Resumo Tema 8:Identificação e quantificação de biomarcadores de desórdenes metabólicas por espectrometria de massas;

O Instituto Nacional de Saúde (NIH) define os biomarcadores como características biológicas que são medidas e avaliadas objetivamente como indicadores de processos biológicos normais, processos patológicos ou respostas farmacológicas a uma intervenção terapêutica. Os biomarcadores são amplamente utilizados na prática clínica como ferramenta de diagnóstico para triagem de pacientes quanto à presença de doenças, também podem ser usados ​​para determinar a extensão da doença, fornecer uma medida da gravidade da doença e fornecer informações prognósticas relacionadas à sobrevivência.

Os biomarcadores mais comumente utilizados na medicina clínica são derivados da medição de metabólitos, proteínas ou DNA principalmente de amostras de sangue, uma vez que a análise do sangue é generalizada, de baixo custo e minimamente invasiva. Além disso, em situações em que os biomarcadores são necessários para acompanhar a resposta ao tratamento durante um curto período de tempo, a análise de amostras de sangue permite repetir a medição do biomarcador em vários momentos com facilidade. No entanto, outros fluídos como urina, saliva, lágrimas, bem como tecidos também tem funcionado como matrizes para a descoberta e monitoramento de biomarcadores.

Dependendo das informações que fornecem, os biomarcadores podem ser divididos em biomarcadores diagnósticos, prognósticos e preditivos. Um biomarcador diagnóstico é usado para detecção precoce da doença. Por exemplo, a diminuição da expressão do peptídeo beta amilóide (Aβ) de comprimento total e o aumento da proteína tau no LCR foram relatados como os únicos biomarcadores clinicamente validados para a doença de Alzheimer. Um biomarcador prognóstico é utilizado para prever a recorrência e a gravidade da doença, bem como a resposta do paciente ao tratamento com um determinado medicamento, e por último, ss biomarcadores preditivos são ferramentas úteis para classificar os pacientes em grupos responsivos e não responsivos, informação importante no desenvolvimento de medicamentos

Uma das técnicas mais amplamente utilizadas na descoberta e caracterização de biomarcadores é a espectrometria de massas, técnica 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.

A espectrometria de massas tem sido aplicada à detecção, monitoramento e quantificação de diversas biomoléculas, mas também de moléculas pequenas como metabólitos em organismos inteiros e até células individuais são mapeadas a nível molecular para monitorar mudanças metabólicas de um sistema em condições normais ou patológicas.

A proteômica e a metabolômica tem como objetivo estudar o proteoma e metaboloma de uma determinada amostra biológica. Como técnicas complementares à genômica e à transcriptômica, a proteômica e a metabolômica são mais sensíveis em resposta a fatores externos e podem refletir melhor o verdadeiro estado fisiológico de um sistema biológico.

O desenvolvimento de técnicas ômicas baseadas em espectrometria de massas têm permitido a análise confiável dos padrões de expressão de centenas de metabólitos e proteínas de amostras biológicas fornecendo assim informações úteis para triagem de biomarcadores e estudos patológicos e biológicos.

De um modo geral, o fluxo de trabalho seguido na descoberta de biomarcadores por espectrometria de massa consiste basicamente das seguintes etapas: obtenção e preparo da amostra, aquisição de dados no espectrômetro de massas, análise quantitativa, comparação com bancos de dados, análise estatística, análise bioinformática e validação do candidato a biomarcador

Na análise proteômica, proteínas são recuperadas da amostra biológica usando diversos métodos como precipitação, extração e colunas de exclusão molecular. No caso específico do plasma são usadas colunas de afinidade que retém proteínas altamente abundantes no plasma a fim de detectar proteínas em menor abundância no sangue. Posteriormente, as proteínas recuperadas são lisadas, reduzidas, alquiladas e digeridas com tripsina para obtenção de peptídeos que serão injetados ao espectrômetro de massas. Os espectros adquiridos para cada peptídeo são deconvoluídos e comparados ao proteoma de referência digerido teoricamente para finalmente identificar a proteína.

Por outro lado, na análise metabolômica metabólitos e lipídeos são recuperados do fluido biológico, por extração líquido-líquido usando solventes orgânicos como metanol e clorofórmio. Uma vez recuperados, os metabólitos são ressuspendidos e injetados no MS podendo ser feitas diferentes tipos de aquisições como DDA, DIA e PRM na faixa de até 2000 m/z . Uma vez gerados os dados, a identidade de metabolitos específicos é confirmada por comparação dos seus espectros de massa e tempos de retenção cromatográficos com os obtidos utilizando padrões de referência comercialmente disponíveis. Para isto, é criada uma biblioteca espectral completa, contendo dados de MS/MS obtidos nas polaridades positiva e negativa. Essas informações são então submetidas para pesquisa em banco de dados disponíveis on-line como o ChemSpider (www.chemspider.com), e MassBank (//www.massbank.jp/), MetFrag (//msbi. fonte de dados [ipb-halle.de/MetFrag/](http://ipb-halle.de/MetFrag/)). Além das análises bioinformáticas, tanto para os dados de proteômica, metabolômica e lipidômica são feitas análises estatísticas que permitem identificar expressão diferencial das moléculas em estudo (exemplo teste t e Anova) e análise de reconhecimento de padrões, análise de componentes principais (PCA), análise de agrupamento hierárquico e mapas de calor). Os resultados quantitativos são avaliados para distinguir metabólitos e proteínas com abundância diferencial a partir da qual é feita análise bioinformática para construção de das vias metabolicas e interações proteina-proteína afetadas positiva ou negativamente nas quais aparecem os potenciais biomarcadores. Alguns programas usados para esta finalidade incluem KEGG, Banco de Dados do Metaboloma Humano (http://www.hmdb.ca/), SMPD (http://www.smpdb.ca/), METLIN (http://metlin.scripps.edu/ ), String, Cytoscape e DAVID.

Finalmente após selecionados alguns candidatos a biomarcadores é feita uma validação usando amostras de grupos experimentias com maior número de indivíduos que sabidamente diagnosticados ou não com a doença em estudo. Esta etapa ajuda a confirmar a associação dos biomarcadores com a doença.

Na descoberta por novos biomarcadores tem , e atualmente estão registrados mais de 687867 biomarcadores.

Distúrbios relacionados ao metabolismo, como obesidade, diabetes mellitus tipo 2 (DM2), doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), acidente vascular cerebral e doenças cardiovasculares (DCV), atingiram proporções epidêmicas e, portanto, tornaram-se áreas-chave de pesquisa clínica e translacional ao longo de últimas décadas. No entanto, os biomarcadores comuns utilizados para a detecção precoce e diagnóstico diferencial destas doenças metabólicas têm sido desafiados devido a elevada taxa de variabilidade interindividual

Graças a proteômica foi possível descobrir que a proteína C reativa e a α2-macroglobulina são marcadores sensíveis do Diabetes Mellitus 2 (DM2). A enzima mannose-binding lectin-associated serine protease 1 (MASP) está positivamente correlacionado com DM2 e pré-diabetes mellitus, a adiponectina está negativamente correlacionada com o início do DM2. Catepsina D, leptinas, reninas, IL-1ra e t-PA são biomarcadores de resistência a insulina (RI). A fosfatase relacionada ao antígeno comum dos leucócitos, PTP-α e PTP-1B, é regulada positivamente no fígado, músculo esquelético e tecido adiposo de pessoas obesas.

Adicionalmente a metabolômica revelou que aminoácidoss de cadeia lateral ramificada (BCAAs), tirosina, fenilalanina, ácido 2-aminoadipico (2-AAA), ceramidas, Triacilglicerois, diacilglicerois fosfatidiletanolaminas,hexose, maltose, trealose, frutose, manose, ácido desoxicólico e LPS estão associados a inúmeras vias de doenças relacionadas a distúrbios do metabolismo glicolipídico.

Adicionalmente, Integração de metabolômica e lipidômica do plasma de pacientes, bem como proteômica do fígado, foram empregadas para caracterizar o perfil metabólico em pacientes com DHGNA. Nos pacientes com esteopatitits não alcoolica (NASH) foram detectados niveis de expressão proteica anormalmente elevada responsável pela captação de acidos graxos, formação de gotículas lipídicas e glicólise, bem como acúmulo de diacilglicreois e tracilglicerois, ácido pirúvico, BCAAs e BAs, que podem contribuir juntos para a patogênese da DHGNA.