tetradecanóico, esteárico, acetoacético, oleico e hexadecanóico) [77]. Com base nos resultados obtidos, os autores consideraram as vias ERK, da IL-6 e da JNK muito relevantes para a osteogénese. Destacou-se também o metabolismo da arginina (auxiliando a regeneração óssea através da produção de óxido nítrico) [83] e prolina (um componente crucial do colagénio) [84]. Por fim, os autores sugerem que a osteoindução pronunciada esteja relacionada com o aumento da atividade da iNOS (do inglês *inducible Nitric Oxide Synthase*) e subsequente aumento da produção de óxido nítrico [85].

#### Osteoindução por suplementação do meio de cultura

Tirando partido de uma abordagem mais clássica de indução osteogénica (suplementação do meio de cultura), Surrati *et al.* [72] estudaram o exometaboloma de BMMSCs de ratinhos aos dias 5, 10 e 15. A Fig. 22A apresenta os resultados da análise supervisionada PLS-DA ortogonal

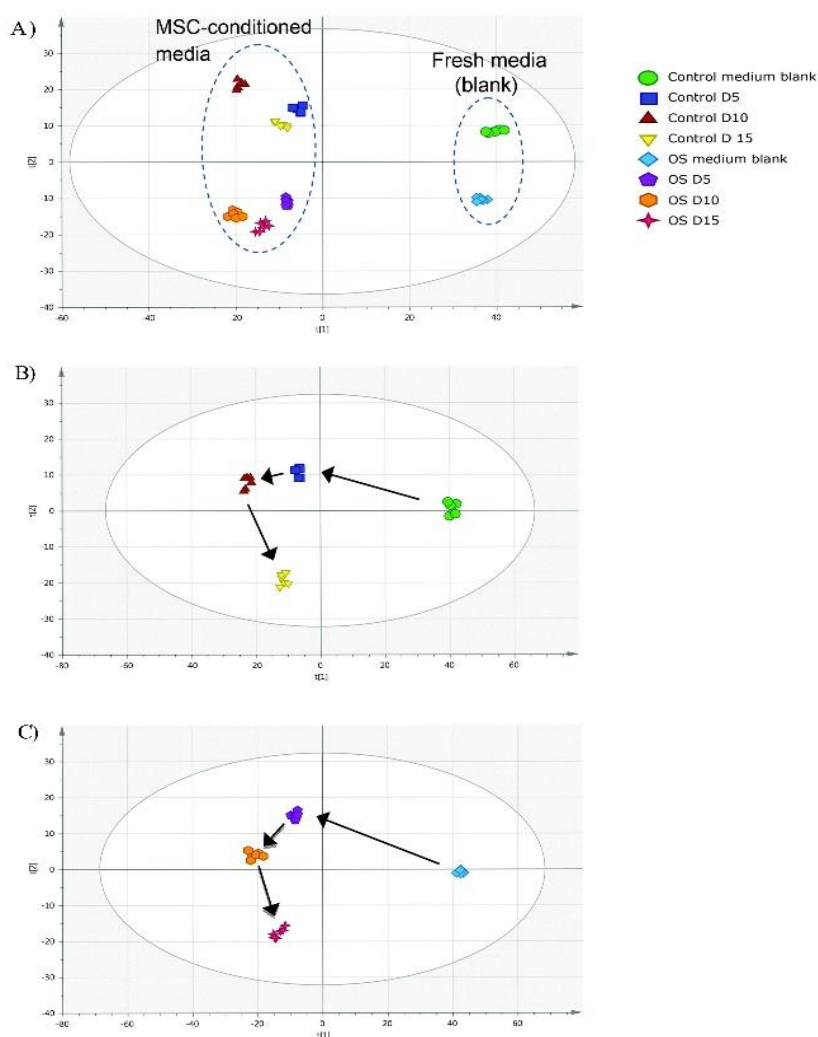


Fig. 22 – Gráficos de scores de PLS-DA ortogonal de meios de cultura comparando: a) meios com e sem exposição a células (meios controlo e osteogénico comparado com meios branco), b) trajetória metabólica das amostras controlo, c) trajetória metabólica das amostras osteogénicas (OS). Adaptado de [72].

obtidos, mostrando a aquisição de perfis metabólicos totalmente diferentes entre os meios controle (basal), osteogénico (com dexametasona) e brancos (sem exposição a células). Além disso, as células cultivadas em meios controle e osteogénico exibiram claras e diferentes trajetórias metabólicas (Fig. 22B,C). Mais especificamente, a diferenciação foi relacionada com a diminuição de glicerol-3-fosfato e o aumento de citrato, *cis*-aconitato, 2-oxoglutarato, glutamato, succinato e de metabolitos resultantes do metabolismo de  $\beta$ -glicerofosfato (glicerol e ortofosfato). Foi sugerido que o aumento do ortofosfato inibe a enzima ALP (fosfatase alcalina, do inglês *ALkaline Phosphatase*), evento que ocorre numa fase mais avançada de diferenciação osteogénica [86]. Relativamente ao 2-oxoglutarato (precursor da hidroxiprolina, um aminoácido essencial útil na proteção óssea), o seu aumento significativo no meio osteogénico pode estar relacionado com a proteção óssea [87]. Além de estar relacionado com o ciclo de *Krebs*, o aumento extracelular do citrato mostrou-se extremamente importante na nanoestrutura orgânica do osso [88]. Outros compostos, como o succinato e a desoxiuridina (envolvida na síntese de nucleósidos [89]), demonstraram um padrão semelhante no controle e na osteogénese [72], estando possivelmente relacionados com a permanência em cultura, independentemente do estado de diferenciação.

Mais recentemente, examinaram-se extratos lipídicos de MSCs provenientes de tecido adiposo (AMSCs) e muscular (MMSCs) de coelhos, sujeitas à osteogénese [71]. Independentemente do tecido de origem, no final da osteogénese (dia 21) destacaram-se 3 *N*-Acilfosfatidiletanolaminas (NAPEs, do inglês *N-AcylPhosphatidylEthanolamines*), sendo que a NAPE 58:2+NH<sub>4</sub> (-FA 17:0 (NH<sub>4</sub>)) e a NAPE 56:2+NH<sub>4</sub> (-FA 17:0 (NH<sub>4</sub>)) aumentaram e a NAPE 54:7+NH<sub>4</sub> (-FA 17:0 (NH<sub>4</sub>)) diminuiu, podendo servir como biomarcadores da diferenciação osteogénica. Por ação da enzima NAPE-PLD (do inglês *N-acyl-Phosphatidyl Ethanolamine-specific PhosphoLipase D*), as espécies NAPEs são transformadas em moléculas que interagem com os recetores canabinóides tipo 1 e tipo 2 (CB1 e CB2) [90]. Deste modo, os autores [71] pensam que a sobreexpressão destas espécies NAPEs se relaciona com a de recetores canabinóides característico da osteogénese em MSCs [91]. Além disso, sabe-se que a estimulação do CB-2 aumenta a formação de osso e limita a sua reabsorção [92].

Também se explorou o efeito da adição do carotenóide astaxantina (precursor da vitamina A) na osteogénese de BMMSCs de ratos, passados 21 dias em cultura [68]. Houve o aumento de ácido oleico e de lisofosfatidilcolina 21:4(6Z,9Z,12Z,15Z) e a diminuição de ácido palmítico e de lisofosfatidilcolina P-17:0. O enriquecimento em ácido oleico foi sugerido como medida preventiva da morte celular induzida por ácido palmítico [93]. A mineralização das células expostas a astaxantina foi superior às células controle, indicando a importância deste composto na osteogénese. Observou-se ainda que os níveis de fosfolípidos eram mais elevados nos osteoblastos do que nas células indiferenciadas, podendo servir como marcador da diferenciação osteogénese [68]. A astaxantina também teve impacto nos níveis de vários metabolitos polares, com o aumento de metionina, tirosina e ácido o-cumárico e a diminuição de lisina, ácido L-pipecólico, histidina, arginina, frutose e aspartato. As vias metabólicas mais afetadas pelo tratamento com astaxantina foram o metabolismo

da fenilalanina, a biossíntese de fenilalanina, tirosina e triptofano e ainda a biossíntese de pantotato e CoA [68].

Muito recentemente, foi reportado um estudo simultâneo dos endo- e exo-metabolomas aos dias 0, 14 e 21 da osteogênese [65]. Salieta-se que os autores recorreram a uma linhagem celular imortalizada [94], não refletindo necessariamente as alterações metabólicas decorrentes da diferenciação em MSCs não modificadas geneticamente. Nas células osteoinduzidas, o aumento intracelular de sacaropina, pipercolato e ácido alfa-aminoadípico relacionou-se com a degradação da lisina contribuindo, respetivamente, para o equilíbrio geral de azoto, a conversão controlada de lisina em corpos cetónicos e a formação de colagénio (proteína também presente no osso) [95–97]. Outras vias que se destacaram durante a osteoindução estavam relacionadas com o metabolismo da arginina e da prolina, devido ao aumento intracelular de glutamato 5-semialdeído, citrulina, S-adenosil-L-metionina, 4-hidroxi-2-oxoglutarato e acetilputrescina [65]. A prolina é um aminoácido constituinte do colagénio [97] e a arginina é importante na cicatrização óssea, pela sua conversão em citrulina e óxido nítrico [83]. A hidantoína-5-propionato e 4-imidazolona-5-propanoato, que aumentaram extracelularmente durante a osteogênese, são metabolitos da histidina, aminoácido este que por sua vez diminuiu intracelularmente neste processo [65].

#### Efeito de nanovibrações na diferenciação osteogénica

Recentemente, um grupo de investigadores estudou detalhadamente o efeito de nanovibrações na diferenciação osteogénica de hBMMSCs, desenvolvendo e aperfeiçoando um biorreator nanovibracional [69,70,76]. Em 2017 analisaram o efeito de nanovibrações (1 kHz) em hidrogéis de colagénio 3D, bem como a influência dos canais TRPV (do inglês *Transient Receptor Potential cation channels*) e da PKC (do inglês *Protein Kinase C*) na osteogênese [76]. Notaram no 5º dia de diferenciação o aumento de metabolitos envolvidos nas vias de sinalização ERK e Wnt, acontecendo o oposto com a inibição de TRPV e PKC, o que indicou a importância da via TRP- $\beta$ -catenina no processo de osteogênese por nanovibrações. Também houve um aumento de diversos metabolitos do metabolismo energético (perfis de hidratos de carbono e de lípidos), relacionados com as vias de sinalização da adesão, da tensão citoesquelética, da ERK1/2, da BMP2 e do Wnt/cálcio [76]. Mais recentemente, foram comparadas diferentes amplitudes nanovibracionais, mostrando-se uma separação muito clara no 14º dia de osteogênese entre grupos testados (0, 30 e 90 nm) [70]. As hBMMSCs estimuladas com a maior amplitude (90 nm), que se revelou aquela com maior eficácia osteogénica, exibiram um enriquecimento em metabolitos intermediários da glicólise, via das pentoses-fosfato (PPP, do inglês *Pentose Phosphate Pathway*), ciclo de *Krebs*, fosforilação oxidativa e  $\beta$ -oxidação. A consequente geração de ROS (do inglês *Reactive Oxygen Species*) e de marcadores de inflamação como IL-6 e NF $\kappa$ B (do inglês *Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) é invertida, em seguida, por vias de equilíbrio redox como PPP e SOD (Superóxido Dismutase) e vias de mediação de inflamação. Este tipo de resposta relaciona-se com as fases iniciais da regeneração de fraturas ósseas [14]. Os autores reportam ainda o aumento de vários canais iónicos

mecanosensíveis (TRP, do inglês, Transient Receptor Potential) responsáveis pela transdução de forças vibracionais [70,98]. O incremento da expressão de integrinas observado traduziu o aumento no nível de adesões requerido aquando da osteogénese [70]. Muito recentemente, compararam células osteoinduzidas pelas nanovibrações às submetidas ao meio osteoindutivo clássico, as quais demonstraram perfis metabólicos semelhantes no 14<sup>o</sup> dia de osteogénese [69]. Curiosamente, no dia 7 notaram-se algumas diferenças, indicando a provável modulação de diferentes vias. De facto, a via JNK aumentou no grupo das nanovibrações e diminuiu no grupo do cocktail osteoindutivo, sendo sugerida como potenciadora de uma diferenciação osteogénica mais eficiente [69]. Adicionalmente, testaram-se potenciais compostos osteoindutores com base no consumo de metabolitos específicos presentes no meio de cultura ao longo primeira semana de osteogénese, seleccionando-se o sulfato de colesterol (Fig. 23a) como o mais eficaz. Este esterol da membrana celular contribui

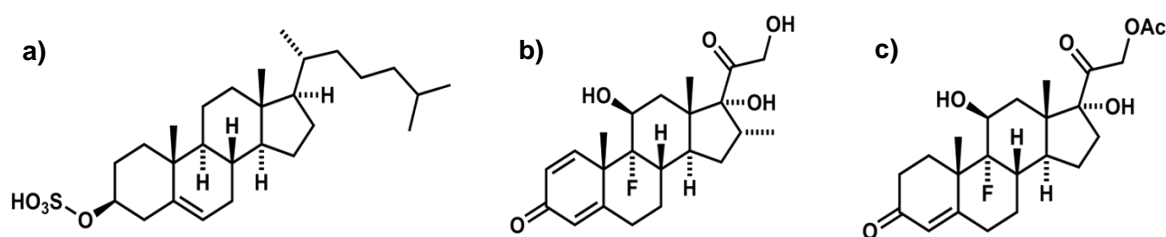


Fig. 23 – Estruturas de compostos osteoindutivos derivados de colesterol. a) Sulfato de colesterol. b) Dexametasona. c) Acetato de fludrocortisona. Adaptado de [69].

para o suporte estrutural e funciona como uma molécula reguladora associada à família do TGFβ, fazendo também parte desta família a BMP2, que contém propriedades osteogénicas [99][100]. Em busca de maior potência e especificidade osteoindutiva, testaram outros potenciais osteoindutores com estruturas moleculares semelhantes ao sulfato de colesterol e à dexametasona (esterol comumente usado na suplementação osteoindutiva - Fig. 23b), onde se destacou o mineralocorticoide e glucocorticoide acetato de fludrocortisona (Fig. 23c) [69]. Neste estudo, o acetato de fludrocortisona e a dexametasona (metabolizados no interior das células) aumentaram a tensão citoesquelética, mas o sulfato de colesterol não. Este último, ao ficar retido na membrana celular, afetou as propriedades mecânicas das células. Por outro lado, o acetato de fludrocortisona e o sulfato de colesterol diminuiram a rigidez celular, ao contrário da dexametasona.

### 1.5.2. Estudos por GC-MS

O lipidoma de MSCs aos longo da diferenciação osteogénica ainda não foi explorado em detalhe por GC-MS, salientando-se nesta secção os únicos dois artigos que se basearam nesta técnica analítica. É de notar que o metaboloma polar de MSCs já foi mais explorado por GC-MS, apresentando-se na Fig. 24 um cromatograma típico destas células. Apesar de se recorrer menos a GC-MS na metabolómica da osteogénese de MSCs, esta é uma técnica importante, capaz de uma melhor separação entre metabolitos, a uma fração do custo de LC-MS [101].

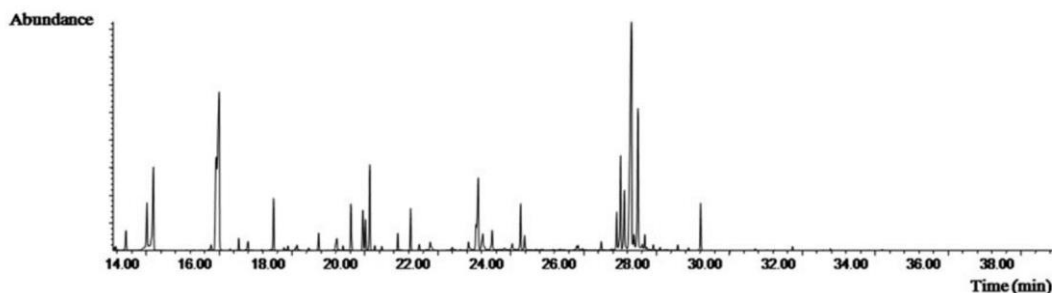


Fig. 24 – Cromatograma de GC representativo do metaboloma polar de células estaminais mesenquimais de medula óssea humana. Adaptado de [123]

Em 2017, recorreu-se a GC-MS para comparar a eficiência osteogénica entre dexametasona e BMP-2 em MSCs do sangue do cordão umbilical de humanos aos dias 7, 14 e 21 de culturas [102]. Como pode constatar-se comparando as Fig. 25A e Fig. 25B, a osteogénese foi menos eficiente com BMP-2, obtendo-se no dia 21 um perfil metabólico mais distinto dos osteoblastos primários. Logo a partir do dia 7, no grupo tratado com dexametasona, houve aumentos significativos de colesterol e precursores de glicerolípidos e de fosfolípidos (glicerol e *myo*-inositol). Além destas, muitas outras alterações metabólicas decorreram da osteogénese com ambos os osteoindutores (Fig. 26), tendo-se observado um atraso de 7 dias por parte do grupo BMP-2 em grande parte destas relativamente ao grupo da dexametasona. Ao fim da diferenciação, em relação aos osteoblastos primários, as células tratadas com BMP-2 exibiam níveis inferiores de precursores de glicerolípidos, e superiores de precursores de fosfolípidos, enquanto as células do grupo da dexametasona apresentavam níveis superiores de precursores de lípidos. Os autores propuseram que a ativação metabólica mais intensa no grupo da dexametasona resultava da necessidade de moléculas mais simples (como aminoácidos e lípidos) que apoiassem o processo de diferenciação [102]. Durante a

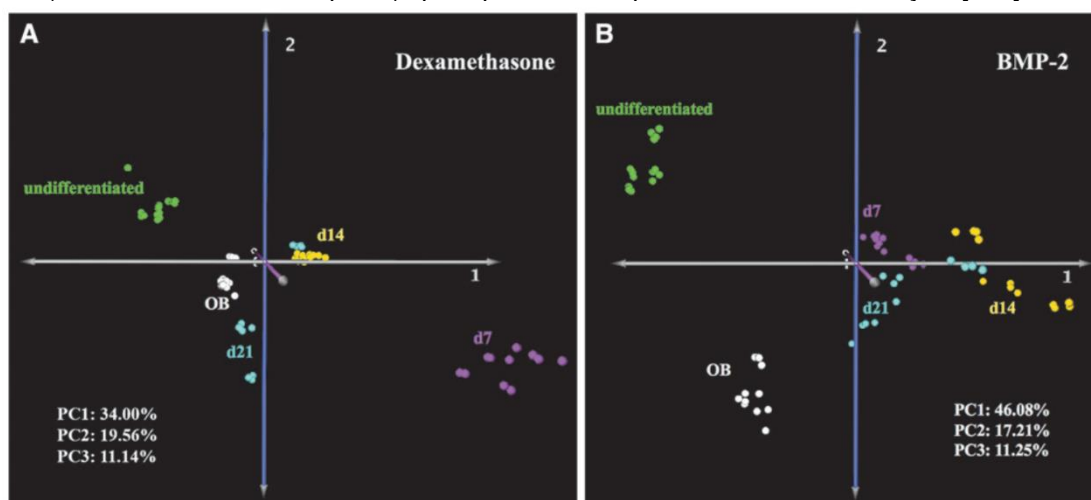


Fig. 25 – Gráfico de scores de PCA comparando a ação da dexametasona e de BMP-2 (Bone Morphogenetic Protein 2) aos dias 7, 14 e 21 de cultura com células estaminais mesenquimais e com osteoblastos primários. Adaptado de [102].

diferenciação, os autores descrevem uma transição da glicólise para a fosforilação oxidativa, apoiando estudos anteriores [103], sendo que no final da experiência (dia 21) o grupo da dexametasona apresentou diminuição das taxas glicolíticas, da atividade do ciclo de *Krebs* e da glutaminólise [102].

Mais recentemente, o mesmo grupo de investigadores explorou a osteogênese, desta vez em culturas 3D [104], onde se encapsularam MSCs em diferentes hidrogéis de alginato oxidado (ADA, do inglês *alginate di-aldehyde*). Ao fim da experiência (dia 21), os hidrogéis ADA funcionalizados com um péptido de glicina-histidina-lisina (GHK) induziram uma osteogênese mais eficaz, com as células diferenciadas a exibirem perfis metabólicos mais homogêneos entre si e semelhantes aos osteoblastos primários [104]. À semelhança do estudo anterior, o dia 21 caracterizou-se pela diminuição das vias da glicólise, do ciclo de *Krebs*, da glutaminólise e do ciclo da ureia, refletido pelo decréscimo da glucose, piruvato, intermediários do ciclo de *Krebs*, glutamina, ureia e ácido N-acetilglutâmico [104]. Outra tendência observada foi o aumento do nível dos lípidos, relacionado com

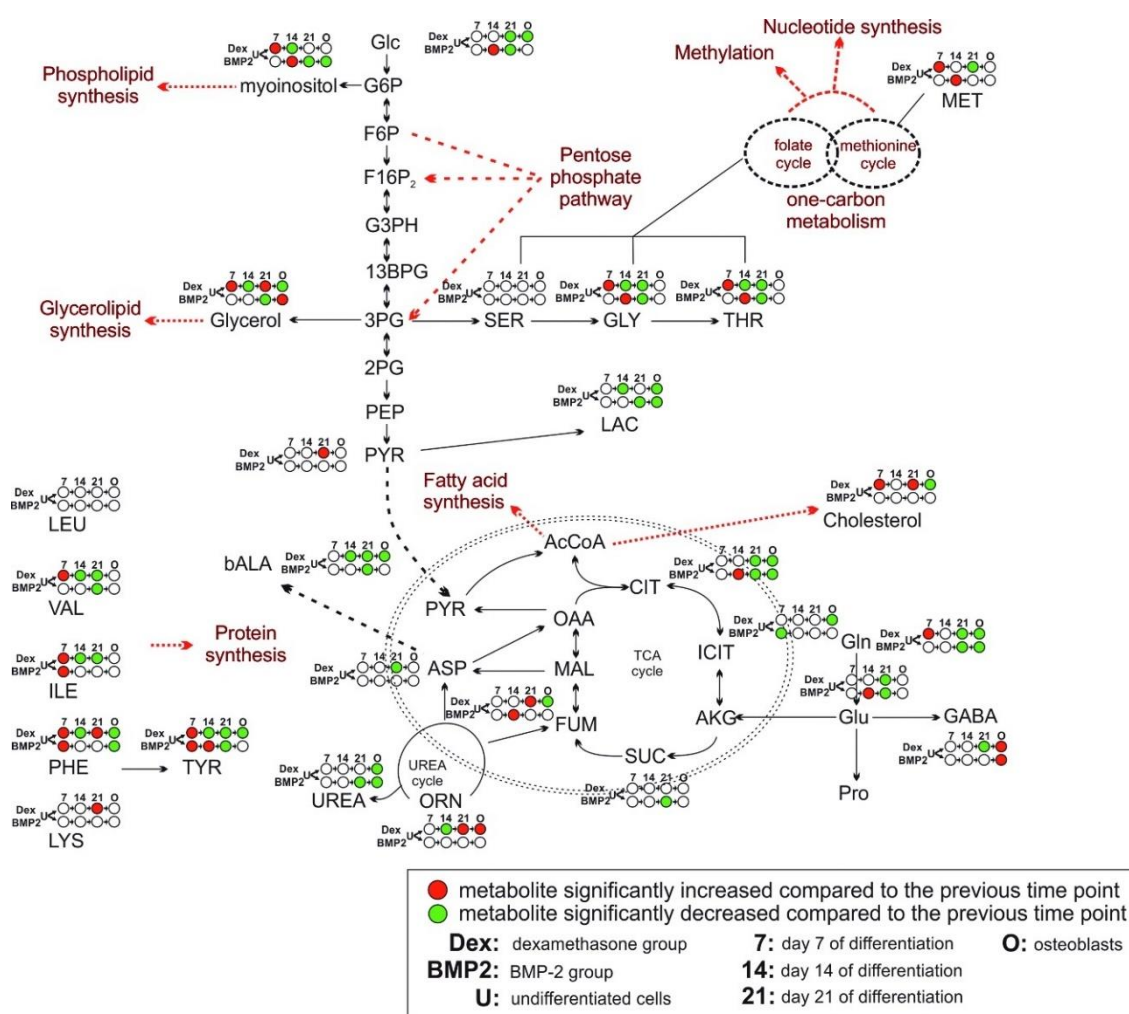


Fig. 26 – Principais alterações metabólicas em timepoints consecutivos decorrentes da osteogênese promovida por Dex (dexametasona) e BMP-2 (Bone Morphogenetic Protein 2). Considerou-se como início da experiência células indiferenciadas (U) e o último dia foi diretamente comparado com osteoblastos primários (O). Níveis aumentados e diminuídos foram representados por vermelho e verde, respetivamente. Adaptado de [102].

aumento da atividade da sinalização relativa a lípidos. Os autores pensam que o efeito osteogénico do hidrogel ADA-GHK advém da interação GHK-integrinas, resultando na ativação da cinase ligada à integrina (ILK) [104]. A ILK controla a proliferação e migração através de vias como a PI3K-AKT-mTOR que, por sua vez, regula a biossíntese lipídica [105,106].

#### **1.6. Objetivos da presente dissertação**

Esta dissertação de mestrado tem o objetivo de avaliar o perfil lipídico por GC-MS, pela primeira vez, de AMSCs humanas osteoinduzidas em culturas 2D durante 21 dias, comparando-o com a evolução das mesmas células em condições controlo. Pretende-se complementar estudos de lipidómica por LC-MS e GC-MS focados na osteogénese previamente referidos, que até agora recorreram maioritariamente a BMMSCs, com apenas um estudo onde se analisou AMSCs de coelho por LC-MS [71]. No final deste trabalho sugerem-se potenciais marcadores osteogénicos de hAMSCs, cujas variações foram diferentes nas células osteoinduzidas e controlo.



## 2. Materiais e métodos

### 2.1. Expansão de MSCs de tecido adiposo humano (hAMSCs)

As hAMSCs (*American Type Culture Collection*, ref. ATCC PCS-500-011) na passagem 5 foram descongeladas e colocadas em 6 frascos de cultura (T175), onde foram expandidas (37°C, 5% de CO<sub>2</sub>) em meio essencial mínimo alfa ( $\alpha$ -MEM, Gibco™ 12000063) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal de bovino (FBS, Gibco™ 10270106) termicamente inativado e com 1% (v/v) dos antibióticos penicilina-estreptomicina (Gibco™ 15240062). Durante a expansão celular, o meio de cultura foi trocado 2x por semana. Alcançada uma confluência perto de 100%, as células foram lavadas com tampão fosfato de Dulbecco sem Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup> (dPBS, Corning® 55-031-PC), sendo depois desagregadas do frasco ao adicionar uma solução a 0,25% (v/v) de tripsina-EDTA (Gibco™ 27250018). Após uma incubação de 5 minutos a 37°C, a reação de desagregação foi interrompida pela adição de meio  $\alpha$ -MEM. A suspensão celular obtida foi distribuída em 36 frascos, com uma densidade de aproximadamente 0,5 x 10<sup>6</sup> células/frasco (passagem 6), tendo-se iniciado a indução osteogénica assim que se chegou a uma confluência de 100%.

### 2.2. Indução da diferenciação osteogénica

No dia 0 da diferenciação osteogénica trocou-se o meio de cultura de todos os 36 frascos, em metade deles colocou-se novamente meio basal (frascos CTR) e, nos restantes (frascos OST), o meio  $\alpha$ -MEM foi suplementado osteoindutores, nomeadamente, 10 mM de  $\beta$ -glicerofosfato (Sigma-Aldrich G9422), 50  $\mu$ g/mL de ácido ascórbico (Sigma A0278) e 10 nM de dexametasona (ACROS Organics™ 230300010). Tanto o meio controlo, como o meio osteogénico foram trocados 2x por semana ao longo de 21 dias. Nos dias 1, 4, 7, 14 e 21, as células de 3 frascos CTR e 3 frascos OST foram tripsinizadas (como descrito acima), filtradas (poros de 100  $\mu$ m) e centrifugadas (300 g, 4°C, 5 min). O *pellet* obtido foi ressuspensão em dPBS e as células foram contadas numa câmara de *Neubauer*, recolhendo-se pelo menos 1x10<sup>6</sup> de células por amostras para a análise por GC-MS. Repetiu-se a centrifugação e a lavagem com dPBS para evitar a contaminação com meio de cultura. Os *pellets* foram armazenados a -80°C até à extração de metabolitos.

### 2.3. Extração de metabolitos intracelulares

Os metabolitos foram extraídos usando uma adaptação do método do metanol-clorofórmio-água [107]. Resumidamente, as células dos *pellets* (3 réplicas para cada dia de cada condição) foram ressuspensas em 1 mL de uma solução fria de metanol (Honeywell Riedel-de-Haën™ 14262) e água milliQ (4:1), transferindo-se para tubos de vidro com 150 mg de *beads* de vidro ( $\varnothing$ = 0,5 mm). Depois de se vortexar durante 2 min (2500 rpm), adicionou-se 400  $\mu$ L de clorofórmio frio (Honeywell Riedel-de-Haën™ 650471), agitando-se novamente no vórtex (2 min, 2500 rpm). Adicionou-se 400

$\mu\text{L}$  de clorofórmio frio e 360  $\mu\text{L}$  de água miliQ fria (também agitado por 2 min a 2500 rpm). Após 10 min a  $-20^{\circ}\text{C}$ , as amostras foram centrifugadas (2000 g, 20 min), as fases polares e apolares foram separadas. Depois, os extratos aquosos foram secos no SpeedVac e os lipídicos com o recurso a um jato de azoto. Neste trabalho, apenas se utilizaram os extratos lipídicos para a análise por GC-MS.

## 2.4. Análise de extratos lipídicos por GC-MS

### Derivatização por trimetilsililação

A cada extrato apolar adicionou-se 50  $\mu\text{L}$  de N,O-bistrifluoroacetamida (BSTFA, ref. 15222, Sigma-Aldrich), 47  $\mu\text{L}$  de piridina (ref. P0671016, Carlo Erba Reagents), 3  $\mu\text{L}$  de uma solução de tetracosano (ref. T8752, Aldrich) a 0,5 g/L em piridina e, finalmente, 10  $\mu\text{L}$  de clorotrimetilsilano (TMCS, ref. 10214520, Acros Organics). Os reagentes BSTFA, TMCS e piridina são comumente utilizados na trimetilsililação de hidrogénios ativos (como são o caso em hidrogénios dos grupos de álcoois ou ácidos carboxílicos), enquanto o tetracosano serve como padrão interno. Mais especificamente, o BSTFA tem grande facilidade em doar um grupo trimetilsililo, o TMCS age como um catalisador da reação e a piridina facilita a reação de trimetilsililação (Fig. 27). De seguida, colocou-se o vial de vidro tapado num banho de óleo mineral a  $70^{\circ}\text{C}$ , durante 30 minutos, deixando-se arrefecer por 10 minutos antes de transferir a amostra para um *insert* de vidro adequado para posterior injeção de 0,4 $\mu\text{L}$  no sistema GC-MS.

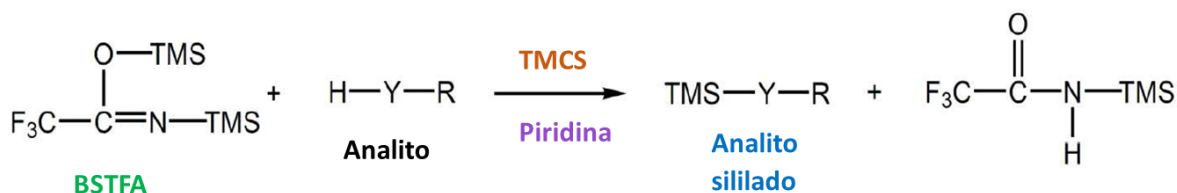


Fig. 27 – Reação de trimetilsililação, onde o hidrogénio ligado a oxigénio, enxofre ou azoto (representado por Y) é substituído por um grupo trimetilsililo (TMS).

### Ajuste dos parâmetros da corrida de GC-MS

Para a seleção do volume de injeção e razão de *split*, recorreu-se a amostras de células hAMSCs proliferadas em meio basal, extraindo-se diferentes números de células estimadas (contagem em câmara de *Neubauer*): 64 000 células, equivalente a 2% do volume do frasco de cultura; 320 000 células, equivalente a 10% do volume do frasco de cultura; 640 000 células, equivalente a 20% do volume do frasco de cultura. Experimentaram-se as razões *split* 1:50, 1:20, 1:15 e ainda *splitless*, havendo mais informação no cromatograma em *splitless*. Testaram-se ainda os volumes de injeção 1 $\mu\text{L}$ , 0,6 $\mu\text{L}$ , 0,4 $\mu\text{L}$  e 0,2 $\mu\text{L}$ . Através destes ensaios e ainda recorrendo a uma das amostras desta experiência, verificou-se que o volume de injeção ideal seria 0,4 $\mu\text{L}$  em modo *splitless*.

### Análise por GC-MS

Neste trabalho, o sistema GC-MS utilizado (GCMS-QP2010 Ultra, Shimadzu) possuía ionização por EI, um quadrupolo como analisador de massa e o detetor multiplicador de elétrons de dínodo contínuo. A coluna GC usada foi a DB-1ms (ref. 123-0132, Agilent J&W), com 30 metros de comprimento, 0,25µm de espessura e 0,32 mm de diâmetro interno. Recorreu-se ao hélio como gás de corrida, comumente usado. A injeção das amostras (em duplicado) ocorreu em modo *splitless*, à temperatura de 250°C e cada corrida demorou 72,5 minutos no total. Já a temperatura no forno da coluna GC começou aos 80°C e manteve-se até aos 5 minutos, aumentando linearmente em seguida até aos 260°C, atingidos aos 50 minutos de corrida. Após outro aumento linear, alcançou-se 285°C aos 62,5 minutos, mantendo-se esta temperatura constante até aos 72,5 minutos. Os cromatogramas foram gravados entre os minutos 5 e 72,5. Cada espectro de massa obteve-se em intervalos de 300 ms, e entre as razões *m/z* 35 e 700, originando 13 500 espectros por amostra. Procedeu-se à lavagem da coluna de GC através da injeção de diclorometano (ref. 131254, Pan-reac) entre cada conjunto de amostras consecutivas (geralmente 5) e também entre sessões.

Para controlo de qualidade, analisaram-se por GC-MS diversas misturas de compostos padrão em piridina (misturas A-E na Tabela 3) contendo volumes variáveis de ácido palmítico (ref. P0500, Sigma), ácido araquidónico (ref. 10931, Sigma), ácido linoleico (ref. L1376, Sigma), ácido docosahexaenóico (ref. D2534, Sigma), 1-pentadecanol (ref. P1385, Sigma), colesterol (ref. C8667, Sigma) e tetracosano (ref. T8752, Aldrich).

Tabela 3 - Volumes das soluções-padrão de ácidos gordos, 1-pentadecanol, colesterol e do tetracosano para a determinação dos fatores de resposta por análise GC-MS.

Soluções-padrão preparadas	Volume (µL)				
	Mistura A	Mistura B	Mistura C	Mistura D	Mistura E
1-Pentadecanol 0,5 g L <sup>-1</sup>	1	2	3	4	5
Ácido palmítico 0,506 g L <sup>-1</sup>	2	3	4	5	6
Ácido araquidónico 0,499 g L <sup>-1</sup>	2	3	4	6	5
Ácido linoleico 0,495 g L <sup>-1</sup>	2	3	4	6	5
Ácido docosahexaenóico 0,490 g L <sup>-1</sup>	2	3	4	6	5
Colesterol 0,5594 g L <sup>-1</sup>	2	3	4	6	5
Tetracosano 0,5019 g L <sup>-1</sup>	3	3	3	3	3
Piridina	36	30	24	14	16

Para cada um dos compostos-padrão acima referidos calculou-se o fator de resposta (RF, Equação 5) e o coeficiente de variação (CV, Equação 6).

$$\text{Fator de resposta (RF)} = \frac{\text{massa real}}{\text{massa estimada}} \dots\dots\dots \text{Equação 5}$$

$$\text{Coeficiente de variação (CV, \%)} = \frac{\text{Desvio padrão do RF}}{\text{Média do RF}} \times 100 \dots\dots\dots \text{Equação 6}$$

Além de ser utilizado para o controlo de qualidade, o tetracosano costuma ser utilizado no método do padrão interno quantificação dos compostos presentes na amostra e para a normalização dos dados. No entanto, como neste caso se tentou recolher sempre o volume máximo da fase lipídica e não um volume fixo, teria que se adiciona o tetracosano antes do processo de extração (secção 2.3.), como está descrito frequentemente na literatura. Assim, os dados deste trabalho foram normalizados pela área total de cada cromatograma, compensando diferenças de volumes mencionadas (explicado na secção seguinte).

## 2.5. Identificação dos metabolitos e tratamento de dados

Recorrendo ao programa GCMS Postrun Analysis (Shimadzu), os metabolitos foram identificados com base no tempo de retenção dos cromatogramas de GC e nos padrões de fragmentação presentes nos espectros de massa. A identificação de vários compostos foi comprovada através da injeção de padrões externos no sistema GC-MS e pela consulta de bases de dados (por exemplo a NIST, do inglês *National Institute of Standards and Technology*). Os picos dos cromatogramas de GC correspondentes aos metabolitos identificados foram integrados usando GCMS Postrun Analysis e normalizados pela área total. As quantidades relativas dos metabolitos foram comparadas entre dias consecutivos (dias 1, 4, 7, 14 e 21) e entre dias extremos (dias 1 e 21). Recorrendo-se ao Python 3.9, calculou-se a significância estatística pelo teste não paramétrico de *Wilcoxon rank-sum*, considerando-se como diferença significativa p-values < 0,05 [108]. Também se calculou o *Effect size* (Equação 7) e erro correspondente (Equação 8) [109] no Excel, considerando-se como mais relevantes os metabolitos com |ES|> 0,5 e erro de ES <80%. Os principais resultados foram confirmados visualmente recorrendo ao Matlab (The MathWorks, Inc.) e apresentados sob a forma de *heatmaps* e de gráficos de linhas, obtidos no Python 3.9 e Excel, respetivamente.

$$\text{Effect size} = \frac{M_1 - M_2}{\sqrt{\frac{(n_1 - 1) \times SD_1^2 + (n_2 - 1) \times SD_2^2}{n_1 + n_2 - 2}}} \dots\dots\dots \text{Equação 7}$$

$$\text{Erro de ES (IC a 95\%)} = 1,96 \times \sqrt{\frac{n_1 + n_2}{n_1 \times n_2} + \frac{ES^2}{2(n_1 + n_2)}} \dots\dots\dots \text{Equação 8}$$

Em que “M” representa a média, “n” representa o número de amostras, “SD” representa o desvio padrão, “IC” representa intervalo de confiança e “ES” representa o *Effect Size*.

### 3. Resultados e discussão

#### 3.1. Identificação de picos de cromatogramas GC-MS de hAMSCs durante a osteoindução

Apresenta-se, neste subcapítulo, um cromatograma típico do extrato apolar de hAMSCs sujeitas à osteoindução (Fig. 28), explicando-se brevemente como se identificaram os compostos presentes na Tabela 4. Na Fig. 28a encontra-se um cromatograma completo (RT 5 - 72,5 min.) de EI-Q-MS correspondente ao extrato apolar obtido pelo método metanol-clorofórmio-água de hAMSCs sujeitas à osteoindução, mais especificamente, do 1º dia de indução. Para uma

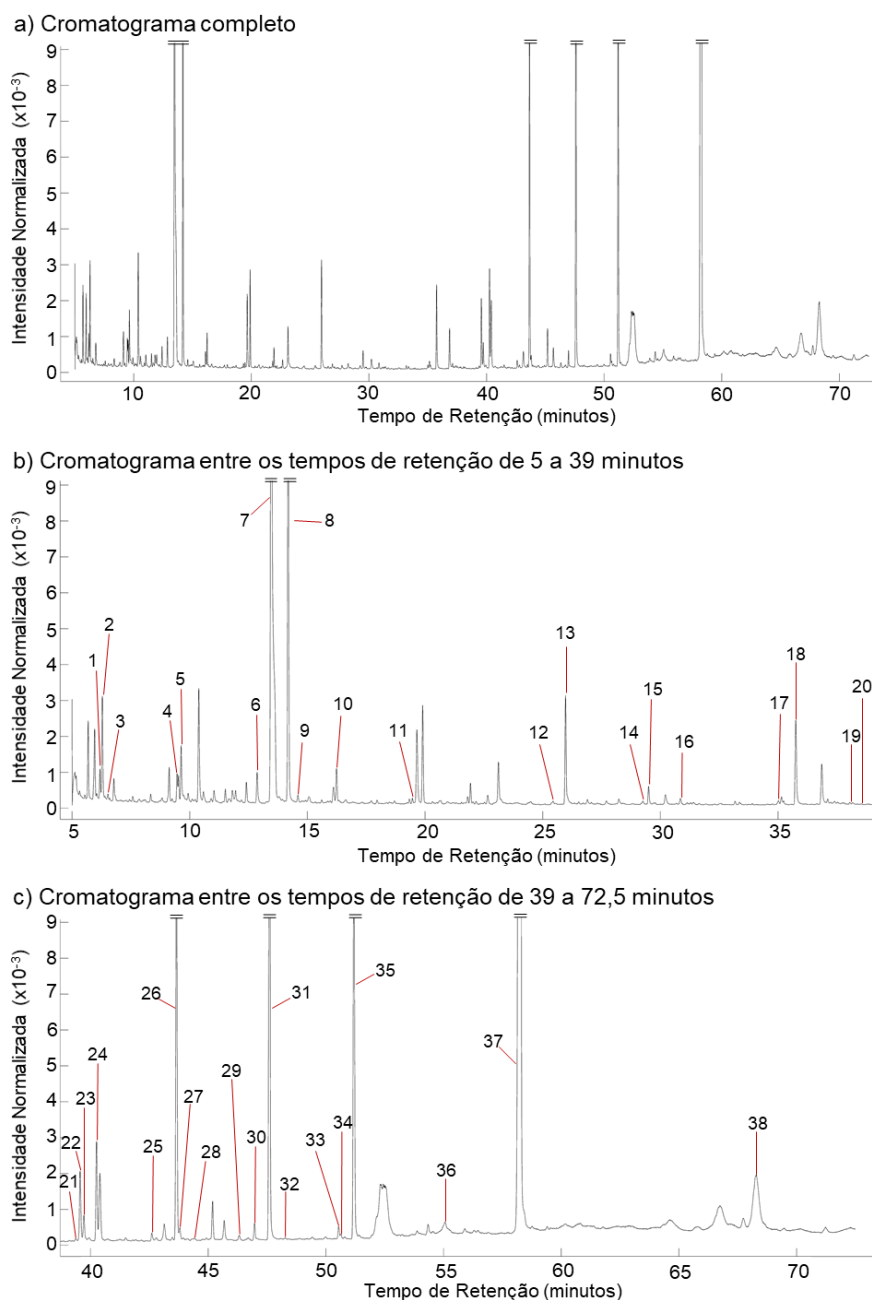


Fig. 28 - Cromatograma do extrato apolar trimetilsililado de uma amostra de hAMSCs, recolhida ao dia 1 da osteoindução. a) Cromatograma completo (RT 5 - 72,5 min.). b,c) Expansões do cromatograma apresentado em Fig. 28a, entre os tempos de retenção de b) 5 a 39 minutos e c) 39 a 72,5 minutos.

Tabela 4 – Metabolitos identificados no cromatograma da Fig. 28a, estando listados por ordem crescente de tempo de retenção. A cada metabolito associou-se a sua família e razão  $m/z$  do ião  $[M-15]^+$  (ião molecular derivatizado por TMS com a perda de um grupo metilo).

Nº	Tempo Retenção (min)	Família	Nome	$m/z [M - 15]^+$
1	6,188	Ácido orgânico	Ácido láctico	219
2	6,287	SFA	Ácido capróico (C6:0)	173
3	6,524	Ácido orgânico	Ácido glicólico	205
4	9,463	SFA	Ácido enântico (C7:0)	187
5	9,634	Composto inorgânico	Ácido fosfórico	241
6	12,865	SFA	Ácido caprílico (C8:0)	201
7	13,463	Composto inorgânico	Fosfato	299
8	14,185	Poliol	Glicerol	293
9	14,594	Ácido orgânico	Ácido succínico	247
10	16,238	SFA	Ácido pelargónico (C9:0)	215
11	19,464	SFA	Ácido cáprico (C10:0)	229
12	25,441	SFA	Ácido láurico (C12:0)	257
13	25,971	Composto inorgânico	Pirofosfato	451
14	29,254	Glicerofosfato	Glicerol-3-fosfato	445
15	29,497	Éster de fosfato	Fosfoetanolamina	414
16	30,849	SFA	Ácido mirístico (C14:0)	285
17	35,016	UFA	Ácido palmitoleico (C16:1)	311
18	35,752	SFA	Ácido palmítico (C16:0)	313
19	38,054	SFA	Ácido heptadecanóico (C17:0)	327
20	38,537	Álcool	1-Octadecanol	327
21	39,356	UFA	Ácido linoleico (C18:2)	337
22	39,556	UFA	Ácido oleico (C18:1 cis)	339
23	39,717	UFA	Ácido elaídico (C18:1 trans)	339
24	40,256	SFA	Ácido esteárico (C18:0)	341
25	42,604	UFA	Ácido araquidónico (C20:4)	361
26	43,651	Alcano	Tetracosano (Padrão)	-
27	43,789	MG	1-Monomiristina (MG(14:0/0:0/0:0))	431
28	44,417	SFA	Ácido eicosanóico (C20:0)	369
29	46,319	UFA	Ácido docosa-hexaenóico (C22:6)	385
30	46,967	MG	2-Monopalmitina (MG(0:0/16:0/0:0))	459
31	47,601	MG	1-Monopalmitina (MG(16:0/0:0/0:0))	459
32	48,269	SFA	Ácido beénico (C22:0)	397
33	50,537	MG	2-Monoestearina (MG(0:0/18:0/0:0))	487
34	50,638	MG	1-Monooleína (MG(18:1(9Z)/0:0/0:0))	485
35	51,188	MG	1-Monoestearina (MG(18:0/0:0/0:0))	487
36	55,072	MG	1-Monoaraquidina (MG(20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)/0:0/0:0))	515
37	58,244	Esterol	Colesterol	443
38	68,293	DG	1,3-Dipalmitina (DG(16:0/0:0/16:0))	625

visualização mais fácil dos picos, apresenta-se expansões do cromatograma da Fig. 28a nas Fig. 28b,c. Na Fig. 28b, pode observar-se uma ampliação do cromatograma da Fig. 28a para os RT 5 - 39 minutos, sendo que em Fig. 28c se expõe a ampliação para os restantes RT (39 - 72,5 min.). Para a identificação dos picos numerados nas Fig. 28b,c e enunciados na Tabela 4, recorreram-se a bases de dados (NIST, do inglês *National Institute of Standards and Technology*), aos padrões de fragmentação característicos de cada composto [57] e a padrões externos injetados no GC-MS, tal como foi descrito na secção de Materiais e Métodos.

Entre os 38 compostos identificados na presente tese (Tabela 4), o pico consistentemente mais intenso em todas as amostras foi o do colesterol, estando concordante com a literatura [25]. Além deste, identificaram-se também i) ácidos gordos saturados: ácido caprónico, ácido enântico, ácido caprílico, ácido pelargónico, ácido cáprico, ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido heptadecanóico, ácido esteárico e ácido eicosanóico; ii) ácidos gordos insaturados: ácido palmitoleico, ácido linoleico, ácido oleico, ácido elaídico, ácido araquidónico e ácido docosa-hexaenóico; iii) monoacilgliceróis: 1-monomiristina, 2-monopalmitina, 1-monopalmitina, 2-monoestearina, 1-monooleína, 1-monoestearina e 1-monoaraquidina; iv) compostos inorgânicos: ácido fosfórico, fosfato e pirofosfato; v) ácidos orgânicos: ácido láctico, ácido glicólico e ácido succínico; vi) outros: 1,3-dipalmitina, tetracosano, fosfoetanolamina, glicerol-3-fosfato, glicerol e 1-octadecanol. A nomenclatura utilizada na Tabela 4, entre parêntesis, para os ácidos gordos livres, significa C(número de carbonos):(número de ligações duplas). Além disso os compostos monoacilglicerol (MG) e diacilglicerol (DG) identificam entre parêntesis qual é a posição dos grupos hidroxilo do glicerol que está acilada (1/2/3), indicando também a informação de cada éster de ácido gordo (número de carbonos):(número de ligações duplas).

Neste trabalho estão presentes ainda os espectros de massa, obtidos a partir da amostra do dia 1 da osteoindução, de diversos lípidos representativos das principais classes aqui identificadas (Fig. 14), nomeadamente ácidos gordos saturados (SFAs, do inglês *Saturated Fatty Acids*) e insaturados (UFAs, do inglês *Unsaturated Fatty Acids*), monoacilgliceróis (MGs), diacilgliceróis (DGs) e de colesterol (não esterificado).

### 3.2. Efeitos do envelhecimento de hAMSCs no metaboloma lipídico

#### 3.2.1. Descrição dos resultados

Para se entender a evolução do perfil lipídico das hAMSCs expostas a meio basal (sem osteoindução), calculou-se os valores de *Effect Sizes* (e respetivo erro) e correspondentes *p-values* para cada metabolito entre cada dia estudado e também entre os dias extremos 1 e 21. No heatmap da Fig. 29 apresentam-se todas as variações consideradas estatisticamente relevantes ( $|ES| > 0,5$ , e  $\%ErroES < 80\%$ ) e confirmadas visualmente (exemplificado na Fig. 30), destacando-se com um asterisco quando  $p\text{-value} < 0,05$ .

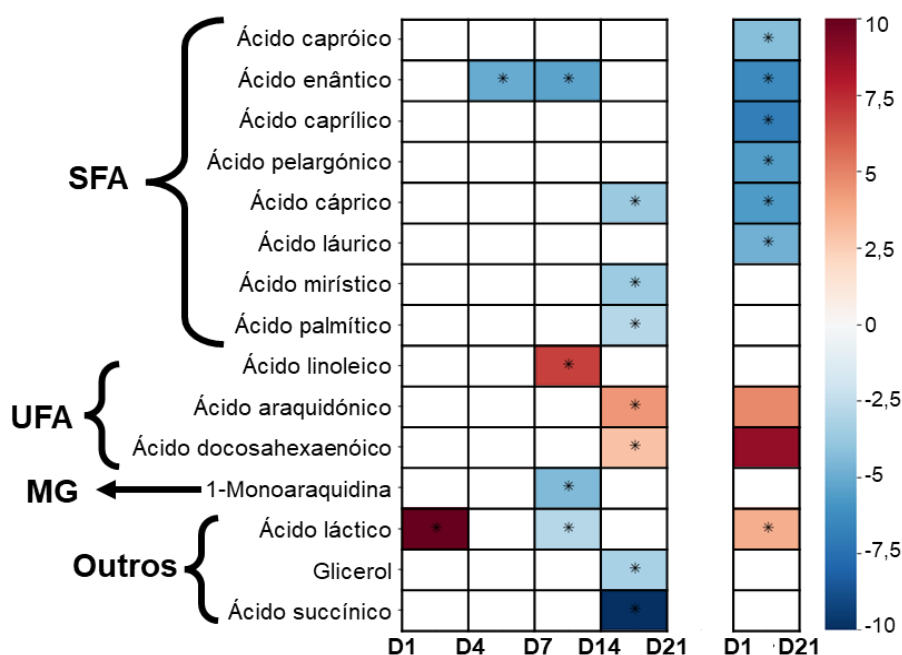


Fig. 29 – Heatmap contendo metabolitos (condição controlo) com  $|ES| > 0,5$ ,  $\%ErroES < 80\%$  e confirmação visual da diferença de picos entre cromatogramas. Os asteriscos indicam  $p\text{-value} < 0,05$ . Di: dia i.

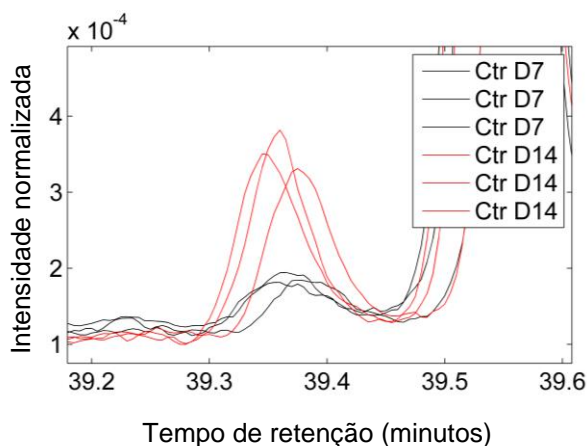


Fig. 30 – Confirmação visual da diferença entre os picos de dias diferentes. Apresenta-se o pico do ácido linoleico, notando-se um claro aumento entre os dias 7 e 14 da condição controlo (Ctr). Di: dia i.



Para todos os metabolitos selecionados na Fig. 29 por serem os mais importantes com base nos critérios referidos, as restantes variações foram completadas na Fig. 31, tornando evidentes outras tendências ausentes na Fig. 29, por serem mais ténues.

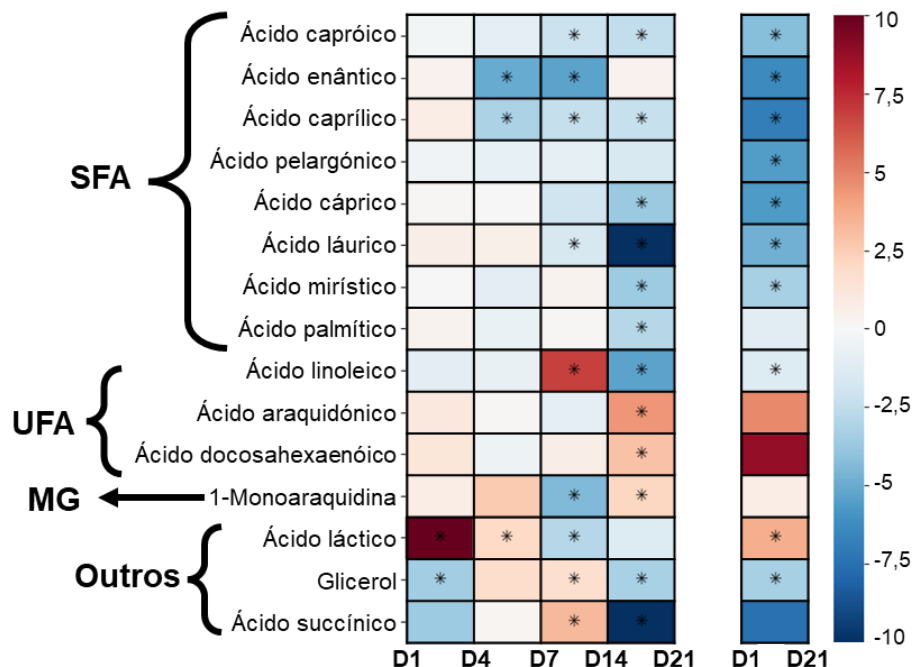


Fig. 31 – Heatmap de todos os metabolitos considerados relevantes em envelhecimento celular, apresentando-se o *Effect Size* (cor) e o  $p\text{-value} < 0,05$  (asterisco) para todas as comparações temporais. A cor de cada quadrado varia consoante o valor do *Effect Size* de cada comparação. Quanto mais vermelho, maior foi o *Effect Size* entre dois dias, e por isso, maior foi o aumento registado que ocorreu entre dois pontos temporais. Já a cor azul, indica o contrário, sendo que quanto mais intenso for o azul, maior a descida ocorrida entre o dia anterior e o dia posterior. Di: dia i.

Além disso, as áreas normalizadas de cada metabolito selecionado foram representadas nos gráficos da Fig. 32, facilitando a visualização da evolução dos metabolitos ao longo do tempo. Todas as variações destacadas estão descritas em baixo e interpretadas na secção seguinte.

### Alterações em ácidos gordos saturados

Observando as Fig. 31 e 33, os SFAs mostraram uma tendência para diminuir ao longo do tempo, notando-se que entre os dias 1 e 21 estas diminuições foram estatisticamente significativas para os SFAs ácido caprónico, ácido enântico, ácido caprílico, ácido pelargónico, ácido cáprico e ácido láurico (Fig. 32a-h). A maior parte destes SFAs são de cadeia média (entre 7 e 12 carbonos), sendo o ácido caprónico (C6:0) de cadeia curta e o ácido mirístico (C14:0) já considerado de cadeia longa [110]. Logo a partir da transição entre os dias 4 e 7 (Fig. 31) houve a diminuição estatisticamente significativa de SFAs como o ácido enântico (C7:0, Fig. 32b) e caprílico (C8:0, Fig. 32c). No intervalo entre os dias 7 e 14 (Fig. 31) houve ainda mais SFAs que diminuiriam significativamente, nomeadamente os ácidos caprónico (C6:0, Fig. 32a), enântico (C7:0, Fig. 32b), caprílico (C8:0,

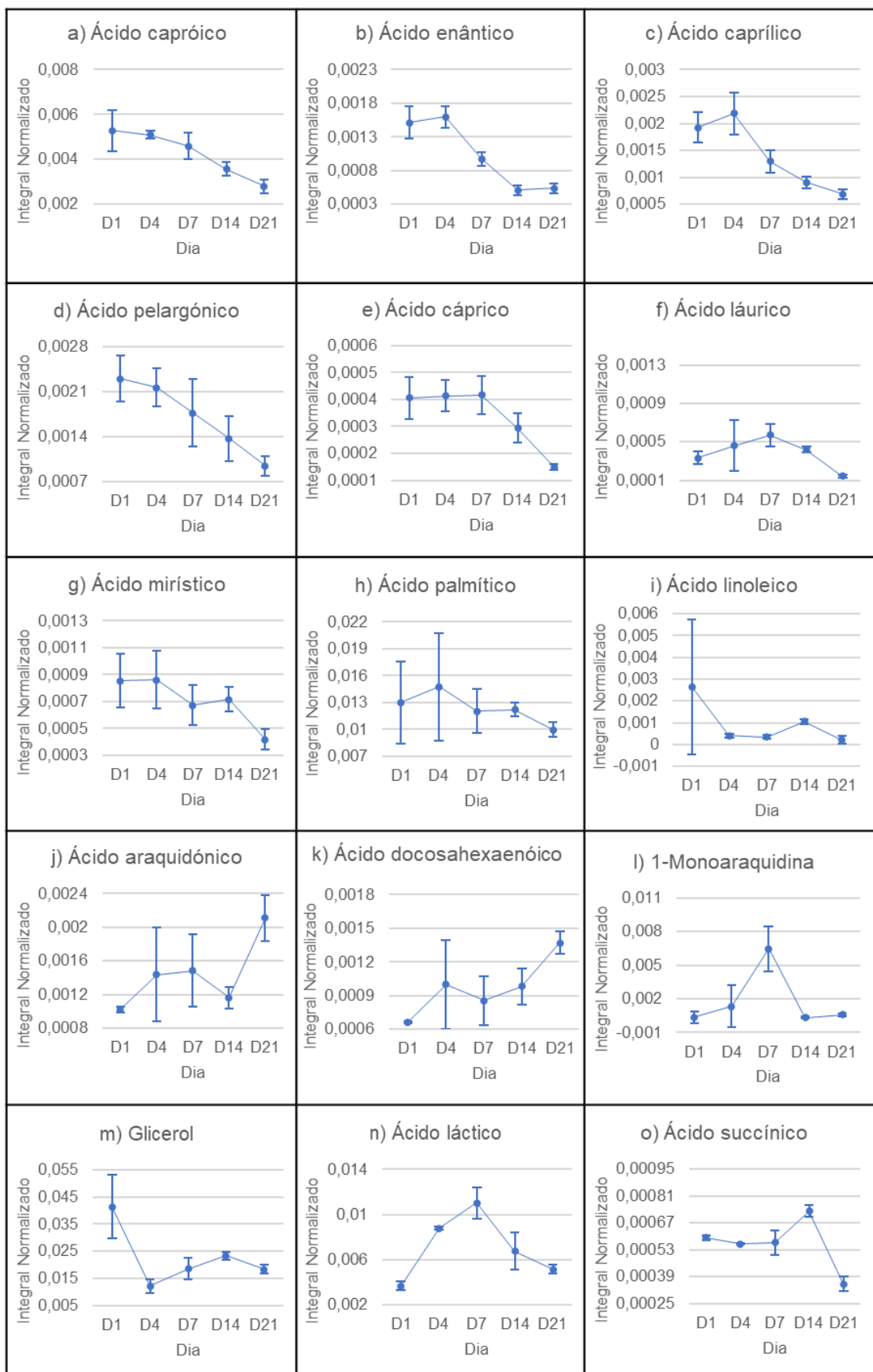


Fig. 32 – Evolução ao longo dos dias 1, 4, 7, 14 e 21 dos metabolitos destacados no heatmap da Fig. 29. Cada ponto corresponde à média das áreas normalizadas de cada grupo de amostras e as barras de erro ao desvio padrão. a, b, c, d, e, f, g, h) SFAs por comprimento de carbonos crescente. i, j, k) UFAs. l) MG. m) Glicerol. n, o) Ácidos orgânicos. Di: dia i.

Fig. 32c) e láurico (C12:0, Fig. 32f). No último período temporal observado, entre os dias 14 e 21 (Fig. 31), os SFAs que diminuíram significativamente foram os ácidos capríco (C6:0, Fig. 32a), caprílico (C8:0, Fig. 32c), cáprico (C10:0, Fig. 32e), láurico (C12:0, Fig. 32f), mirístico (C14:0, Fig. 32g) e palmítico (C16:0, Fig. 32h). Relativamente ao ácido pelargónico, que não variou significativamente entre os dias consecutivos estudados, este demonstrou ter diminuído significativamente entre o primeiro e último dias (dias 1 e 21, Fig. 31). Por outro lado, apesar de o ácido palmítico não ter demonstrado alterações significativas estatísticas entre os dias 1 e 21, observou-se uma diminuição significativamente estatística do dia 14 para o dia 21 (Fig. 31). Pôde-se ainda observar que alguns SFAs começaram a diminuir significativamente logo na primeira semana, como os ácidos enântico (C7:0) e caprílico (C8:0), enquanto que outros começaram a diminuir significativamente na última semana, como os ácidos cáprico (C10:0), mirístico (C14:0) e palmítico (C16:0) (Fig. 31). Apesar de todos os SFAs demonstrarem uma diminuição entre os primeiro e último dias, os mais curtos diminuíram primeiro que os mais longos, observações possíveis apenas devido ao detalhe deste trabalho, que estudou mais pontos temporais que outros artigos disponíveis [65,70,72,74,76].

#### Alterações em ácidos gordos insaturados

O UFA ácido linoleico, com 2 ligações duplas, permaneceu relativamente estável até ao dia 7, subindo significativamente entre os dias 7 e 14 e descendo também significativamente do dia 14 para o dia 21 (Fig. 31 e 33i). Já os UFAs com mais ligações insaturadas, como o ácido araquidónico (4 ligações duplas, Fig. 32j) e o ácido docosahexaenóico (6 ligações duplas, Fig. 32k) mantiveram-se relativamente estáveis até ao dia 14 e, entre este dia e o dia 21, aumentaram de um modo estatisticamente significativo (Fig. 31). É de notar que na última transição estudada (transição entre os dias 14 e 21, representada como D14→D21) o ácido linoleico, que contém menos ligações insaturadas, diminui e os ácidos com maior número de ligações insaturadas aumentam (ácido araquidónico e ácido docosahexaenóico – Fig. 31). Também no caso dos UFAs estudados se pode notar alterações notórias entre os dias 1 e 21 (Fig. 31), sendo que apenas devido ao número de pontos temporais deste trabalho se pôde observar que as alterações mais significativas destes UFAs aconteceram na terceira semana (D14→D21).

#### Alterações em glicerolípidos e glicerol

O MG 1-Monoaraquidina manteve-se relativamente estável até ao dia 7, diminuindo significativamente ao dia 14 e aumentando de um modo estatisticamente significativo ao dia 21 (Fig. 31). O glicerol, componente essencial de diversos lípidos, incluindo MGs, diminui significativamente entre os dias 1 e 4, aumenta significativamente entre os dias 7 e 14 e volta a diminuir de um modo estatisticamente significativo entre os dias 14 e 21 (Fig. 31). Note-se que nas transições D7→D14 e

D14→D21 estes dois metabolitos se comportaram de um modo oposto, podendo indicar algum tipo de correlação (explorado na secção 3.2.2.).

### Alterações em ácidos orgânicos

Por fim, observaram-se ainda alterações significativas, ao longo do tempo, dos ácidos orgânicos ácido láctico e ácido succínico. O ácido láctico aumentou significativamente e intensamente entre os dias 1 e 4, notado pelo asterisco e pela intensidade da cor correspondente ao *Effect Size*, respetivamente, na Fig. 31. Também entre os dias 4 e 7 sofreu um aumento significativo, sendo que depois diminuiu significativamente entre os dias 7 e 14, não mostrando alterações estatisticamente significativas na última semana (Fig. 31). Apesar desta trajetória crescente e decrescente, comparando os dias 1 e 21 houve um aumento estatisticamente significativo deste metabolito (Fig. 31). Já o ácido succínico manteve-se relativamente estável até ao dia 7, aumentando significativamente no dia 14 e diminuindo significativamente entre os dias 14 e 21 (Fig. 31). Entre as evoluções estudadas, ambos os metabolitos variaram, simultaneamente, de um modo estatisticamente significativo apenas entre os dias 7 e 14, apesar dessa mudança ter ocorrido em sentidos opostos, com o ácido láctico a diminuir enquanto que o ácido succínico aumentava (Fig. 31), sendo a sua possível relação explorada na secção seguinte (3.2.2.).

### **3.2.2. Proposta de interpretação bioquímica**

Apesar de alguns estudos utilizarem células indiferenciadas como controlos, poucos são os que exploram a evolução ao longo do tempo do metaboloma de MSCs em meio controlo [72,76], sendo o presente trabalho uma adição valiosa à literatura, uma vez que a compreensão da evolução metabólica normal (envelhecimento e/ou proliferação sem indução de diferenciação) de MSCs permite descobrir quais os processos importantes na manutenção celular, independentes da diferenciação. Nesta secção compara-se o comportamento dos 15 metabolitos previamente selecionados com a literatura existente, correlacionando-se sempre que possível com as vias metabólicas que possam explicar a evolução destes metabolitos. Mais especificamente, destacam-se as vias da  $\beta$ -oxidação de ácidos gordos, da biossíntese de PUFAs, a glicólise, o ciclo de Krebs e o metabolismo de glicerolípidos.

### Metabolismo energético

Num estudo anterior analisaram-se, por LC-MS, meios de cultura basal expostos a MSCs de ratinhos, obtendo-se dados para os dias 0, 5, 10 e 15 da condição controlo [72]. Dos metabolitos em comum com este trabalho, o ácido succínico apresentou um comportamento semelhante, sendo que foi reportado atingir o pico máximo ao dia 10 [72] e, no presente trabalho ao dia 14, podendo

indicar, que o excesso deste metabolito aqui observado foi expelido para o meio. Contudo, este desfasamento pode significar que a proliferação celular no artigo mencionado [72] aconteceu mais rapidamente que neste trabalho. O succinato está correlacionado com a síntese de nucleósidos [89], podendo refletir a expansão/proliferação que houve nas células no meio controle.

Geralmente, em condições anaeróbicas, o piruvato resultante da glicólise é convertido em ácido láctico, pela enzima lactato desidrogenase [111]. Por outro lado, em condições aeróbicas, o piruvato é convertido em acetil-coenzima A (acetil-CoA) e entra no ciclo de Krebs, que regenera as moléculas NADH e FADH necessárias posteriormente durante a fosforilação oxidativa (Fig. 33). Também pode ocorrer a reconversão de lactato em piruvato pela lactato desidrogenase, sendo este piruvato encaminhado para o ciclo de Krebs e fosforilação oxidativa [111]. Relativamente aos dados deste trabalho, observou-se que houve um aumento significativo do ácido láctico entre os dias 1, 4 e 7 (Fig. 31 e Fig. 32n), o que pode significar que até ao dia 7 as hAMSCs em estudo recorreram à respiração anaeróbica para obtenção de energia, mesmo estando expostas a níveis normais de oxigénio. Adicionalmente, os níveis de ácido succínico (Fig. 32o e Fig. 31) mantiveram-se estáveis ao longo destes mesmos dias (1 a 7), podendo indicar que não houve aumento da atividade do ciclo de Krebs neste período, o que vai de acordo com a hipótese da obtenção preferencial de energia através da respiração anaeróbica até ao dia 7.

Após a acumulação de ácido láctico observada até ao dia 7, no dia 14 houve uma descida estatisticamente significativa (Fig. 31 e Fig. 32n), podendo indicar a reconversão do lactato em piruvato e/ou o encaminhamento preferencial do piruvato para o ciclo de Krebs e, provavelmente, da fosforilação oxidativa (respiração aeróbica). Outra observação a favor desta hipótese é o aumento estatisticamente significativo do ácido succínico do dia 7 para o 14 (Fig. 31 e Fig. 32o), também indicando o aumento da atividade do ciclo de Krebs. No último intervalo comparado (do dia 14 para o dia 21) o ácido láctico demonstrou uma tendência de diminuição (Fig. 31 e Fig. 32n). Por outro lado, houve uma diminuição estatisticamente significativa de ácido succínico (Fig. 31 e Fig. 32o), podendo significar que o ciclo de Krebs estava menos ativo. Apesar das variações de metabolitos do metabolismo energético de MSCs ainda serem pouco estudadas, um artigo recente [112] viu que a cultura 2D de AMSCs ao longo de 21 dias levou à diminuição gradual da produção de lactato ao longo do tempo (o que apenas se verificou a partir do dia 7 no presente trabalho) e à diminuição da respiração mitocondrial, especialmente entre os dias 14 e 21 (apoiando a evolução do ácido succínico neste trabalho).

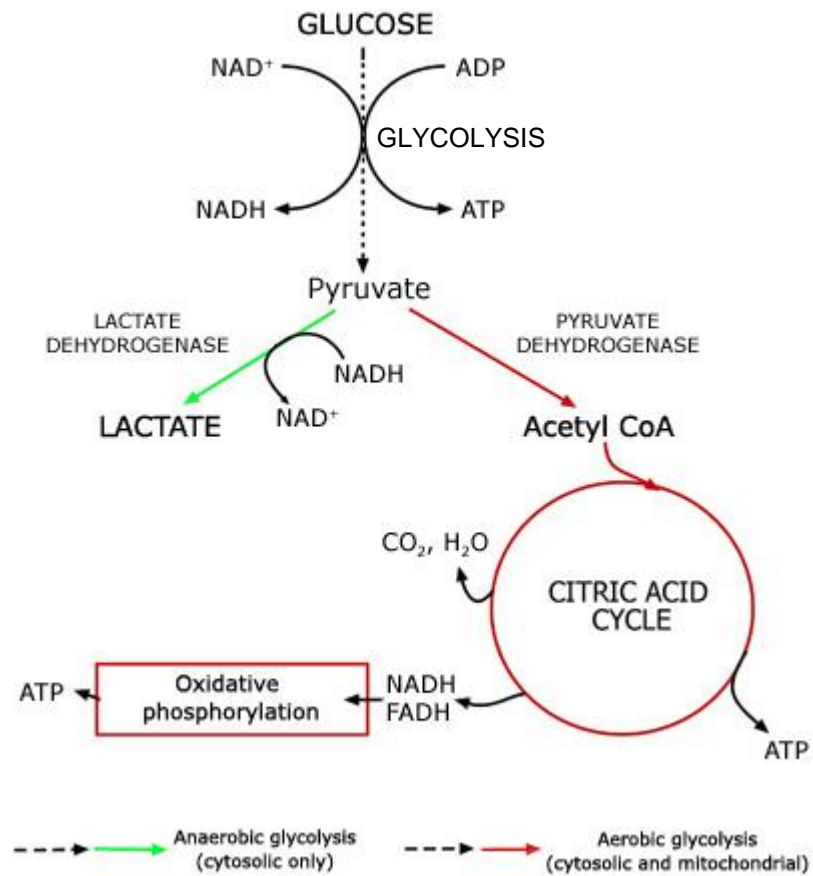


Fig. 33 – Esquema da glicólise e do Ciclo de Krebs. Adaptado de [124].

### Síntese de ácidos gordos insaturados

Nos resultados deste trabalho pode observar-se que na transição D14→D21 houve uma diminuição significativa do ácido linoleico, ácido gordo essencial e precursor do ácido araquidónico, que por sua vez aumentou significativamente no mesmo intervalo de tempo (Fig. 31). A via da síntese de PUFAs (Fig. 34) pode explicar estas alterações. Visto que se utilizam as mesmas enzimas para a síntese de PUFAs ómega 3 e ómega 6, estas estavam provavelmente mais ativas ou expressas, resultando numa maior síntese de ácido docosahexaenóico, a par do araquidónico, uma vez que estes PUFAs aumentaram significativamente entre os dias 14 e 21 (Fig. 31).

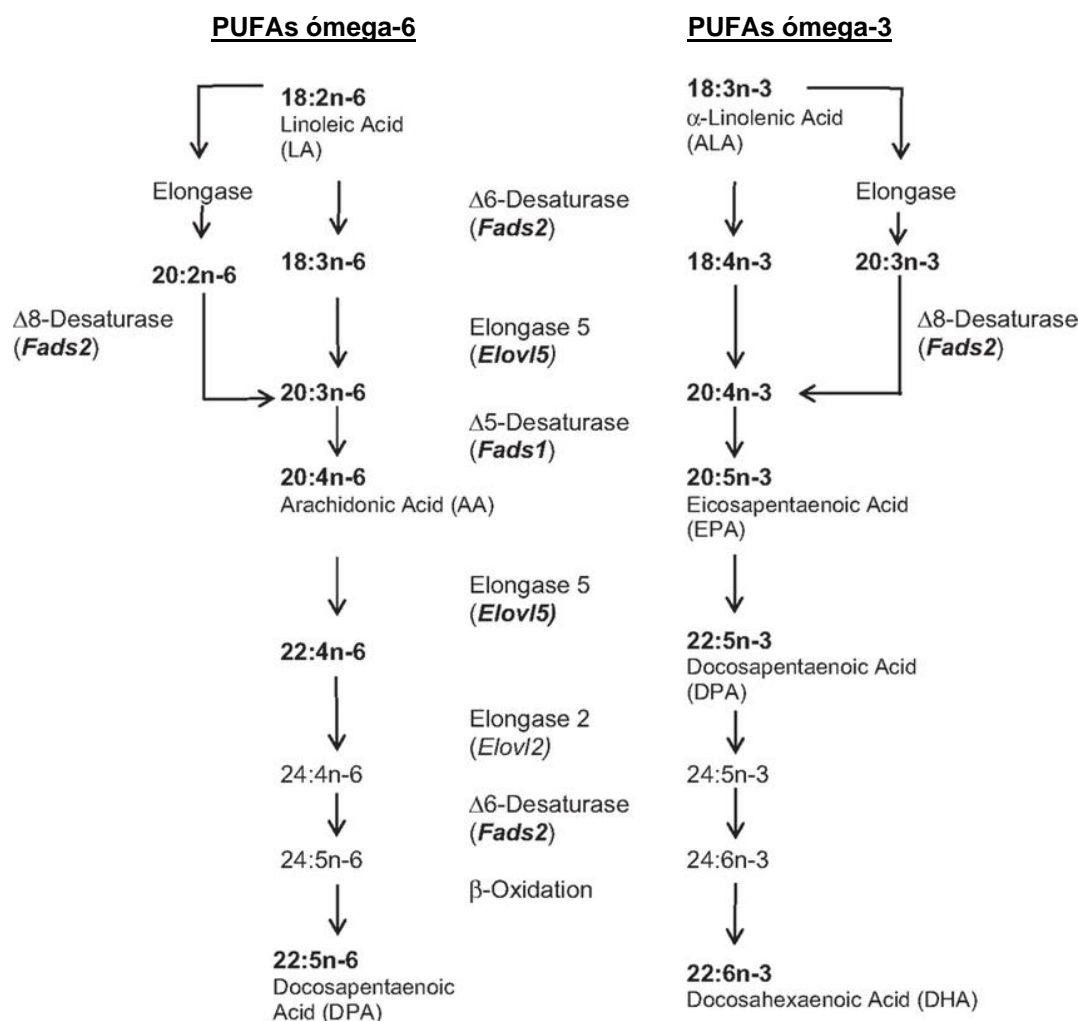


Fig. 34 – Síntese de UFAs polinsaturados ómega-6 e ómega-3. Adaptado de [125].

### Metabolismo de glicerolípidos

Neste trabalho o glicerol apresentou diminuições significativas nas transições D1→D4 e D14→D21 e um aumento significativo em D7→D14 (Fig. 31 e 33m). Como noutro estudo [72] não se detetou o glicerol no meio extracelular em nenhum dos dias estudados (0, 5, 10 e 15), este metabolito foi mais provavelmente usado na constituição de vários lípidos, como mono, di e triacilgliceróis (Fig. 35), fosfolípidos, esfingolípido, entre outros, indiciando uma remodelação lipídica durante o envelhecimento celular [113]. Mais recentemente, estudaram-se os endo- e exo-metabolomas, por LC-MS, de MSCs imortalizadas, aos dias 0, 14 e 21 [65]. Nesse artigo o glicerol apresentou uma tendência não significativa para diminuir entre os dias 0 e 14 e também entre os dias 14 e 21, tanto nas amostras intracelulares como no meio de cultura. No presente trabalho, houve um comportamento intracelular semelhante (Fig. 32m), observando-se mesmo uma diminuição

significativa entre os dias 14 e 21 (Fig. 31). É de notar que a linhagem celular utilizada pode ter comportamentos diferentes das MSCs deste trabalho, devido ao facto de serem imortalizadas. Uma das vantagens do trabalho atual, com o estudo de mais pontos temporais, é acompanhar mais detalhadamente a evolução intracelular do glicerol, notando-se a ligeira subida entre os dias 4 e 14 (Fig. 31 e Fig. 32m), que os autores [65] não observaram.

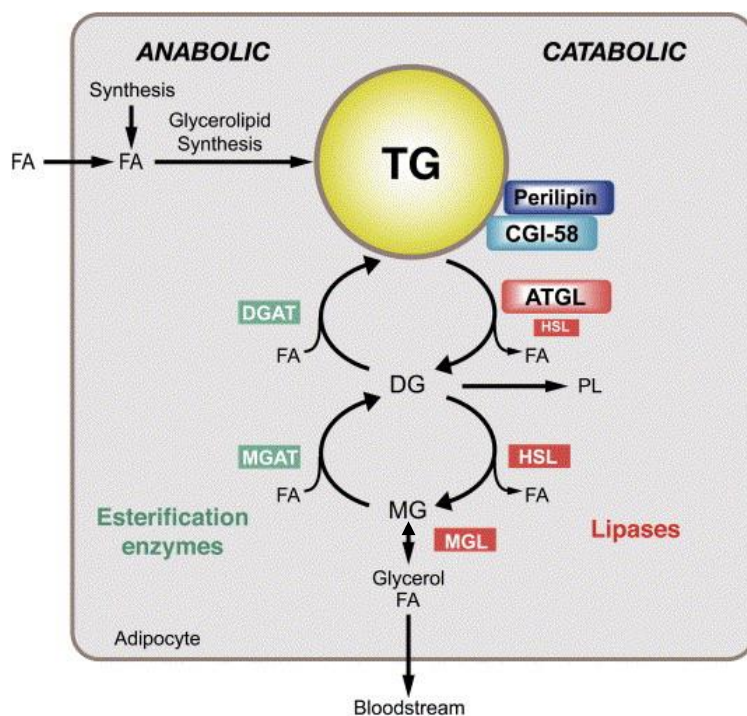


Fig. 35 – Esquema do catabolismo (à direita da imagem) e anabolismo (à esquerda da imagem) de TGs. Adaptado de [113].

Pode ainda observar-se que na transição D14→D21 (Fig. 31) houve um aumento significativo da 1-monoaraquidina, com uma simultânea diminuição significativa do glicerol, apontando para a formação de 1-monoaraquidina, consumindo parte do glicerol disponível (Fig. 35). Apesar de parte do ácido araquidónico ser consumido neste processo, este aumenta significativamente no mesmo período, provavelmente devido à sua síntese a partir do ácido linoleico (já explicado).

#### Metabolismo do ácidos gordos saturados

Os SFAs contendo até 8 carbonos conseguem ser transportados através da membrana mitocondrial, sendo transformados nos seus derivados acil-CoA na matriz mitocondrial e posteriormente usados como substratos na  $\beta$ -oxidação mitocondrial e no ciclo de Krebs (Fig. 36) [110]. Os SFAs de cadeia longa (mais de 12 carbonos) dependem de proteínas para entrarem nas células e para o seu transporte intracelular, ao contrário de SFAs de cadeia média e curta [110]. Assim, os



SFAs de cadeia média e curta são mais facilmente utilizados para a obtenção de energia por parte das células [110]. Entre os SFAs deste trabalho, como já foi mencionado, os de cadeia mais curta começaram a diminuir de forma estatisticamente significativa mais cedo (logo a partir do dia 4) que os SFAs mais longos (superiores a 8 carbonos), diminuindo estes últimos mais significativamente entre os dias 14 e 21 (Fig. 31).

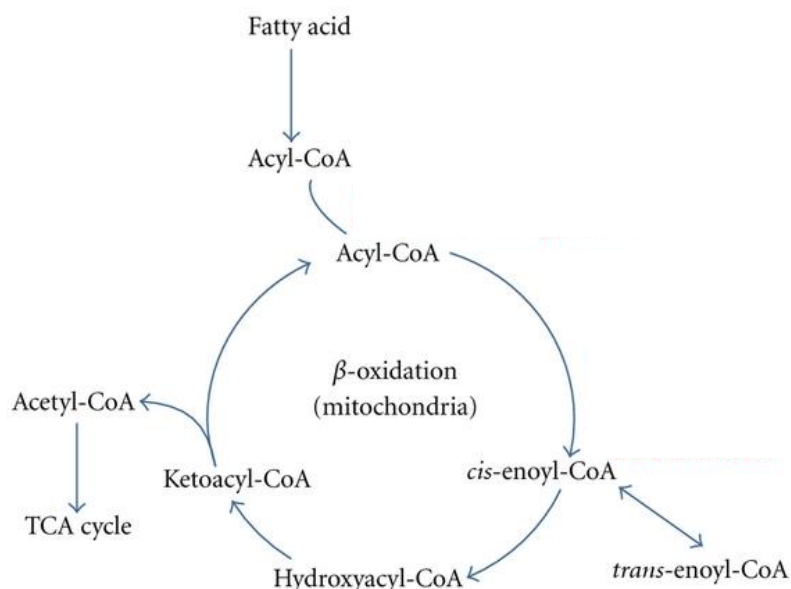


Fig. 36 - β-oxidação de SFAs. Ao fim de cada ciclo de β-oxidação resulta acetil-CoA, um metabolito necessário no ciclo de Krebs. Adaptado de [126].

Relativamente aos SFAs de cadeia média (7 a 12 carbonos) com número ímpar de carbonos (provavelmente consumidos do meio de cultura), a sua β-oxidação gera acetil-CoA (tal como acontece aos SFAs com número par de carbonos) e também propionil-CoA, que consegue entrar no ciclo

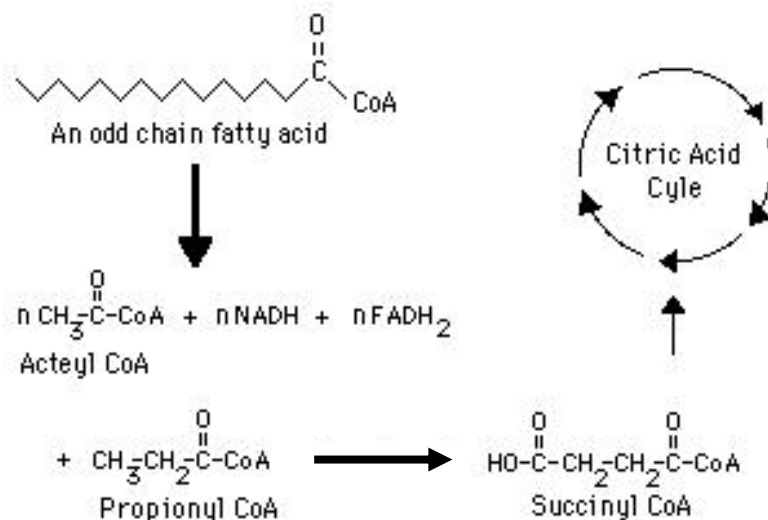


Fig. 37 – Da β-oxidação de SFAs com um número ímpar de carbonos resulta uma molécula de propionil-CoA por cada SFA completamente metabolizado. O propionil-CoA é depois convertido em succinil-CoA, que entra no ciclo de Krebs. Adaptado de [127].

de Krebs após ser convertido em succinil-CoA (Fig. 37) [110]. Neste trabalho, os SFAs de número ímpar ácido enântico (C7:0) e ácido pelargónico (C9:0) diminuíram significativamente entre os dias 1 e 21 (Fig. 31). Mais especificamente, entre os dias 7 e 14 (Fig. 31) houve uma diminuição significativa do ácido enântico (C7:0) e um simultâneo aumento significativo do ácido succínico, sendo este último um metabolito do ciclo de Krebs, que pode ser proveniente do propionil-CoA (resultado da  $\beta$ -oxidação do ácido enântico). Entre os dias 14 e 21, os SFAs de número ímpar de carbonos não apresentaram alterações significativas, no entanto houve uma diminuição significativa e intensa do ácido succínico neste intervalo (Fig. 31). Tal pode significar que a principal fonte de succinato pode ser o propionil-CoA da  $\beta$ -oxidação dos ácidos enântico (C7:0) e pelargónico (C9:0).

Ainda relativamente à transição D14→D21, a diminuição acentuada do succinato pode ter desencadeado a  $\beta$ -oxidação dos SFAs mais longos (Fig. 31) por forma a que houvesse suprimento de acetil-CoA para o ciclo de Krebs e consequente produção de energia. De um modo oposto, a diminuição intensa observada com o succinato em D14→D21 pode ser devida à utilização deste e outros metabolitos do ciclo de Krebs para a síntese de biomoléculas necessárias às células nesta fase de proliferação [114]. Dadas estas observações, é plausível que a diminuição dos SFAs esteja relacionada com a produção de energia, especialmente os SFAs até 8 carbonos, não se excluindo a hipótese de remodelação estrutural ou expulsão para o meio. Visto que os FAs estudados são FAs livres, é difícil concluir acerca do grau de saturação dos FAs associados às membranas.

### **3.3. Metabolómica na osteoindução de hAMSCs**

#### **3.3.1. Descrição dos resultados**

Esta secção apresenta as principais variações do perfil lipídico em condições de osteoindução. Tal como na secção anterior, a partir dos 38 metabolitos da Tabela 4 calcularam-se os valores de *Effect Size*, com respetivo erro e p-value (*Wilcoxon rank-sum*) de cada comparação temporal (Fig. 38 e Fig. 39). Os 15 metabolitos selecionados como mais relevantes estão apresentados na Fig. 38. Apresentam-se ainda as evoluções destes 15 metabolitos ao longo do tempo sob a forma de gráficos, nas Fig. 40 e Fig. 41.

Os 15 metabolitos mais importantes desta secção (Fig. 38) pertencem a diferentes classes, havendo 4 SFAs (ácido cáprico, ácido mirístico, ácido palmítico e ácido esteárico), 5 UFAs (ácido palmitoleico, ácido linoleico, ácido oleico, ácido araquidónico e ácido docosahexaenóico), 1 MG (1-monomiristina), 1 DG (1,3-Dipalmitina) e ainda o colesterol, glicerol, pirofosfato e fosfoetanolamina. Comparativamente aos grupos de metabolitos da secção 3.2.1. (Fig. 29), observaram-se alterações notórias em menos SFAs (4 na osteoindução em Fig. 38 vs. 8 no controlo em Fig. 29) e em mais UFAs (5 na osteoindução em Fig. 38 vs. 3 no controlo em Fig. 29). É de notar que alguns FAs se destacaram apenas na osteoindução, nomeadamente os ácido esteárico, ácido palmitoleico e ácido oleico. O MG aqui destacado (Fig. 38) é de um SFA, enquanto que o MG que se destacou em Fig.

29 é de um UFA. O glicerol sobressai em ambas as secções (Fig. 38 e Fig. 29). Nesta secção

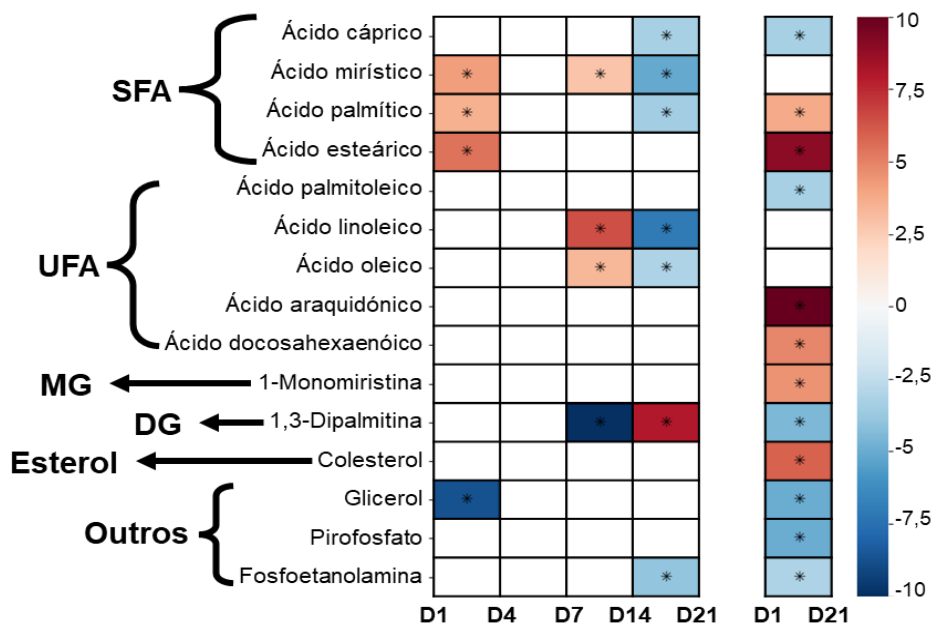


Fig. 38 – Heatmap dos metabolitos que sofreram alterações notórias ao longo do tempo, em hAMSCs cultivadas em meio osteoindutivo. A cor de cada retângulo representa o Effect Size entre os dias indicados, sendo que quanto mais azul, maior foi a descida entre o dia anterior e o seguinte e quanto mais intensamente vermelho for a cor, mais acentuada foi a subida entre dias. Apresentam-se apenas as comparações com  $|ES| > 0,5$  e com  $\%Erro < 80\%$ . Também estas comparações foram validadas visualmente. Os asteriscos indicam  $p\text{-value} < 0,05$ . Di: dia i.

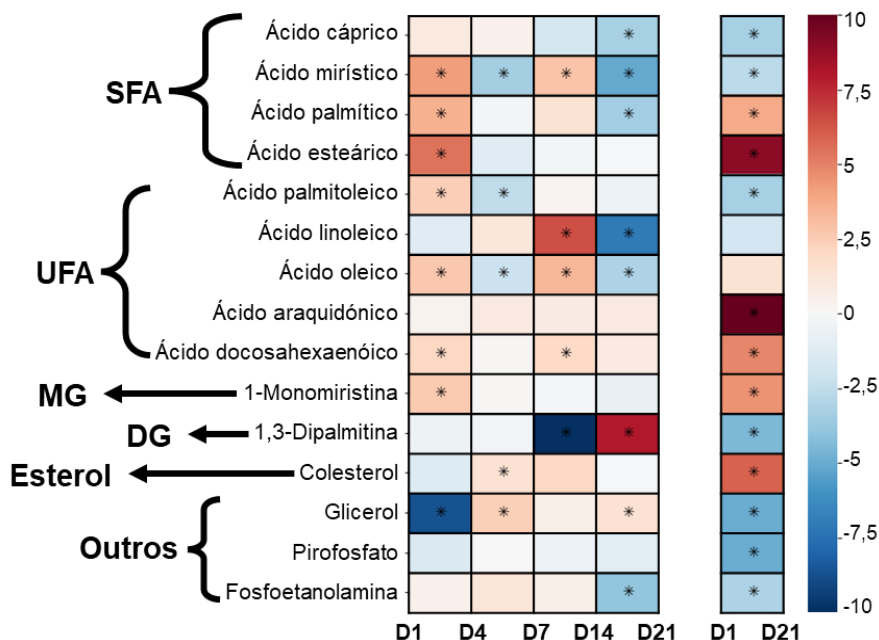


Fig. 39 – Heatmap de todos os metabolitos considerados relevantes na condição osteogénese, apresentando-se o Effect Size (cor) e o  $p\text{-value} < 0,05$  (asterisco) para todas as comparações temporais. A cor de cada quadrado varia consoante o valor do Effect Size de cada comparação. Quanto mais vermelho, maior foi o Effect Size entre dois dias, e por isso, maior foi o aumento registado que ocorreu entre dois pontos temporais. Já a cor azul, indica o contrário, sendo que quanto mais intenso for o azul, maior a descida ocorrida entre o dia anterior e o dia posterior. Os asteriscos indicam um  $p\text{-value} < 0,05$ , calculado pelo teste *Wilcoxon Rank-sum*. Di: dia i.

distinguiu-se ainda um DG e o colesterol (Fig. 38), que não se mostraram relevantes na secção anterior (3.2.1. - Fig. 29). Outros metabolitos de realce foram o pirofosfato e a fosfoetanolamina, ambos contendo o grupo fosfato na sua estrutura (Fig. 38). No global, houve vários aumentos significativos logo a partir da transição D1→D4 (Fig. 39), nomeadamente de 3 SFAs, 3 UFAs e do MG, sendo que estes aumentos não se verificaram em condições controlo (Fig. 31). Entre os dias 1 e 21 (Fig. 39), os dois SFAs mais curtos (C10:0 e C14:0) diminuiram significativamente e os dois SFAs

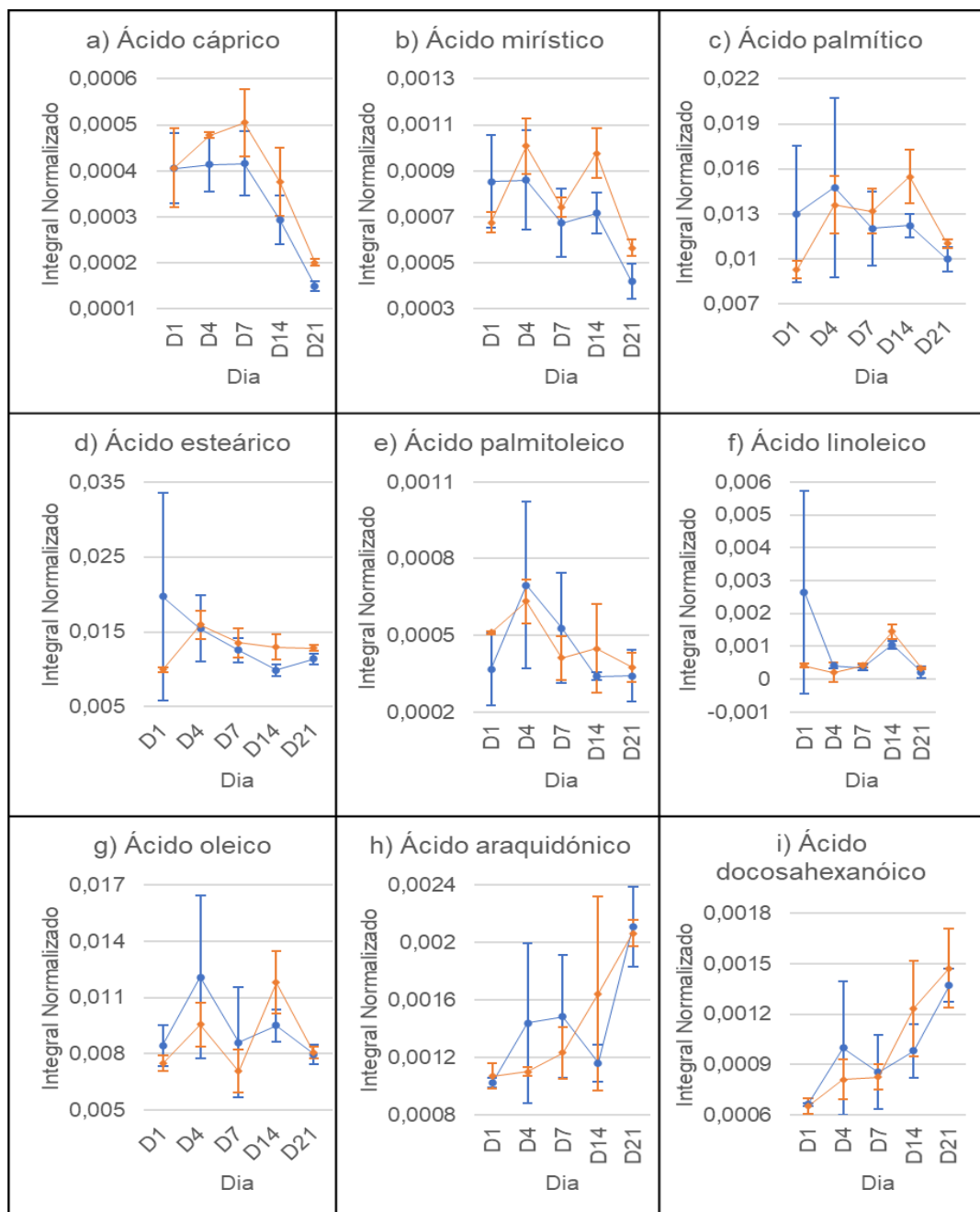


Fig. 40 - Evolução ao longo dos dias 1, 4, 7, 14 e 21 dos FAs destacados pelo heatmap da Fig. 38. Cada ponto corresponde à média de cada grupo de amostras e as barras de erro ao desvio padrão desse mesmo grupo. A laranja estão representados os dados relativos à osteoindução e a azul ao controlo. Di: dia i.

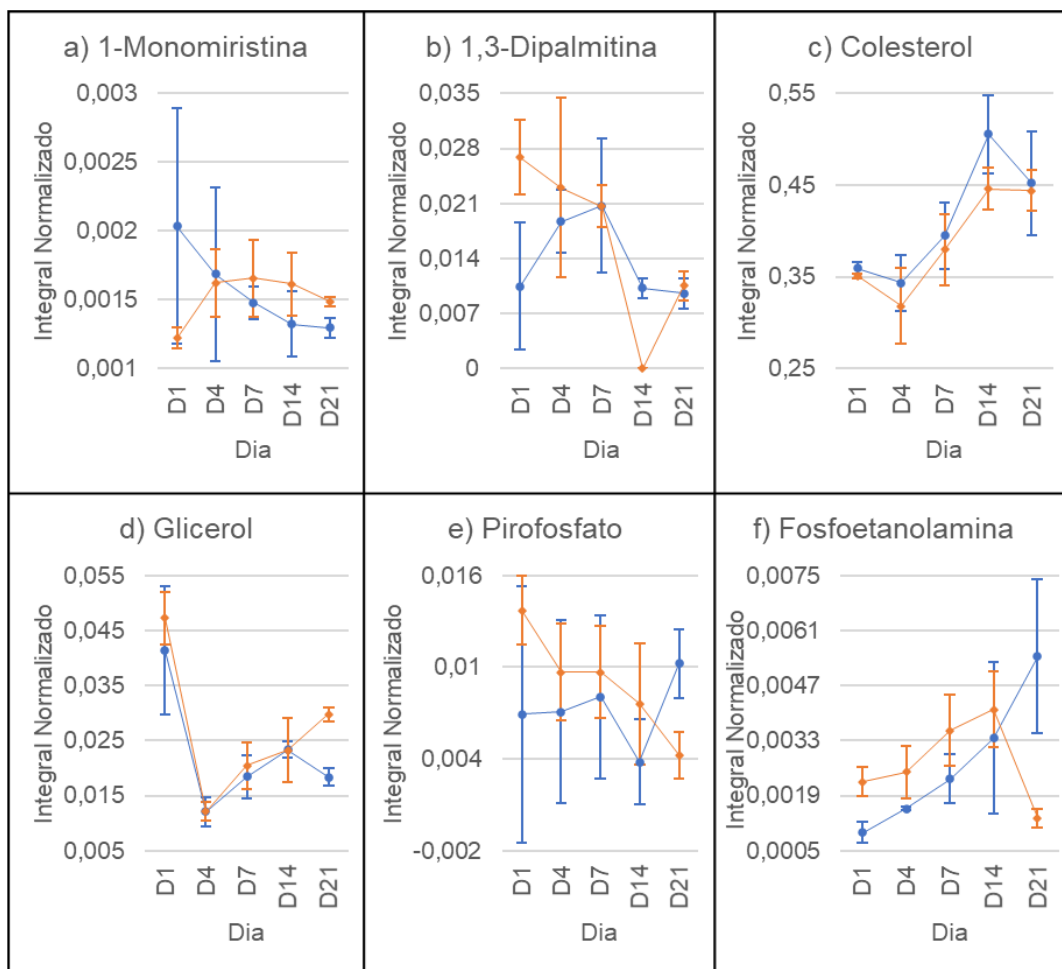


Fig. 41 - Evolução ao longo dos dias 1, 4, 7, 14 e 21 dos seis últimos metabolitos (apolares e polares) destacados pelo heatmap da Fig. 38. Cada ponto corresponde à média de cada grupo de amostras e as barras de erro ao desvio padrão desse mesmo grupo. A laranja estão representados os dados relativos à osteoindução e a azul ao controlo. Di: dia i.

mais compridos (C16:0 e C18:0) aumentaram significativamente, não sendo possível determinar uma mesma tendência para a classe de SFAs, ao contrário do que aconteceu nos SFAs da condição controlo para a mesma comparação temporal, em que 7 dos 8 SFAs importantes diminuiram (Fig. 31). Por outro lado, um dos compostos com comportamentos semelhantes entre as condições controlo e osteoindução foi o ácido linoleico, que em ambas as condições apresentou uma subida significativa em D7→D14, seguida de uma descida significativa em D14→D21 (Fig. 31 e Fig. 39), sendo que nas transições anteriores não houve alterações significativas. Os ácidos araquidónico e docosahexaenóico aumentaram significativamente entre D1→D21 na condição de osteoindução (Fig. 39), sendo que em condições controlo este aumento foi apenas visualmente significativo (Fig. 29), havendo no entanto um claro aumento destes dois PUFAs em ambas as condições, ao longo do tempo. Outros compostos com o mesmo comportamento entre si, em D1→D21 foram o ácido cáprico, o ácido mirístico e o glicerol, diminuindo significativamente quer na condição controlo (Fig. 31), quer na condição osteoindução (Fig. 39). Além disso, houve uma diminuição significativa

observada na última semana (D14→D21) para os SFAs ácido capríco, ácido mirístico e ácido palmítico em ambas as condições (Fig. 31 e Fig. 39).

#### Alterações em ácidos gordos saturados

O SFA ácido cáprico (C10:0) exibiu o mesmo comportamento em ambas as condições, aparente na Fig. 40a, sendo que através dos heatmaps das Fig. 31 (controlo) e Fig. 39 (osteogénese) se pode verificar que não houve alterações significativas até ao dia 14, seguindo-se uma diminuição significativa entre os dias 14 e 21. Visualmente, através da Fig. 40a, o ácido cáprico aparentou ter uma concentração superior ao longo do tempo em meio osteoindutivo (comparativamente ao meio controlo), notando-se até uma separação entre as barras de erro ao dia 21 (Fig. 40a).

O SFA ácido mirístico (C14:0) apresentou alterações significativas em todas as comparações da condição osteoindutiva (Fig. 39), sendo que em meio controlo apenas as diminuições D14→D21 e D1→21 foram significativas (Fig. 31 e Fig. 40b). Relativamente a este metabolito, as barras de erro dos grupos controlo e osteoindução não coincidem aos dias 14 e 21 (Fig. 40b), significando que, pelo menos nestes dias, houve uma maior concentração relativa de ácido mirístico na condição osteoindutiva.

O SFA ácido palmítico (C16:0) demonstrou um aumento significativo logo entre os dias 1 e 4, apenas na condição de osteoindução, sendo que em ambas as condições diminuiu significativamente à terceira semana (D14→D21), como exposto em Fig. 31 (controlo) e Fig. 39 (osteogénese). Apenas ao dia 14 se verificou uma separação entre as barras de erro das duas condições (Fig. 40c), sendo que na última semana este SFA também tendeu a estar a uma concentração relativa superior na condição osteoindutiva, quando comparada com a condição controlo. Comparando os dias extremos 1 e 21, houve um aumento significativo na condição osteoindução (Fig. 39), sendo que na condição controlo a comparação dos mesmos dias não indicou uma alteração estatisticamente significativa (D1→D21 da Fig. 31).

O ácido esteárico (C18:0) apresenta dois aumentos significativos, em D1→D4 e D1→D21 (Fig. 39 - osteoindução), não mostrando alterações significativas entre os restantes dias. Na última semana também este SFA estava numa concentração relativamente superior em condições osteoindutivas, observando-se a não intersecção das barras de erro aos dias 14 e 21 da Fig. 40d.

#### Alterações em ácidos gordos insaturados

Os UFAs selecionados em comum nesta secção e na anterior (Fig. 29 e Fig. 38), foram o ácido linoleico (C18:2), ácido araquidónico (C20:4) e ácido docosahexaenóico (C22:6). Os UFAs destacados somente na condição osteoindutiva (Fig. 38) foram o ácido palmitoleico (C16:1) e o ácido oleico (C18:1), ambos monoinsaturados. Curiosamente, o SFA ácido mirístico (C14:0) e o

UFA ácido oleico (C18:1) demonstraram a mesma evolução ao longo do tempo na condição osteogénica, aumentando significativamente nas comparações D1→D4 e D7→D14 e diminuindo significativamente nas transições D4→D7 e D14→D21 (Fig. 39). Outras alterações significativas no mesmo sentido ocorreram noutros FAs em condições osteoindutivas (Fig. 39), destacando-se o ácido mirístico (C14:0), o ácido palmitoleico (C16:1) e o ácido oleico (C18:1) nas transições D1→D4 (aumento) e D4→7 (diminuição). Já nas comparações da segunda e terceira semanas, os FAs com as mesmas alterações foram o ácido mirístico (C14:0), o ácido linoleico (C18:2) e o ácido oleico (C18:1), demonstrando um aumento significativo em D7→D14 e uma diminuição significativa em D14→D21 (Fig. 39). Ao contrário do observado nos SFAs, não houve diferenças notórias entre as concentrações relativas dos UFAs nas condições controlo e osteoindução, como indicado pela intersecção das barras de erro em todos os dias da Fig. 40e-i.

O PUFA ácido linoleico (C18:2) evoluiu de forma muito semelhante em ambas as condições, como se pode ver na Fig. 40f, notando-se que este se mantém constante na primeira semana (D1→D4→D7), aumenta significativamente na segunda semana (D7→D14) e diminui significativamente na terceira semana (D14→D21), como exposto em Fig. 31 e Fig. 39.

Os PUFAs ácido arquidónico e ácido docosahexaenóico demonstraram aumentar significativamente entre os dias 1 e 21 da condição osteoindução (Fig. 39), sendo que na condição controlo (Fig. 31) apenas se verificou um aumento significativo entre os dias 14 e 21. Nos restantes dias não se observaram alterações significativas no ácido araquidónico em osteoindução, mas houve aumentos significativos do ácido docosahexaenóico nas transições D1→D4 e D7→D14, como se pode verificar na Fig. 39.

#### Alterações em glicerolípidos e glicerol

Quanto ao MG 1-monomiristina, houve um aumento significativo em D1→D4 e D1→D21 (Fig. 39), sendo que nas restantes comparações temporais não houve alterações significativas, portanto o aumento verificado entre os dias 1 e 21 resultou apenas do aumento deste metabolito nos primeiros 4 dias. A trajetória aparente deste metabolito em condição controlo (Fig. 41a) foi de diminuição suave mas constante ao longo do tempo, oposto ao comportamento aparente da condição osteoindução, onde a 1-monomiristina aumentou bastante em D1→D4 e depois se manteve relativamente constante nos restantes dias. Além disso, ao dia 21 as barras de erro de ambas as condições não são coincidentes, existindo este metabolito em maior concentração no interior de células em osteoindução (Fig. 41a).

Já o DG 1,3-Dipalmitina (Fig. 41b) manteve-se relativamente constante na osteoindução até ao dia 7, não sendo detetado no dia 14 e tendo aumentado depois até ao dia 21. No global, houve uma diminuição significativa da 1,3-dipalmitina em D1→D21, na condição osteoindutiva (Fig. 39). Na condição controlo, este metabolito aparentou aumentar durante a primeira semana

(comportamento oposto ao da osteoindução) e depois diminuir a sua concentração (Fig. 41b). Entre as duas condições, as barras de erro não se interceptam aos dias 1 e 14, sendo que ao dia 1 a condição osteoindução apresenta uma maior concentração deste DG e que ao dia 14 é a condição controlo que exhibe maiores quantidades deste composto (Fig. 41b).

O glicerol apresentou uma trajetória metabólica quase idêntica em ambas as condições controlo e osteoindução, até ao dia 14, como se pode ver na Fig. 41d. Na última semana (D14→D21) aumentou significativamente na condição osteoindução (Fig. 39) e diminuiu significativamente na condição controlo (Fig. 31). De facto, as barras de erro do dia 21 deste metabolito não coincidiram, mostrando estar mais aumentado no final da osteoindução que no final da condição controlo (Fig. 41d). Curiosamente, em ambas as condições, demonstrou uma diminuição significativa geral (D1→D21 em Fig. 31 e Fig. 39), sendo que a coleção de informação nos pontos temporais intermédios demonstram que não houve uma descida constante ao longo do tempo, uma clara vantagem deste trabalho. Assim, pode perceber-se que entre as duas condições, as alterações que mais as diferenciam, relativamente ao glicerol, aconteceram na terceira semana de cultura (D14→D21 da Fig. 41d).

#### Alterações no colesterol

Observando o gráfico Fig. 41c, as alterações que o colesterol sofreu ao longo do tempo foram bastante semelhantes em ambas as condições, tendendo a aumentar no global (D1→D21). Mais especificamente na condição osteoindução, houve aumentos significativos em D4→D7 e D1→D21 (Fig. 39), sendo que nesta última comparação a subida foi mais intensa, o que está de acordo com o observado em Fig. 41c.

#### Alterações em pirofosfato e fosfoetanolamina

Neste trabalho, o pirofosfato demonstrou uma tendência constantemente decrescente ao longo do tempo, na condição osteoindutiva (Fig. 41e), apenas sendo significativa a diminuição entre D1→D21 (Fig. 39). Na condição controlo, por outro lado, o pirofosfato manteve-se relativamente constante, observando-se uma subida potencialmente significativa na última semana (Fig. 41e). Comparando as duas condições, pode observar-se que as barras de erro do dia 21 não coincidem, estando este composto em maior concentração na condição controlo (Fig. 41e).

A fosfoetanolamina apresentou uma trajetória de aumentos constantes até ao dia 21 para a condição controlo e até ao dia 14 para a condição osteoindução, havendo uma diminuição na última semana de osteoindução, como se pode observar em Fig. 41f. Apesar destes constantes aumentos até ao dia 14, no caso da osteoindução, a diminuição estatisticamente significativa ocorrida em D14→D21 foi o suficiente para que no global este composto apresenta-se uma diminuição



significativa também em D1→D21 (Fig. 39). Antes do dia 14, este composto estava em maiores concentrações intracelulares na condição osteoindução, destacando-se os dias 1 e 4, em que as barras de erro não se intercetam (Fig. 41f). Ao dia 21 o oposto aconteceu, apresentando a condição controlo maiores concentrações deste composto, com as barras de erro das duas condições a não se intercetam (Fig. 41f).

### 3.3.2. Proposta de interpretação bioquímica

As alterações dos metabolitos nas células cultivadas em meio osteoindutivo, deste trabalho, podem ser devidas quer ao envelhecimento em cultura, quer à evolução no sentido da diferenciação osteogénica. Deste modo, a avaliação da evolução das concentrações relativas dos metabolitos em destaque (Fig. 39) pode indicar quais os metabolitos mais importantes na osteoindução. Ou seja, quanto maior for a semelhança entre as trajetórias (Fig. 40 e Fig. 41) da evolução das concentrações relativas dos metabolitos, mais provável é que as variações observadas resultem da proliferação celular e envelhecimento em cultura, e não do processo osteoindutivo. Neste trabalho, entre os 15 metabolitos em destaque, 7 variaram significativamente apenas na condição osteoindução (ácido esteárico, ácido palmitoleico, ácido oleico, 1-monomiristina, 1,3-dipalmitina, colesterol, pirofosfato e fosfoetanolamina), presentes na Fig. 38 mas não na Fig. 29. Além disso, comparando as concentrações relativas de cada metabolito, entre as condições controlo e osteoindução (Fig. 40 e Fig. 41), dois metabolitos apresentaram concentrações relativas diferentes ao dia 1 (1,3-dipalmitina e fosfoetanolamina), quatro metabolitos ao dia 14 (ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico e 1,3-dipalmitina) e sete metabolitos ao dia 21 (ácido cáprico, ácido mirístico, ácido esteárico, 1-monomiristina, glicerol, pirofosfato e fosfoetanolamina), como se pode observar pela não interseção das barras de erro entre condições do mesmo dia nas Fig. 40 e Fig. 41.

#### Ácidos gordos saturados

Os SFAs evoluíram de modo a que existissem em maior concentração relativa na última semana de osteoindução, comparativamente à condição controlo, indicado pela separação entre as barras de erro do dia 14 e/ou 21, em Fig. 40a,b,c,d. Esta tendência pode indicar que houve uma menor libertação destes SFAs para o meio extracelular, ou uma menor utilização metabólica destes compostos, quando em osteoindução, durante a última semana. Além da última semana, houve ainda as alterações significativas entre os dias 1 e 21. No caso dos SFAs ácido cáprico (C10:0) e ácido mirístico (C14:0), houve uma diminuição significativa em ambas as condições (D1→D21 de Fig. 31 e Fig. 39). Na condição osteoindutiva houve aumento significativo dos SFAs ácido palmítico (C16:0) e ácido esteárico (C18:0) entre o primeiro e último dia (D1→D21 da Fig. 39), no entanto, em meio controlo não se verificou nenhuma alteração significativa do ácido palmítico (D1→D21 da Fig. 39) nem no ácido esteárico (que não passou a filtragem da secção 3.2.1.). Estas diferenças são

indicação que as alterações, em cultura osteoindutiva, observadas nos SFAs relativamente mais curtos (C10:0 e C14:0) são mais influenciadas pela proliferação e envelhecimento em cultura. Por outro lado, a evolução dos SFAs relativamente mais compridos (C16:0 e C18:0) em condições osteoindutivas, indica que estes desempenham um papel mais importante/específico na osteogénese das hAMSCs deste trabalho.

### Ácidos gordos insaturados

O UFA ácido linoleico demonstrou as mesmas alterações significativas entre dias para ambas as condições controlo e osteogénese (Fig. 31 e Fig. 39), indicando que a evolução deste metabolito não dependeu maioritariamente do processo osteoindutivo, ou seja, é pouco provável que esteja envolvido em processos únicos da osteogénese. Além disso, ao contrário do que se observou na condição controlo, o ácido araquidónico não demonstrou alterar significativamente em nenhuma das transições estudadas, exceto a D1→D21 (Fig. 39 - osteoindução). Como o ácido linoleico é um precursor do ácido araquidónico, o facto deste último aumentar significativamente em D14→D21 na condição controlo (Fig. 29) pode indicar que nesta semana ele é mais necessário durante a proliferação/envelhecimento celular. Por outro lado, pode estar a ser crescentemente mais necessário em osteogénese de um modo mais gradual e assim não ser notório os seus aumentos de dia para dia, notando-se no entanto um aumento significativo entre D1→D21 (Fig. 38). Sabe-se que o ácido docosahexaenóico estimula a osteogénese, e em simultâneo, inibe a osteoclastogénese [115]. Também o ácido araquidónico consegue inibir a osteoclastogénese, apesar de menos intensamente [115]. À luz do ocorrido neste trabalho, o aumento destes dois PUFAs pode ser em preparação para a sua libertação para o meio extracelular, onde poderiam inibir a formação de osteoclastos, permitindo uma regeneração óssea mais rápida e completa da fratura em tratamento. Na Fig. 40i pode observar-se que o ácido docosahexaenóico existe em condições intracelulares maiores na condição osteoindução, comparativamente à condição controlo, o que também vai de acordo com a literatura, que indica que este PUFA induz a osteogénese [115].

### Metabolismo de glicerolípidos

Os derivados de glicerol MG e DG aqui destacados são ambos oriundos de SFAs, conseguindo-se acompanhar a evolução simultânea do MG através dos metabolitos glicerol (Fig. 41d), ácido mirístico (Fig. 40b) e 1-monomiristina (Fig. 41a), bem como a evolução do DG pelos metabolitos glicerol (Fig. 41d) ácido palmítico (Fig. 40c) e 1,3-Dipalmitina (Fig. 41b). Uma vez que o glicerol é um constituinte de vários lípidos como glicerolípidos e glicerofosfolípidos, pode estar a ser utilizado em várias vias metabólicas e por isso não haver correlação entre o seu comportamento (Fig. 41d) e as poucas espécies lipídicas aqui descritas (ácido mirístico - Fig. 40b, 1-monomiristina - Fig. 41a, ácido palmítico Fig. 40c e 1,3-dipalmitina - Fig. 41b). No entanto, no contexto deste trabalho,

destaca-se o comportamento oposto deste metabolito na última semana (D14→D21) de ambas as condições, diminuindo significativamente em condições controlo (Fig. 31) e aumentando significativamente em osteoindução (Fig. 39), notando-se até a não interseção das barras de erro do dia 21 (Fig. 41d). Tal comportamento poderá significar que, na terceira semana de osteoindução, existe uma maior síntese de glicerol, ou um maior catabolismo lipídico, ou ainda um maior transporte de glicerol do meio extracelular para o interior da célula.

Relativamente ao SFA ácido mirístico e ao MG correspondente 1-monomiristina, observou-se comportamentos opostos entre estes em D1→D21 da osteoindução, tendo o ácido mirístico diminuído significativamente enquanto que a 1-monomiristina aumentou significativamente (Fig. 39), indicando que o ácido mirístico foi incorporado em 1-monomiristina ao longo do tempo (Fig. 35).

Quanto à 1,3-dipalmitina e o seu SFA constituinte (ácido palmítico), nota-se uma tendência decrescente até ao dia 14, em osteoindução, no DG (Fig. 41b) sendo que o comportamento oposto se consegue observar no ácido palmítico (Fig. 40c), indicando que a 1,3-dipalmitina está a ser catabolizada em ácido palmítico até ao dia 14 de osteoindução (Fig. 35). Na terceira semana de osteoindução estudada (D14→D21) o contrário aconteceu, havendo uma diminuição significativa do ácido palmítico e um aumento significativo da 1,3-dipalmitina (Fig. 39), indicação que neste período de tempo ocorreu o anabolismo de ácido palmítico em 1,3-dipalmitina (Fig. 35). Apesar de se observar uma diminuição significativa da 1,3-dipalmitina entre o início e o fim da osteoindução (D1→D21) e um simultâneo aumento significativo de ácido palmítico (Fig. 39), a vantagem de incorporar mais pontos temporais neste trabalho é o facto de se conseguir perceber este comportamento diferente nas células osteoinduzidas à terceira semana (D14→D21), havendo uma tendência para o catabolismo de 1,3-dipalmitina até à segunda semana e uma tendência para o anabolismo de 1,3-dipalmitina na terceira semana de osteoindução. A par destas observações, sabe-se que o ácido oleico consegue inibir a apoptose induzida por ácido palmítico, estimulando a sua esterificação em TGs [93]. Neste trabalho podemos estar a observar este efeito protetor por parte do ácido oleico, visto que este aumenta significativamente quando o ácido palmítico também aumenta (D1→D4) e que aumenta novamente de um modo significativo em D7→D14 (Fig. 39), antes da transição catabolismo→anabolismo da 1,3-dipalmitina, como que em preparação para a transformação de ácido palmítico em 1,3-dipalmitina observada na terceira semana de osteoindução (Fig. 40c e Fig. 41b).

### Colesterol

O colesterol é um constituinte da membrana, especialmente envolvido nas jangadas lipídicas (microdomínios que contêm recetores e outras moléculas importantes na sinalização molecular), estando presente cerca de 3 vezes mais na região de jangadas lipídicas que na restante membrana celular [116]. Neste trabalho, o colesterol evoluiu da mesma da mesma forma em ambas as condições, mostrando-se a uma concentração relativa ligeiramente mais baixa ao longo de toda a

osteoidução (Fig. 41c), o que pode significar que nas células em osteoidução há uma menor quantidade de jangadas lipídicas. Tal pode advir do facto de se tornarem num tipo de célula mais especializado (osteoblastos), o que faz com que possam perder algumas capacidades de sinalização molecular que não sejam importantes em osteoblastos. Além disso, sabe-se que as MSCs são um grande centro de sinalização celular, com várias moléculas de reconhecimento na sua superfície celular (zonas de jangadas lipídicas) [117].

### Pirofosfato e fosfoetanolamina

Quer o pirofosfato quer a fosfoetanolamina contêm fosfato na sua composição e ambos estão envolvidos no processo de osteogénese. O pirofosfato intracelular em condições controlo manteve-se relativamente estável ao longo do tempo, sendo que as barras de erro D14→D21 (Fig. 41e) são as únicas não coincidentes, podendo nesta última semana ter havido um aumento significativo deste composto. Já na condição osteoidução verificou-se um decréscimo constante de pirofosfato (Fig. 41e), havendo uma diminuição significativa na comparação D1→D21 (Fig. 39). Como se pode ver na Fig. 42, durante o processo de regeneração óssea há a libertação de vesículas envolvidas no processo de mineralização óssea, por parte dos osteoblastos [118]. Nessas vesículas há a hidrólise de fosfoetanolamina e fosfocolina para geração de fosfato, utilizado na produção de

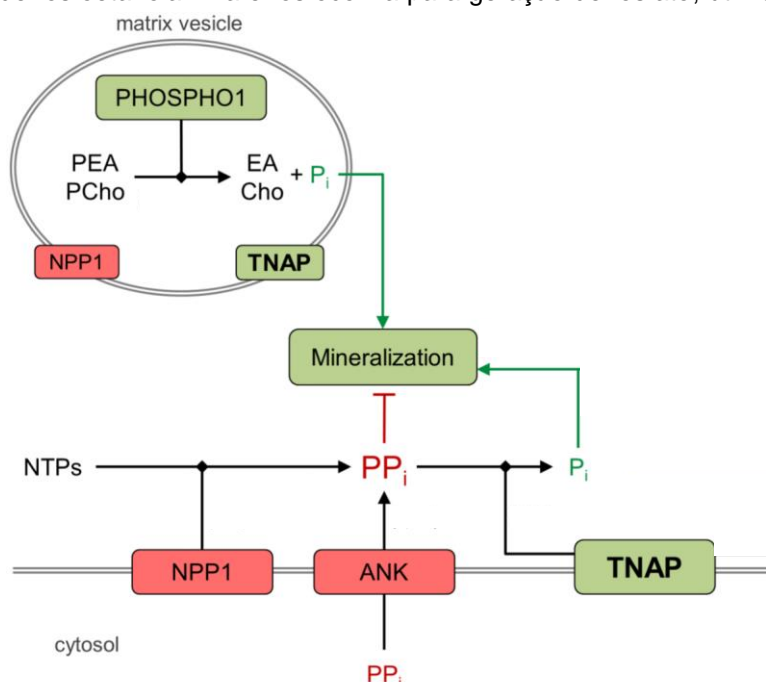


Fig. 42 - Papel do fosfato (Pi) e pirofosfato (PPi) na mineralização óssea. O PPi pode resultar quer da hidrólise de nucleótidos trifosfato (NTPs) através da enzima transmembranar NPP1, quer do transporte de PPi para o meio extracelular através de ANK. O PPi pode ser hidrolisado em Pi através da enzima membranar TNAP. Nas vesículas libertadas pelos osteoblastos, a fosfoetanolamina (PEA) e a fosfocolina (PCho) são hidrolisadas em etanolamina (EA) e Pi ou colina (Cho) e Pi, através da fosfatase PHOSPHO1. As setas a preto representam reações ou transporte de moléculas. As setas a verde indicam o estímulo da mineralização por parte de Pi. A seta a vermelho indica a inibição da mineralização por parte de PPi. Adaptado de [128].

hidroxiapatite (mineral maioritário do osso) [119]. Além disso sabe-se também que o pirofosfato consegue ser libertado para o meio extracelular através de uma proteína transmembranar, inibindo o processo de mineralização [120]. A enzima transmembranar TNAP (do inglês, *Tissue-Nonspecific Alkaline Phosphatase*) consegue hidrolisar o pirofosfato em fosfato, contribuindo assim para o avanço da mineralização óssea [119]. Tendo em conta este processo, os dados deste trabalho estão concordantes com estes eventos, sendo que a diminuição de pirofosfato, na condição osteoindutiva, observada na Fig. 41e pode advir da sua libertação para o meio extracelular. Também a evolução da fosfoetanolamina nas hAMSCs em osteoindução (Fig. 41f) indica que houve hidrólise deste composto na terceira semana, visto ter diminuído significativamente em D14→D21 (Fig. 39). Ainda neste gráfico (Fig. 41f) se pode ver que o comportamento das hAMSCs em condições controlo foi oposto (D14→D21), o que apoia a hipótese do envolvimento da fosfoetanolamina na osteogénese.

#### 4. Conclusões e perspectivas futuras

Nesta dissertação analisou-se o metaboloma de extratos apolares de hAMSCs cultivadas em meio basal (condição controlo) e em meio osteoindutivo (condição osteoindução), recorrendo-se à técnica de GC-MS. Após análise estatística, tentou-se compreender a evolução metabólica das hAMSCs em meio controlo (proliferação e envelhecimento celular) e em meio osteoindutivo (diferenciação osteogénica).

Na condição controlo mais de metade dos metabolitos alterados foram SFAs (que diminuíram). Além disso destacaram-se os UFAs (que tenderam a aumentar). Ainda relativamente à condição controlo realçaram-se as vias da  $\beta$ -oxidação de ácidos gordos, da biossíntese de PUFAs, o metabolismo de glicerolípidos, a glicólise e o ciclo de Krebs.

Já na osteoindução houve menos SFAs a variar (uns que aumentaram e outros que diminuíram) e mais UFAs a variar. Apesar de haver várias variações comuns entre as condições controlo e osteoindução (como ácido cáprico e ácido linoleico), destacaram-se vários metabolitos que variaram significativamente apenas na osteoindução (ácido esteárico, ácido palmitoleico, ácido oleico, 1-monomiristina, 1,3-dipalmitina, colesterol, pirofosfato e fosfoetanolamina). Além disso, independentemente das variações ao longo do tempo, houve metabolitos que apresentaram concentrações relativas diferentes, entre as condições controlo e osteoindução, especialmente aos dias 14 (ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico e 1,3-dipalmitina) e 21 (ácido cáprico, ácido mirístico, ácido esteárico, 1-monomiristina, glicerol, pirofosfato e fosfoetanolamina). Note-se que logo no dia 1 alguns metabolitos já apresentavam concentrações relativas diferentes entre as condições (1,3-dipalmitina e fosfoetanolamina). Ainda acerca da condição osteoindução, destaca-se o papel dos compostos que contêm fosfato (pirofosfato e fosfoetanolamina) para a mineralização óssea, o catabolismo geral de glicerolípidos na terceira semana (aumento de glicerol), aumento mais acentuado, comparativamente à condição controlo, do ácido docosahexaenóico (com propriedades inibidoras da osteoclastogénese e estimuladoras da osteogénese) e ainda o possível papel do ácido oleico como inibidor da apoptose induzida por ácido palmítico, que por sua vez se pode esterificar em TGs.

No futuro pretende-se comparar estas informações dos lípidos intracelulares com os dados provenientes do endometaboloma polar e ainda avaliar os meios extracelulares das condições aqui estudadas. Assim seria possível verificar se os aumentos e diminuições dos diversos metabolitos aqui explorados são devidos a trocas entre meio-célula e/ou se são utilizados noutras vias metabólicas intracelularmente.

## 5. Referências

1. Böhm J, Malfatti E, Oates E, Jones K, Brochier G, Boland A, Deleuze JF, Romero NB, Laporte J. Novel ASCC1 mutations causing prenatal-onset muscle weakness with arthrogryposis and congenital bone fractures. *J Med Genet.* 2019;56: 617–621. doi:10.1136/jmedgenet-2018-105390
2. Rodrigues AM, Canhão H, Marques A, Ambrósio C, Borges J, Coelho P, Costa L, Fernandes S, Gonçalves I, Gonçalves M, Guerra M, Marques ML, Pimenta S, Pinto P, Sequeira G, Simões E, Teixeira L, ... da Silva J. Portuguese recommendations for the prevention, diagnosis and management of primary osteoporosis - 2018 update. *Acta Reumatol Port.* 2018;43: 10–31.
3. Brás V, Boaventura IS, Jorge BI, Marta RI, Ana SI, Miguéns C, Horta IL, Soares IP. Osteoporose e Quedas : Problemas Não Valorizados pela Comunidade Médica Portuguesa. *Rev da Soc Port Med Física e Reabil.* 2019;31: 15–23. doi:10.25759/spmfr.312
4. Mills LA, Aitken SA, Simpson AHRW. The risk of non-union per fracture: current myths and revised figures from a population of over 4 million adults. *Acta Orthop.* 2017;88: 434–439. doi:10.1080/17453674.2017.1321351
5. Schmidt AH. Autologous bone graft: Is it still the gold standard? *Injury.* 2021;52: S18–S22. doi:10.1016/j.injury.2021.01.043
6. Kim T, See CW, Li X, Zhu D. Orthopedic implants and devices for bone fractures and defects: Past, present and perspective. *Eng Regen.* 2020;1: 6–18. doi:10.1016/j.engreg.2020.05.003
7. Fan J, Jahed V, Klavins K. Metabolomics in bone research. *Metabolites.* 2021;11. doi:10.3390/metabo11070434
8. Rajabzadeh N, Fathi E, Farahzadi R. Stem cell-based regenerative medicine. *Stem Cell Investig.* 2019;6: 18. doi:10.21037/sci.2019.06.04
9. Dsa E, Chatterjee A, Pradeep AR. Stem cells - The powerhouse of tissue engineering. *J Adv Clin Res Insights.* 2021;8: 68–72. doi:10.15713/ins.jcri.333
10. Barky AR EL, Ali EMM, Mohamed TM. Stem Cells, Classifications and their Clinical Applications. *Am J Pharmacol Ther.* 2017;1: 1–7.
11. Gomez-Salazar M, Gonzalez-Galofre ZN, Casamitjana J, Crisan M, James AW, Péault B. Five Decades Later, Are Mesenchymal Stem Cells Still Relevant? *Front Bioeng Biotechnol.* 2020;8: 148. doi:10.3389/fbioe.2020.00148
12. Jimenez-Puerta GJ, Marchal JA, López-Ruiz E, Gálvez-Martín P. Role of Mesenchymal Stromal Cells as Therapeutic Agents: Potential Mechanisms of Action and Implications in

- Their Clinical Use. *J Clin Med*. 2020;9: 445. doi:10.3390/jcm9020445
13. Valenti MT, Carbonare LD, Mottes M. Osteogenic differentiation in healthy and pathological conditions. *Int J Mol Sci*. 2017;18: 41. doi:10.3390/ijms18010041
  14. Loi F, Córdova LA, Pajarinen J, Lin T hua, Yao Z, Goodman SB. Inflammation, fracture and bone repair. *Bone*. 2016;86: 119–130. doi:10.1016/j.bone.2016.02.020
  15. Iaquinta MR, Mazzoni E, Bononi I, Rotondo JC, Mazziotta C, Montesi M, Sprio S, Tampieri A, Tognon M, Martini F. Adult Stem Cells for Bone Regeneration and Repair. *Front Cell Dev Biol*. 2019;7: 1–15. doi:10.3389/fcell.2019.00268
  16. Stavros C. Manolagas. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev*. 2000;21: 115–137. doi:10.1210/edrv.21.2.0395
  17. Arnett TR, Orriss IR. Metabolic properties of the osteoclast. *Bone*. 2018;115: 25–30. doi:10.1016/j.bone.2017.12.021
  18. Guntur AR, Le PT, Farber CR, Rosen CJ. Bioenergetics during calvarial osteoblast differentiation reflect strain differences in bone mass. *Endocrinology*. 2014;155: 1589–1595. doi:10.1210/en.2013-1974
  19. Mohammadalipour A, Dumbali SP, Wenzel PL. Mitochondrial Transfer and Regulators of Mesenchymal Stromal Cell Function and Therapeutic Efficacy. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8: 1–22. doi:10.3389/fcell.2020.603292
  20. Yao Y, Deng Q, Song W, Zhang H, Li Y, Yang Y, Fan X, Liu M, Shang J, Sun C, Tang Y, Jin X, Liu H, Huang B, Zhou Y. MIF Plays a Key Role in Regulating Tissue-Specific Chondro-Osteogenic Differentiation Fate of Human Cartilage Endplate Stem Cells under Hypoxia. *Stem Cell Reports*. 2016;7: 249–262. doi:10.1016/j.stemcr.2016.07.003
  21. Shum LC, White NS, Mills BN, De Mesy Bentley KL, Eliseev RA. Energy Metabolism in Mesenchymal Stem Cells during Osteogenic Differentiation. *Stem Cells Dev*. 2016;25: 114–122. doi:10.1089/scd.2015.0193
  22. Lee WC, Ji X, Nissim I, Long F. Malic Enzyme Couples Mitochondria with Aerobic Glycolysis in Osteoblasts. *Cell Rep*. 2020;32: 108108. doi:10.1016/j.celrep.2020.108108
  23. Kim JM, Jeong D, Kang HK, Jung SY, Kang SS, Min BM. Osteoclast precursors display dynamic metabolic shifts toward accelerated glucose metabolism at an early stage of RANKL-stimulated osteoclast differentiation. *Cell Physiol Biochem*. 2007;20: 935–946. doi:10.1159/000110454
  24. Kasonga AE, Deepak V, Kruger MC, Coetzee M. Arachidonic acid and docosahexaenoic acid



- suppress osteoclast formation and activity in human CD14+ monocytes, in vitro. *PLoS One*. 2015;10: 1–19. doi:10.1371/journal.pone.0125145
25. Levental KR, Surma MA, Skinkle AD, Lorent JH, Zhou Y, Klose C, Chang JT, Hancock JF, Levental I. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids Direct Differentiation of the Membrane Phenotype in Mesenchymal Stem Cells To Potentiate Osteogenesis. *Sci Adv*. 2017;3: 1–15. doi:10.1126/sciadv.aao1193
  26. Ryu J, Kim H, Chang EJ, Kim HJ, Lee Y, Kim HH. Proteomic analysis of osteoclast lipid rafts: The role of the integrity of lipid rafts on V-ATPase activity in osteoclasts. *J Bone Miner Metab*. 2010;28: 410–417. doi:10.1007/s00774-009-0150-y
  27. Györi D, Csete D, Benkő S, Kulkarni S, Mandl P, Dobó-Nagy C, Vanhaesebroeck B, Stephens L, Hawkins PT, Mócsai A. The phosphoinositide 3-kinase isoform pi3k $\beta$  regulates osteoclast-mediated bone resorption in humans and mice. *Arthritis Rheumatol*. 2014;66: 2210–2221. doi:10.1002/art.38660
  28. van Gestel N, Stegen S, Eelen G, Schoors S, Carlier A, Daniëls VW, Baryawno N, Przybylski D, Depypere M, Stiers PJ, Lambrechts D, Van Looveren R, Torrekens S, Sharda A, Agostinis P, Lambrechts D, Maes F, ... Carmeliet G. Lipid availability determines fate of skeletal progenitor cells via SOX9. *Nature*. 2020;579: 111–117. doi:10.1038/s41586-020-2050-1
  29. Kon T, Cho TJ, Aizawa T, Yamazaki M, Nooh N, Graves D, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Expression of osteoprotegerin, receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (osteoprotegerin ligand) and related proinflammatory cytokines during fracture healing. *J Bone Miner Res*. 2001;16: 1004–1014. doi:10.1359/jbmr.2001.16.6.1004
  30. Bielby R, Jones E, McGonagle D. The role of mesenchymal stem cells in maintenance and repair of bone. *Injury*. 2007;38: S26–S32. doi:10.1016/j.injury.2007.02.007
  31. Wu A, Zeng Z. Anti-synchronization control of a class of memristive recurrent neural networks. *Commun Nonlinear Sci Numer Simul*. 2013;18: 373–385. doi:10.1016/j.cnsns.2012.07.005
  32. Aspenberg P, Sandberg O. Distal radial fractures heal by direct woven bone formation. *Acta Orthop*. 2013;84: 297–300. doi:10.3109/17453674.2013.792769
  33. Tsiridis E, Upadhyay N, Giannoudis P. Molecular aspects of fracture healing: Which are the important molecules? *Injury*. 2007;38: 511–525. doi:10.1016/j.injury.2007.02.006
  34. Marsell R, Einhorn TA. The biology of fracture healing. *Injury*. 2011;42: 551–555. doi:10.1016/j.injury.2011.03.031
  35. Claes L, Recknagel S, Ignatius A. Fracture healing under healthy and inflammatory conditions. *Nat Rev Rheumatol*. 2012;8: 133–143. doi:10.1038/nrrheum.2012.1

36. Harwood PJ, Newman JB, Michael ALR. (ii) An update on fracture healing and non-union. *Orthop Trauma*. 2010;24: 9–23. doi:10.1016/j.mporth.2009.12.004
37. Schindeler A, McDonald MM, Bokko P, Little DG. Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. *Semin Cell Dev Biol*. 2008;19: 459–466. doi:10.1016/j.semcdb.2008.07.004
38. Malizos KN, Papatheodorou LK. The healing potential of the periosteum molecular aspects. *Injury*. 2005;36 Suppl 3: 13–19. doi:10.1016/j.injury.2005.07.030
39. Gerstenfeld LC, Cullinane DM, Barnes GL, Graves DT, Einhorn TA. Fracture healing as a post-natal developmental process: Molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *J Cell Biochem*. 2003;88: 873–884. doi:10.1002/jcb.10435
40. Robey PG. Cell Sources for Bone Regeneration: The Good, the Bad, and the Ugly (But Promising). *Tissue Eng Part B Rev*. 2011;17: 423–430. doi:10.1089/ten.teb.2011.0199
41. Hamidouche Z, Haÿ E, Vaudin P, Charbord P, Schüle R, Marie PJ, Fromigué O. FHL2 mediates dexamethasone-induced mesenchymal cell differentiation into osteoblasts by activating Wnt/ $\beta$ -catenin signaling-dependent Runx2 expression. *FASEB J*. 2008;22: 3813–3822. doi:10.1096/fj.08-106302
42. Langenbach F, Handschel J. Effects of dexamethasone, ascorbic acid and  $\beta$ -glycerophosphate on the osteogenic differentiation of stem cells in vitro. *Stem Cell Res Ther*. 2013;4: 117. doi:10.1186/scri328
43. Labuda J, Bowater RP, Fojta M, Gauglitz G, Glatz Z, Hapala I, Havliš J, Kilar F, Kilar A, Malinová L, Sirén HMM, Skládal P, Torta F, Valachovič M, Wimmerová M, Zdráhal Z, Hibbert DB. Terminology of bioanalytical methods (IUPAC Recommendations 2018). *Pure Appl Chem*. 2018;90: 1121–1198. doi:10.1515/pac-2016-1120
44. Kostidis S, Addie RD, Morreau H, Mayboroda OA, Giera M. Quantitative NMR analysis of intra- and extracellular metabolism of mammalian cells: A tutorial. *Anal Chim Acta*. 2017;980: 1–24. doi:10.1016/j.aca.2017.05.011
45. Harayama T, Riezman H. Understanding the diversity of membrane lipid composition. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Nature Publishing Group; 2018;19: 281–296. doi:10.1038/nrm.2017.138
46. Percival B, Gibson M, Leenders J, Wilson PB, Grootveld M. Chapter 1. Univariate and Multivariate Statistical Approaches to the Analysis and Interpretation of NMR-based Metabolomics Datasets of Increasing Complexity. *Theoretical and Computational Chemistry Series*. 2020. pp. 1–40. doi:10.1039/9781788015882-00001
47. Xi B, Gu H, Baniyadi H, Raftery D. Statistical Analysis and Modeling of Mass Spectrometry-Based Metabolomics Data. *A Law Unto Herself*. 2014. pp. 333–353. doi:10.1007/978-1-4939-1258-2\_22

48. Wishart DS, Godzien J, Gil-De-La-Fuente A, Mandal R, Rajabzadeh R, Pirimoghadam H, Ladner-Keay C, Otero A, Barbas C. Chapter 3: Metabolomics. *New Developments in Mass Spectrometry*. 2020. pp. 41–95. doi:10.1039/9781788019880-00041
49. Spicer R, Salek RM, Moreno P, Cañueto D, Steinbeck C. Navigating freely-available software tools for metabolomics analysis. *Metabolomics*. 2017;13: 106. doi:10.1007/s11306-017-1242-7
50. C. Moldoveanu S, David V. *Derivatization Methods in GC and GC/MS. Gas Chromatography - Derivatization, Sample Preparation, Application*. IntechOpen; 2019. pp. 1–33. doi:10.5772/intechopen.81954
51. McNair HM, Miller JM, Snow NH. *Basic Gas Chromatography*. 3rd ed. *Basic Gas Chromatography*. Wiley; 2019. doi:10.1002/9781119450795
52. Hübschmann H-J. *Handbook of GC-MS*. 3rd ed. Wiley; 2015. doi:10.1002/9783527674305
53. Sparkman OD, Penton ZE, Kitson FG. *Gas Chromatography. Gas Chromatography and Mass Spectrometry: A Practical Guide*. Elsevier; 2011. pp. 15–83. doi:10.1016/B978-0-12-373628-4.00002-2
54. Stauffer E, Dolan JA, Newman R. *Gas Chromatography and Gas Chromatography—Mass Spectrometry. Fire Debris Analysis*. Elsevier; 2008. pp. 235–293. doi:10.1016/B978-012663971-1.50012-9
55. Wu Z, Bagarolo GI, Thoröe-Boveleth S, Jankowski J. “Lipidomics”: Mass spectrometric and chemometric analyses of lipids. *Adv Drug Deliv Rev*. 2020;159: 294–307. doi:10.1016/j.addr.2020.06.009
56. Kaklamanos G, Aprea E, Theodoridis G. *Mass Spectrometry: Principles and Instrumentation. Encyclopedia of Food and Health*. 1st ed. Elsevier; 2016. pp. 661–668. doi:10.1016/B978-0-12-384947-2.00447-5
57. Harvey DJ, Vouros P. Mass Spectrometric Fragmentation Of Trimethylsilyl And Related Alkylsilyl Derivatives. *Mass Spectrom Rev*. 2020;39: 105–211. doi:10.1002/mas.21590
58. Rontani JF, Zabeti N, Aubert C. Double Bond Migration to Methylidene Positions During Electron Ionization Mass Spectrometry of Branched Monounsaturated Fatty Acid Derivatives. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2009;20: 1997–2005. doi:10.1016/j.jasms.2009.07.020
59. Christie WW, Han X. *Lipid Analysis Isolation, Separation, Identification And Lipidomic Analysis*. 4th ed. Woodhead Publishing; 2010.
60. Zhao X, Niu L, Clerici C, Russo R, Byrd M, Setchell KDR. Data analysis of MS-based clinical lipidomics studies with crossover design: A tutorial mini-review of statistical methods. *Clin*

Mass Spectrom. 2019;13: 5–17. doi:10.1016/j.clinms.2019.05.002

61. Saccenti E, Hoefsloot HCJ, Smilde AK, Westerhuis JA, Hendriks MMWB. Reflections on univariate and multivariate analysis of metabolomics data. *Metabolomics*. 2014;10: 361–374. doi:10.1007/s11306-013-0598-6
62. Bispo DSC, Jesus CSH, Marques IMC, Romek KM, Oliveira MB, Mano JF, Gil AM. Metabolomic Applications in Stem Cell Research: a Review. *Stem Cell Rev Reports*. 2021; doi:10.1007/s12015-021-10193-z
63. Clémot M, Sênos Demarco R, Jones DL. Lipid Mediated Regulation of Adult Stem Cell Behavior. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8: 115. doi:10.3389/fcell.2020.00115
64. Lu W, Su X, Klein MS, Lewis IA, Fiehn O, Rabinowitz JD. Metabolite measurement: Pitfalls to avoid and practices to follow. *Annu Rev Biochem*. 2017;86: 277–304. doi:10.1146/annurev-biochem-061516-044952
65. Surrati A, Evseev S, Jourdan F, Kim DH, Sottile V. Osteogenic response of human mesenchymal stem cells analysed using combined intracellular and extracellular metabolomic monitoring. *Cell Physiol Biochem*. 2021;55: 311–326. doi:10.33594/000000377
66. McNamara LE, Sjöström T, Burgess KEV, Kim JJW, Liu E, Gordonov S, Moghe P V., Meek RMD, Oreffo ROC, Su B, Dalby MJ. Skeletal stem cell physiology on functionally distinct titania nanotopographies. *Biomaterials*. 2011;32: 7403–7410. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.06.063
67. McMurray RJ, Gadegaard N, Tsimbouri PM, Burgess K V., McNamara LE, Tare R, Murawski K, Kingham E, Oreffo ROC, Dalby MJ. Nanoscale surfaces for the long-term maintenance of mesenchymal stem cell phenotype and multipotency. *Nat Mater*. 2011;10: 637–644. doi:10.1038/nmat3058
68. Zhao G, Zhong H, Rao T, Pan Z. Metabolomic Analysis Reveals That the Mechanism of Astaxanthin Improves the Osteogenic Differentiation Potential in Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Oxid Med Cell Longev*. 2020;2020: 3427430. doi:10.1155/2020/3427430
69. Hodgkinson T, Tsimbouri PM, Llopis-Hernandez V, Campsie P, Scurr D, Childs PG, Phillips D, Donnelly S, Wells JA, O'Brien FJ, Salmeron-Sanchez M, Burgess K, Alexander M, Vassalli M, Oreffo ROC, Reid S, France DJ, Dalby MJ. The use of nanovibration to discover specific and potent bioactive metabolites that stimulate osteogenic differentiation in mesenchymal stem cells. *Sci Adv*. 2021;7: eabb7921. doi:10.1126/sciadv.abb7921
70. Orapiriyakul W, Tsimbouri MP, Childs P, Campsie P, Wells J, Fernandez-Yague MA, Burgess K, Tanner KE, Tassieri M, Meek D, Vassalli M, Biggs MJP, Salmeron-Sanchez M, Oreffo ROC, Reid S, Dalby MJ. Nanovibrational Stimulation of Mesenchymal Stem Cells Induces

- Therapeutic Reactive Oxygen Species and Inflammation for Three-Dimensional Bone Tissue Engineering. *ACS Nano*. 2020;14: 10027–10044. doi:10.1021/acsnano.0c03130
71. Silva CG da, Barretto LS de S, Lo Turco EG, Santos A de L, Lessio C, Martins Júnior HA, Almeida FG de. Lipidomics of mesenchymal stem cell differentiation. *Chem Phys Lipids*. 2020;232: 104964. doi:10.1016/j.chemphyslip.2020.104964
  72. Surrati A, Linforth R, Fisk ID, Sottile V, Kim DH. Non-destructive characterisation of mesenchymal stem cell differentiation using LC-MS-based metabolite footprinting. *Analyst*. 2016;141: 3776–3787. doi:10.1039/c6an00170j
  73. Seras-Franzoso J, Tsimbouri PM, Burgess K V., Unzueta U, Garcia-Fruitos E, Vazquez E, Villaverde A, Dalby MJ. Topographically targeted osteogenesis of mesenchymal stem cells stimulated by inclusion bodies attached to polycaprolactone surfaces. *Nanomedicine*. 2014;9: 207–220. doi:10.2217/nnm.13.43
  74. Roberts JN, Sahoo JK, Mcnamara LE, Burgess K V., Yang J, Alakpa E V., Anderson HJ, Hay J, Turner LA, Yarwood SJ, Zelzer M, Oreffo ROC, Ulijn R V., Dalby MJ, Ore ROC, Ulijn R V., Dalby MJ. Dynamic Surfaces for the Study of Mesenchymal Stem Cell Growth through Adhesion Regulation. *ACS Nano*. 2016;10: 6667–6679. doi:10.1021/acsnano.6b01765
  75. Bow A, Jackson B, Griffin C, Howard S, Castro H, Campagna S, Biris AS, Anderson DE, Bourdo S, Dhar M. Multiomics Evaluation of Human Fat-Derived Mesenchymal Stem Cells on an Osteobiologic Nanocomposite. *Biores Open Access*. 2020;9: 37–50. doi:10.1089/biores.2020.0005
  76. Tsimbouri PM, Childs PG, Pemberton GD, Yang J, Jayawarna V, Orapiriyakul W, Burgess K, González-García C, Blackburn G, Thomas D, Vallejo-Giraldo C, Biggs MJP, Curtis ASG, Salmerón-Sánchez M, Reid S, Dalby MJ. Stimulation of 3D osteogenesis by mesenchymal stem cells using a nanovibrational bioreactor. *Nat Biomed Eng*. Springer US; 2017;1: 758–770. doi:10.1038/s41551-017-0127-4
  77. Amer MH, Alvarez-Paino M, McLaren J, Pappalardo F, Trujillo S, Wong JQ, Shrestha S, Abdelrazig S, Stevens LA, Lee JB, Kim DH, González-García C, Needham D, Salmerón-Sánchez M, Shakesheff KM, Alexander MR, Alexander C, Rose FR. Designing topographically textured microparticles for induction and modulation of osteogenesis in mesenchymal stem cell engineering. *Biomaterials*. 2021;266: 120450. doi:10.1016/j.biomaterials.2020.120450
  78. Tsimbouri PM, McMurray RJ, Burgess K V., Alakpa E V., Reynolds PM, Murawski K, Kingham E, Oreffo ROC, Gadegaard N, Dalby MJ. Using nanotopography and metabolomics to identify biochemical effectors of multipotency. *ACS Nano*. 2012;6: 10239–10249. doi:10.1021/nn304046m

79. McNamara LE, Sjöström T, Meek RMD, Oreffo ROC, Su B, Dalby MJ, Burgess KEV. Metabolomics: A valuable tool for stem cell monitoring in regenerative medicine. *J R Soc Interface*. 2012;9: 1713–1724. doi:10.1098/rsif.2012.0169
80. Yanes O, Clark J, Wong DM, Patti GJ, Sánchez-Ruiz A, Benton HP, Trauger SA, Despons C, Ding S, Siuzdak G. Metabolic oxidation regulates embryonic stem cell differentiation. *Nat Chem Biol*. 2010;6: 411–417. doi:10.1038/nchembio.364
81. Packer L, Cadenas E. Lipoic acid: Energy metabolism and redox regulation of transcription and cell signaling. *J Clin Biochem Nutr*. 2011;48: 26–32. doi:10.3164/jcbn.11-005FR
82. Reyes JMG, Fermanian S, Yang F, Zhou S-Y, Herretes S, Murphy DB, Elisseff JH, Chuck RS. Metabolic Changes in Mesenchymal Stem Cells in Osteogenic Medium Measured by Autofluorescence Spectroscopy. *Stem Cells*. 2006;24: 1213–1217. doi:10.1634/stemcells.2004-0324
83. Wijnands KAP, Brink PRG, Weijers PHE, Dejong CHC, Poeze M. Impaired fracture healing associated with amino acid disturbances. *Am J Clin Nutr*. 2012;95: 1270–1277. doi:10.3945/ajcn.110.009209
84. Barbul A. Proline precursors to sustain mammalian collagen synthesis. *J Nutr*. 2008;138: 2021–2024. doi:10.1093/jn/138.10.2021s
85. Lee JS, Lee HJ, Lee JW, Lee SC, Heo JS. Osteogenic effect of inducible nitric oxide synthase (iNOS)-Loaded mineralized nanoparticles on embryonic stem cells. *Cell Physiol Biochem*. 2018;51: 746–762. doi:10.1159/000495330
86. Kim EE, Wyckoff HW. Reaction mechanism of alkaline phosphatase based on crystal structures. *J Mol Biol*. 1991;218: 449–464. doi:10.1016/0022-2836(91)90724-K
87. Harrison AP, Pierzynowski SG. Biological effects of 2-oxoglutarate with particular emphasis on the regulation of protein, mineral and lipid absorption/metabolism, muscle performance, kidney function, bone formation and cancerogenesis, all viewed from a healthy ageing perspective state. *J Physiol Pharmacol*. 2008;59 Suppl 1: 91–106.
88. Hu YY, Rawal A, Schmidt-Rohr K. Strongly bound citrate stabilizes the apatite nanocrystals in bone. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107: 22425–22429. doi:10.1073/pnas.1009219107
89. Kit S, Minekawa Y. Mitochondrial thymidine-deoxyuridine-phosphorylating activity and the replication of mitochondrial DNA. *Cancer Res*. 1972;32: 2277–88.
90. Schmid PC, Reddy P V., Natarajan V, Schmid HH. Metabolism of N-acyl ethanolamine phospholipids by a mammalian phosphodiesterase of the phospholipase D type. *J Biol Chem*. 1983;258: 9302–9306. doi:10.1016/s0021-9258(17)44667-9

91. Sun YX, Xu AH, Yang Y, Zhang JX, Yu AW. Activation of cannabinoid receptor 2 enhances osteogenic differentiation of bone marrow derived mesenchymal stem cells. *Biomed Res Int.* 2015;2015: 1–9. doi:10.1155/2015/874982
92. Rossi, Tortora, Punzo, Bellini, Argenziano, Di Paola, Torella, Perrotta. The Endocannabinoid/Endovanilloid System in Bone: From Osteoporosis to Osteosarcoma. *Int J Mol Sci.* 2019;20: 1919. doi:10.3390/ijms20081919
93. Fillmore N, Huqi A, Jaswal JS, Mori J, Paulin R, Haromy A, Onay-Besikci A, Ionescu L, Thébaud B, Michelakis E, Lopaschuk GD. Effect of fatty acids on human bone marrow mesenchymal stem cell energy metabolism and survival. *PLoS One.* 2015;10: 1–17. doi:10.1371/journal.pone.0120257
94. Okamoto T, Aoyama T, Nakayama T, Nakamata T, Hosaka T, Nishijo K, Nakamura T, Kiyono T, Toguchida J. Clonal heterogeneity in differentiation potential of immortalized human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;295: 354–361. doi:10.1016/S0006-291X(02)00661-7
95. Ijlst L, De Kromme I, Oostheim W, Wanders RJA. Molecular cloning and expression of human L-pipecolate oxidase. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;270: 1101–1105. doi:10.1006/bbrc.2000.2575
96. Hallen A, Jamie JF, Cooper AJL. Lysine metabolism in mammalian brain: An update on the importance of recent discoveries. *Amino Acids.* 2013;45: 1249–1272. doi:10.1007/s00726-013-1590-1
97. Sell DR, Strauch CM, Shen W, Monnier VM. Aging, diabetes, and renal failure catalyze the oxidation of lysyl residues to 2-amino adipic acid in human skin collagen: Evidence for metal-catalyzed oxidation mediated by  $\alpha$ -dicarbonyls. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1126: 205–209. doi:10.1196/annals.1433.065
98. Zhang W, Yan Z, Jan LY, Jan YN. Sound response mediated by the TRP channels NOMPC, NANCHUNG, and INACTIVE in chordotonal organs of *Drosophila* larvae. *Proc Natl Acad Sci.* 2013;110: 13612–13617. doi:10.1073/pnas.1312477110
99. Strott CA, Higashi Y. Cholesterol sulfate in human physiology: what's it all about? *J Lipid Res.* 2003;44: 1268–1278. doi:10.1194/jlr.R300005-JLR200
100. Cao X, Chen D. The BMP signaling and in vivo bone formation. *Gene.* 2005;357: 1–8. doi:10.1016/j.gene.2005.06.017
101. Zeki ÖC, Eylem CC, Reçber T, Kir S, Nemutlu E. Integration of GC–MS and LC–MS for untargeted metabolomics profiling. *J Pharm Biomed Anal.* 2020;190: 113509. doi:10.1016/j.jpba.2020.113509

102. Klontzas ME, Vernardis SI, Heliotis M, Tsiridis E, Mantalaris A. Metabolomics Analysis of the Osteogenic Differentiation of Umbilical Cord Blood Mesenchymal Stem Cells Reveals Differential Sensitivity to Osteogenic Agents. *Stem Cells Dev.* 2017;26: 723–733. doi:10.1089/scd.2016.0315
103. Chen C-T, Shih Y-R V., Kuo TK, Lee OK, Wei Y-H. Coordinated Changes of Mitochondrial Biogenesis and Antioxidant Enzymes During Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells.* 2008;26: 960–968. doi:10.1634/stemcells.2007-0509
104. Klontzas ME, Reakasame S, Silva R, Morais JCF, Vernardis S, MacFarlane RJ, Heliotis M, Tsiridis E, Panoskaltis N, Boccaccini AR, Mantalaris A. Oxidized alginate hydrogels with the GHK peptide enhance cord blood mesenchymal stem cell osteogenesis: A paradigm for metabolomics-based evaluation of biomaterial design. *Acta Biomater.* 2019;88: 224–240. doi:10.1016/j.actbio.2019.02.017
105. Yen CF, Wang HS, Lee CL, Liao SK. Roles of integrin-linked kinase in cell signaling and its perspectives as a therapeutic target. *Gynecol Minim Invasive Ther.* 2014;3: 67–72. doi:10.1016/j.gmit.2014.06.002
106. Liu DD, Han CC, Wan HF, He F, Xu HY, Wei SH, Du XH, Xu F. Effects of inhibiting PI3K-Akt-mTOR pathway on lipid metabolism homeostasis in goose primary hepatocytes. *Animal.* 2016;10: 1319–1327. doi:10.1017/S1751731116000380
107. Wu H, Southam AD, Hines A, Viant MR. High-throughput tissue extraction protocol for NMR- and MS-based metabolomics. *Anal Biochem.* 2008;372: 204–212. doi:10.1016/j.ab.2007.10.002
108. Bridge PD, Sawilowsky SS. Increasing physicians' awareness of the impact of statistics on research outcomes: Comparative power of the t-test and Wilcoxon Rank-Sum test in small samples applied research. *J Clin Epidemiol.* 1999;52: 229–235. doi:10.1016/S0895-4356(98)00168-1
109. Berben L, Sereika SM, Engberg S. Effect size estimation: Methods and examples. *Int J Nurs Stud.* Elsevier Ltd; 2012;49: 1039–1047. doi:10.1016/j.ijnurstu.2012.01.015
110. Schönfeld P, Wojtczak L. Short- and medium-chain fatty acids in energy metabolism: The cellular perspective. *J Lipid Res.* 2016;57: 943–954. doi:10.1194/jlr.R067629
111. Adeva-andany M, López-ojén M, Funcasta-calderón R, Ameneiros-rodríguez E. Mitochondrion Comprehensive review on lactate metabolism in human health. *Mitochondrion.* 2014;17: 76–100. doi:10.1016/j.mito.2014.05.007
112. Yin Q, Xu N, Xu D, Dong M, Shi X, Wang Y, Hao Z, Zhu S, Zhao D, Jin H, Liu W. Comparison of senescence-related changes between three- And two-dimensional cultured adipose-



- derived mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther.* 2020;11: 1–12. doi:10.1186/s13287-020-01744-1
113. Yen C-LE, Farese R V. Fat breakdown: A function for CGI-58 (ABHD5) provides a new piece of the puzzle. *Cell Metab.* 2006;3: 305–307. doi:10.1016/j.cmet.2006.04.001
114. Kumar P, Dubey KK. Citric Acid Cycle Regulation: Back Bone for Secondary Metabolite Production. *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering.* Elsevier; 2019. pp. 165–181. doi:10.1016/B978-0-444-63504-4.00013-X
115. Abshirini M, Ilesanmi-Oyelere BL, Kruger MC. Potential modulatory mechanisms of action by long-chain polyunsaturated fatty acids on bone cell and chondrocyte metabolism. *Prog Lipid Res.* 2021;83: 101113. doi:10.1016/j.plipres.2021.101113
116. Pike LJ. Lipid rafts: Bringing order to chaos. *J Lipid Res.* 2003;44: 655–667. doi:10.1194/jlr.R200021-JLR200
117. Hart DA. What Molecular Recognition Systems Do Mesenchymal Stem Cells/Medicinal Signaling Cells (MSC) Use to Facilitate Cell-Cell and Cell Matrix Interactions? A Review of Evidence and Options. *Int J Mol Sci.* 2021;22: 8637. doi:10.3390/ijms22168637
118. Ansari S, de Wildt BWM, Vis MAM, de Korte CE, Ito K, Hofmann S, Yuana Y. Matrix Vesicles: Role in Bone Mineralization and Potential Use as Therapeutics. *Pharmaceuticals.* 2021;14: 289. doi:10.3390/ph14040289
119. Vimalraj S. Alkaline phosphatase: Structure, expression and its function in bone mineralization. *Gene.* 2020;754: 144855. doi:10.1016/j.gene.2020.144855
120. Orriss IR. Extracellular pyrophosphate: The body’s “water softener.” *Bone.* 2020;134: 115243. doi:10.1016/j.bone.2020.115243
121. Raghu P, Joseph A, Krishnan H, Singh P, Saha S. Phosphoinositides: Regulators of Nervous System Function in Health and Disease. *Front Mol Neurosci.* 2019;12: 208. doi:10.3389/fnmol.2019.00208
122. Yu LR, Conrads TP, Veenstra TD. Mass spectrometry instrumentation. *Analytical Instrumentation Handbook, Third Edition.* Elsevier; 2004. pp. 429–443. doi:10.1201/9780849390395.ch14
123. Murgia A, Mancuso L, Manis C, Caboni P, Cao G. GC-MS metabolomics analysis of mesenchymal stem cells treated with copper oxide nanoparticles. *Toxicol Mech Methods.* 2016;26: 611–619. doi:10.1080/15376516.2016.1220654
124. Higgins C. Lactate and lactic acidosis [Internet]. 2007. Available: <https://acutecaretesting.org/en/articles/lactate-and-lactic-acidosis/>

125. Haghghi F, Galfalvy H, Chen S, Huang Y, Cooper TB, Burke AK, Oquendo MA, Mann JJ, Sublette ME. DNA Methylation Perturbations in Genes Involved in Polyunsaturated Fatty Acid Biosynthesis Associated with Depression and Suicide Risk. *Front Neurol.* 2015;6: 92. doi:10.3389/fneur.2015.00092
126. Lee SH, Lee SK, Paik D, Min KJ. Overexpression of fatty-acid- $\beta$ -oxidation-related genes extends the lifespan of drosophila melanogaster. *Oxid Med Cell Longev.* 2012;2012. doi:10.1155/2012/854502
127. Baggott J. IX. Mitochondrial beta-oxidation [Internet]. 1998. Available: [https://library.med.utah.edu/NetBiochem/FattyAcids/9\\_5.html](https://library.med.utah.edu/NetBiochem/FattyAcids/9_5.html)
128. Mckee MD, Hoac B, Addison WN, Barros NMT, Millán JL, Chaussain C. Extracellular matrix mineralization in periodontal tissues: Noncollagenous matrix proteins, enzymes, and relationship to hypophosphatasia and X-linked hypophosphatemia. *Periodontol* 2000. 2013;63: 102–122. doi:10.1111/prd.12029