Resumo Tema3 - Identificação, caracterização e quantificação de lipídeos por espectrometria de massas

Lipídios constituem um grupo heterogêneo de biomoléculas de baixo peso molecular, predominantemente hidrofóbicas que se caracterizam pela presença de cadeia alquilicas lineares, geralmente com números pares de átomos de carbono e presença de ligações duplas em posições características, ou unidades de isopreno em estruturas lineares ou cíclicas. Lipideos podem conter grupos substituintes oxigenados, tais como ácido carboxílico, grupos hidroxila e/ou outros heteroátomos, tais como nitrogênio em aminas/amidas. Estes podem estar ligados covalentemente ao glicerol, carboidratos, fosfato e outros grupamentos polares, tornando as moléculas mais anfifílicas.

Atualmente, no banco de dados LIPID MAPS (LMSD, http: // www.lipidmaps.org/resources/database) estão anotadas 44.701 estruturas lipídicas únicas distribuidas em oito categorias, ácidos graxos (FA), glicerolipídios (GL), glicerofosfolipídios (GP), esfingolipídios (SP), esteróis (ST), prenois (PR), sacarolipídios (SL),e policetídeos (PK).

Nos organismos os lipídeos participam de múltiplas funções como ancoragem de proteínas à membrana celular, transdução de sinais, transporte de eletrons, cofatores enzimáticos e armazenamento de energia. Adicionalmente a manutenção da homeostase metabólica lipídica é essencial para o funcionamento normal do organismo, uma vez que um número crescente de estudos tem demonstrado que o desequilíbrio do metabolismo lipídico está ligado ao surgimento de doenças como obesidade, hipertensão, síndrome metabólica, diabetes, problemas cardiovasculares, dentre outras.

Devido a significância biológica dos lipídios, a lipidômica tornou-se uma ciência emergente no campo das ômicas. O lipidoma consiste em todas as moléculas lipídicas individuais que possuem estruturas complexas, múltiplas categorias e diversas propriedades físico-químicas reunidas por diferentes combinações de grupos de cabeça polares e cadeias acilo hidrofóbicas. Por sua vez, a lipidômica tem como objetivo a análise panorâmica do lipidoma existente em um sistema biológico e a detecção de mudanças a estímulos como estresse ambiental, doenças, administração de medicamentos e mutações.

Graças aos avanços feitos na lipidômica, tem sido possível a caracterização extensiva de classes e subclasses de lipidos conhecidos, a quantificação a nível de femtomole attomol de espécies lipidicas oriundas de diferentes amostras biológicas, descobertas biomédicas e biológicas o a través do estudo de vias metabólicas e interações em que lipídios fazem parte e descoberta de biomarcadores de predição, diagnostico e prognostico

A caracterização e quantificação de lipídeos em amostras biológicas pode ser feita por espectrometria de massas, uma ferramenta analítica utilizada para medir a razão massa-carga (m/z) de uma ou mais moléculas presentes em uma amostra em fase gasosa. Normalmente, a espectrometria de massas é usada ​​para identificar compostos desconhecidos através da determinação do peso molecular, para quantificar compostos conhecidos e para determinar a estrutura e as propriedades químicas das moléculas.

De um modo geral um espectrômetro de massa consiste de pelo menos três componentes:

Fonte de Ionização

Analisador de Massa

Sistema de detecção de íons

Na fonte de ionização, as moléculas são convertidas em íons em fase gasosa para que possam ser movidas e manipuladas por campos elétricos e magnéticos externos. A ionização por electrospray (ESI) pode ser acoplada diretamente a saída de uma coluna de cromatografia o que facilita a inserção da amostra no espectrômetro de massa.

Uma vez ionizados, os íons são classificados e separados de acordo com a razão massa-carga (m/z) no analisador de massa. Existem vários analisadores de massa disponíveis atualmente, cada um dos quais tem vantagens e desvantagens relacionadas à velocidade de operação, resolução de separação, dentre outras. O analisador de massa geralmente funciona em conjunto com o sistema de detecção de íons, que registra a intensidade de cada m/z detectada, gerando um espectro de massa.

Na lipidômica baseada em espectrometria de massas podem ser seguidas duas estrátegias: lipidômica não direcionada (untarget) e lipidômica direcionada (target).

1. Lipidômica não direcionada

A abordagem não direcionada tem como objetivo uma análise abrangente dos lipídeos de um sistema biológico usando um MS de alta resolução (HRMS), que permite a elucidação da composição estrutural lipídica devido à alta resolução e precisão dos equipamentos. Esta estrátegia é útil para a descoberta de novos lipídios e triagem de novos biomarcadores lipídicos relacionados a doenças.

Geralmente na lipidômica não direcionada a amostra pode ser injetada diretamente ao MS (DI-HRMS) ou por e cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LCMS). Na injeção direta, os lipídios extraídos da amostra biológica são diretamente introduzidos na fonte de íons do espectrômetro em uma concentração constante, seja através de um amostrador automático ou por uma seringa automatizada. Essa técnica evita o tempo consumido na etapa de separação e permite a aquisição de dados de alta qualidade em apenas alguns minutos, porém o efeito de supressão iônica causado pela injeção de extratos lipídicos complexos simultaneamente pode tornar indetectáveis lipídeos pouco abundantes ou com baixo nível de ionização.

Para contornar esta dificuldade, são frequentemente usados métodos de separação cromatográfica como a cromatogra líquida em fase normal (NPLC), cromatografia líquida de interação hidrofílica (HILIC) e cromatografia LC de fase reversa (RPLC). Sendo a RPLC a mais aplicável devido à sua alta eficiência de separação, alta reprodutibilidade e alta robustez. A ordem de eluição dos lipídios na RPLC está relacionada ao comprimento da cadeia de carbono e ao grau de insaturação.

Por outro lado na NPLC e HILIC utilizam fases estacionárias polares que são mais adequadas para a separação de classes lipídicas com diferentes grupos principais. No entanto, a NPLC requer solventes não aquosos como n-hexano e acetato de etila, nos quais é limitada a separação de compostos hidrofílicos, enquanto a HILIC utiliza como fase móvel solventes orgânicos altamente polares com pequena porção de água que permite uma separação eficiente de compostos polares que geralmente apresentam baixa retenção no sistema RPLC.

Além disso, é possível usar LC multidimensional (2D-LC) na qual são usadas propriedades ortogonais de separação o que favorece um aumento da capacidade de pico das colunas e aumenta a cobertura da análise. Por exemplo, a combinação de cromatografia ion-prata com fase reversa (Ag-LCxRPLC) é útil para separar triacilglicerois. Finalmente a integraçõ da espectrometria de mobilidade iônica (IM) à LC pode ser considerada uma terceira dimensão de separação. Esta técnica consiste na avaliação da mobilidade eletroroferica de íons em fase gasosa, o que permite a separação de espécies isômericas e isobáricas.

Uma vez no espectrômetro os dois principais modos de varredura MS/MS na lipidômica não consistem da aquisição dependente de dados (DDA) e independente de dados (DIA). No caso da DDA é uma técnica clássica de aquisição de dados em espectrometria para análise não direcionada, na qual são gerados fragmentos de íons apenas para íons precursores específicos com intensidade iônica predeterminada . Este modo de aquisição de dados embora permita a obtenção de espectros de MS2 de alta qualidade, oferece pouca cobertura para permitir anotação estrutural.

1. Llipidômica direcionada

Tem como objetivo a quantificação precisa de espécies lipídicas específicas geralmente envolvidas em uma ou várias vias do metabolismo de lipídeos. Os lipídios a serem medidos na lipidômica direcionada são frequentemente pré-selecionados na análise não direcionada e consistuem potenciais biomarcadores. Os modos e aquisição de monitoramento mais frequente usados na lipidômica direcionada são Multiple Reaction Monitoring (MRM) quando a análise é feita em um espectrômetro triplo quadrupolo (QQQ), ou Parallel Reaction Monitoring (PRM) quando é usado um equipamento com analisdor de alta resolução como o orbitrap . O princípio deste tipo de aquisição de dados consiste em monitorar íons precursores predefinidos (MS1) e os seus fragmentos (MS2). A quantificação pode ser relativa ente diferentes condições ou amostras biológicas ou ainda pode ser uma quantificação absoluta usando padrões dos lipídios em estudo cuja concentração é conhecida, o que permite fazer uma correlação entre a concentração da amostra e o a área do pico de interesse