**Resumo tema 4 - Identificação, caracterização e quantificação de ácidos nucleicos e seus derivados por espectrometria de massas**

Ácidos nucléicos são moléculas encarregadas de codificar, armazenar e transmitir informação em todas as formas de vida. Estruturalmente, os ácidos nucléicos são compostos por uma um molécula de açúcar fosfato (ribose fosfato) na qual se projetam as nucleobases de purina (guanina, citosina, adenina e timina para ácido desoxirribonucléico (DNA)) ou nucleobases de pirimidina (guanina, citosina, adenina e uracila para ácido ribonucleico (RNA)). A combinação de uma nucleobase e um açúcar gera nucleosídeos, entanto que a presença do grupo fosfato gera nucleotídeos.

Por sua vez, oligonucleotídeos são polímeros lineares de nucleosídeos ligados entre si por ligação fosfodiéster, que conecta a hidroxila 3' de um nucleosídeo ao hidroxila 5′-do próximo nucleosídeo.

O DNA é um oligonucleotídeo que contém informação genética para a síntese de proteínas, entanto que o RNA auxilia na conversão de informações genéticas e montagem de proteínas. Existem também vários tipos de RNAs não codificantes (ncRNA), incluindo ribossômal (rRNA), de transferência (tRNA), longo não codificante (lncRNA), pequenos nucleolares (snoRNAs), pequenos interferentes (siRNAs), pequenos nucleares (snRNA) e micro (miRNA). De uma forma geral os ncRNA não são traduzidos em proteínas, mas são responsáveis pela regulação da expressão gênica e podem sofrer mutações ou modificações tanto nas unidades de ribose quanto nas nucleobase que podem alterar sua função e interações com outras moléculas.

Assim, a caracterização de ncRNAs incluindo elucidação da sequência, presença de modificações e características estruturais, resulta crítica para decifrar os mecanismos moleculares que fundamentam as funções dos ncRNAs em células o que pode ser útil no desenvolvimento de medicamentos que tenham como alvo essas moléculas visando controlar a expressão de genes relacionados a doenças. Adicionalmente, nas últimas décadas oligonucleotideos sintéticos têm sido investigados como terapeuticos para inibir a expressão de molélculas de DNA ou RNA, embora a maioria a dos oligonucleotídeos sintéticos tem como objetivo mudar a expressão de proteínas, via alteração do RNA mensageiro (mRNA).

Atualmente, a síntese em fase sólida é o mecanismo mais usado na produção de oligonucleotídeos, com exceção dos RNAs, os quais são produzidos enzimaticamente. Essa síntese gera várias impurezas que devem ser monitoradas. Nesse contexto, várias técnicas analíticas como a espectrometria de massas de alta resolução (HRMS) são atualmente utilizadas para caracterizar, sequenciar e quantificar nucleotídeos bem como para monitorar impurezas remanescentes do processo de síntese.

A espectrometria de massas é 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.

Oligonucleotídeos são moléculas poli aniônicas e por tanto melhor detectados na polaridade negativa do espectrômetro, podendo seguir duas estratégias de análise: *top-down* e *bottom up*. De uma forma geral, abordagens *bottom-up* visam caracterizar ácidos nucleicos para o que são usadas enzimas como ribonucleases, que digerem os ácidos nucléicos em fragmentos de oligonucleotídeos menores que são posteriormente injetados ao espectrômetro. Embora seja uma abordagem mais simples, a digestão de ácidos nucleicos modificados é limitada devido à sua maior estabilidade. Além disso, as modificações podem ser perdidas durante a digestão causando uma perda crítica de informações que se correlacionam com uma função e/ou doença.

Por outro lado, na abordagem *top-down* é feita uma análise direta de ácidos nucléicos intactos (desnaturados ou nativos) por MS gerando uma caracterização mais abrangente e localização de modificações, bem como identificação de sítios de ligação. Porém algumas limitações incluem maior probabilidade de gerar íons isobáricos que não podem ser distinguidos por MS e presença de adutos de sal que podem causar supressão de íons dificultando a interpretação do espectro. Estas dificuldades podem ser contornadas mediante uso de diferentes técnicas de separação como a cromatografia de pareamento iônico (IP-RPLC), que combina cromatografia de fase reversa e agentes de par iônico para melhorar a separação de analitos ionizáveis. Neste método, um reagente de par iônico é adicionado à fase móvel, formando complexos com analitos carregados e permitindo sua retenção na fase estacionária hidrofóbica. A utilização de agentes de par iónico pode melhorar a resolução e a seletividade da separação, particularmente para compostos polares ou carregados que podem ser difíceis de separar utilizando apenas cromatografia convencional de fase reversa.

No entanto, o uso de reagentes de pareamento iônico não é compatível com a MS, causando redução da intensidade do sinal devido a supressão da ionização. Uma alternativa à IP-RPLC na caracterização e quantificação de ácidos nucléicos, é a cromatografia de interação hidrofílica (hydrophilic interaction chromatography”-HILIC) que consiste na separação de analitos polares ou ionizados. Quando acoplada à espectrometria de massas (HILIC −MS) esta técnica permite a caracterização de diferentes classes de biomoléculas como proteínas, glicopeptídeos, glicanos e sacarídeos. Devido à natureza polar dos resíduos de ribosil e a presença de grupos fosfato ionizáveis na estrutura dos ácidos nucléicos, a HILIC-MS também tem sido usada na análise de nucleosídeos e nucleotídeos provenientes de diferentes amostras.

Atualmente, existem diferentes tipos de resinas utilizadas na fase estacionária das colunas HILIC usadas com sucesso na separação de oligonucleotídeos., algumas das quais incluem resinas de troca iônica fraca (weak ion-exchange) e neutras contendo silica ou grupamentos diol, amida-e cyano, individualmente ou em combinação. Adicionalmente a HILIC tem sido acoplada à cromatografia de pareamento iônico IP-RPLC, uma abordagem bidimensional (2D)-LC que tem sido amplamente utilizada na caracterização de impurezas sintéticas em oligonucleotídeos terapeuticos. No entanto, as colunas BEH- amida são as mais amplamente utilizadas para caracterizar DNAs e RNAs de fita simples e siRNAs de fita dupla. O sucesso na separação consiste na interação efetiva dos grupos polar amida com a porção aquosa da fase móvel formando uma camada de água requerida para a separação por HILIC. Adicionalmente, os grupos carbomil dentro da fase amida podem participar de pontes de hidrogênio e interagir com os grupos hidroxil dos analitos.

Por outro lado a fase móvel usada na separação de oligonucleotídeos por HILIC, incluem acetato de amônia aquoso (solução A) e formiato de amônia (solução B) ambas misturadas com acetonitrila em diferentes proporciones. Por sua vez, para a injeção, os oligonucleotídeos são diluídos no solvente fraco (solução A).

Outra aplicação da análise Top-down é no sequenciamento de nucleotídeos mediante fragmentação (MS/MS), na qual íons precursores com múltiplas cargas na polaridade negativa são fragmentados, mediante diversas técnicas como fragmentação induzida por colisão (CID), fotodissociação por infravermelho (IRMPD), fotodissociação por UV (UVPD), dissociação por transferência de elétrons (ETD), entre outras. Os produtos iônicos gerados resultam da perda de uma nucleobase (Fragmentos B) e clivagem do esqueleto de fosfato ( fragmentos a - B, b, c, d, w, x, y, and z). Com esta técnica é possível a elucidação de sequências de DNA ou RNA de até 70 resíduos. De toda forma a fragmentação típica de oligonucleotídeos gera um grande número de fragmentos estruturalmente diversos que tornam difícil a interpretação manual da sequência. Este desafio é mitigado mediante o uso de programas que fazem uma análise automatizada dos dados.

Finalmente a quantificação de oligonucleotídeos é crucial para avaliar níveis de um determinado ácido nucléico que indica doença ou no caso de oligonucleotídeos sintéticos para determinar o grau de pureza do mesmo. Nesta abordagem o modo de aquisição do espectrômetro é mudado para operar na máxima sensibilidade a fim de monitorar um íon precursor específico e seus fragmentos (transição). Para esta finalidade é primeiro estabelecida a energia de colisão ótima para a aquisição e fragmentação de um oligonucleotídeo específico. Geralmente são usados como padrão oligonucleotídeos modificados quimicamente em concentração conhecida para a elaboração de uma curva de calibração,na qual são plotados área da curva de pelo menos três transições vs concentração. A partir da curva do padrão é possível inferir a concentração do oligonucleotídeo avaliado