



Avaliação de protocolos de extração dos metabólitos polares presentes em soro sanguíneo visando a otimização de análise por LC-MS/MS de possíveis marcadores biológicos para o transtorno bipolar

Mariana Marques, Alessandra Sussulini

Resumo: As ciências ômicas buscam compreender e estudar a dinâmica de um organismo, bem como o funcionamento de suas vias metabólicas, por meio da identificação e caracterização de várias “pistas” deixadas em decorrência de processos biológicos, tais como proteínas, lipídios e metabólitos presentes em fluidos, células e tecidos. De uma forma geral, dentre as ciências ômicas, a metabolômica, tem trazido diversos avanços para o entendimento da natureza e, principalmente, do desenvolvimento de processos fisiopatológicos no corpo humano, por explorar moléculas que se encontram no final do processo de expressão dos genes. Estes estudos têm uma grande relevância na caracterização de processos patológicos, como o transtorno bipolar (BD), possibilitando um melhor entendimento sobre as vias metabólicas envolvidas no processo de adoecimento e em como melhor diagnosticar e tratar estas doenças. Muito já foi produzido sobre a abordagem das ciências ômicas em transtornos neuropsiquiátricos, porém ainda não foram cunhados métodos de otimização de preparo das amostras de pacientes para posteriores análises metabolômicas que também possam ser melhor aproveitadas para outras ciências ômicas, que não gerem desperdício, bem como erros estatisticamente relevantes e associados a este preparo.

Assim, esta pesquisa pretende encontrar, por meio de revisões bibliográficas, testes e otimizações de protocolos e análises por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, um método ótimo de preparo de amostras de soro sanguíneo humano para futuras pesquisas neste campo.

Palavras-chave: Metabolômica; Microextração líquida; Soro; HILIC; Cromatografia Líquida; Espectrometria de Massas.

Discussão:

a) Materiais e Métodos:

Para este experimento foram utilizados três métodos de extração a fim de separar o soro sanguíneo em fase aquosa, proteica e lipídica para posterior análise da fase aquosa em LC-QToF. Os reagentes utilizados para cada uma das diferentes extrações estão explicitados na Tabela 1 e o procedimento geral seguido para as extrações se encontra na Imagem 1. Para todas as extrações foram utilizados 40uL de soro sanguíneo, valor previamente otimizado por testes anteriores. Todos os métodos de extração foram realizados em triplicata.

	MTBE (M) ¹	MTBE Simplex (MS) ²	Bligh & Dyer (B) ³
Metanol (uL)	300	225	240
Clorofórmio (uL)	-	-	400
MTBE (uL)	1000	750	-
Água Milli-Q (uL)	250	-	160
AcNH ₄ 0,1% (uL)	-	190	-

Tabela 1: Solventes e suas proporções utilizados para a extração líquido-líquido de soro sanguíneo.

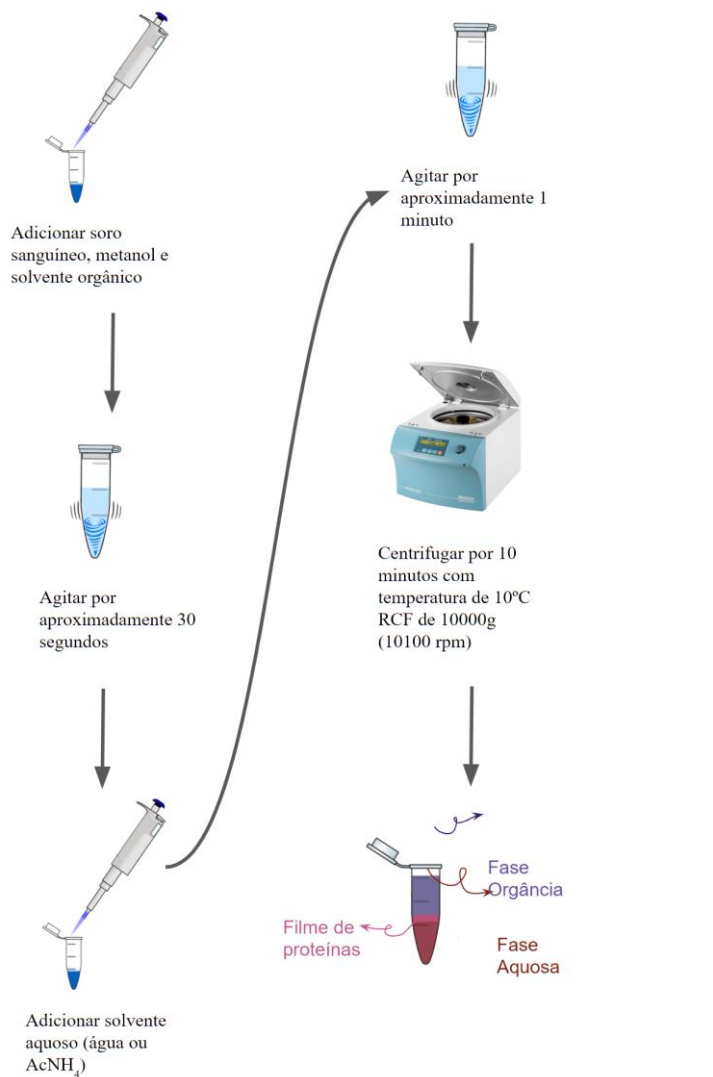


Imagem 1: Diagrama do procedimento de extração replicado para os três métodos.

Após a separação das três fases, como mostrado na Imagem 1, as fases orgânica e aquosa foram separadas em tubos do tipo eppendorf 0,6uL e secas no speed-vac a fim de serem estocadas e posteriormente analisadas por cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas. A fase proteica foi lavada e ressobilizada em uma solução de Tris-HCl 0,1M (pH=8,8) com auxílio de ultrassom até que as soluções estivessem límpidas e sem material particulado. Após a ressuspensão completa essa fração foi analisada utilizando o método Bradford a fim de quantificar o total de proteínas e solução e comparar os três métodos de preparo.

b) Resultados obtidos:

Para a análise das triplicatas de cada método, seguindo o método de Bradford⁴, foi realizada a construção de uma curva de calibração apresentada na Imagem 2.

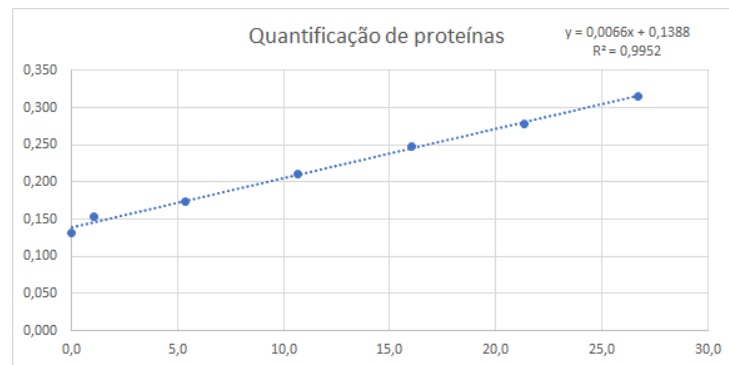


Imagem 3: Curva de calibração obtida utilizada para a quantificação de proteínas total das amostras

A principal finalidade de quantificar o total de proteínas extraídas em cada método é verificar qual deles pode gerar menos resíduos de outras frações nas análises posteriores das frações de metabólitos por LC-MS/MS. Devido a pequena quantidade de proteínas presentes nas outras frações e a falta de métodos rápidos e práticos como o Bradford para a análise de analitos totais de tais frações, a forma mais simples de verificar a efetividade dos métodos de extração utilizados é por meio da quantificação total de proteínas na fração proteica. Assim, por exclusão pode-se determinar qual dos métodos é o mais eficiente para a separação de frações de soro sanguíneo.

Amostras	Média (ug/ml)	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação (%)
B4.1	947.47	396.87	41.9
B4.2			
B4.3			
M4.1	1210.10	893.23	73.8
M4.2			
M4.3			
MS4.1	1250.51	434.70	34.8
MS4.2			
MS4.3			

Tabela 2: Média, desvio padrão e coeficiente de variação calculados para cada conjunto de métodos de extração realizados.

Conclusão: Devido às características do próprio método de análise e diferenças de preparação intrínsecos do analista, existe uma grande diferença entre as concentrações reais das amostras. Com isso, a melhor forma de analisar os resultados e comparar os métodos de extração é por meio do coeficiente de variação do conjunto de amostras, cujos valores estão apresentados juntamente com a média e o desvio padrão na Tabela 2.

Dessa forma, pode-se concluir que o método cuja extração de proteínas se mostrou mais eficiente foi

o MTBE Simplex, devido a seu menor coeficiente de variação e facilidade de diluição das proteínas após a extração e separação das frações de soro sanguíneo.

Perspectivas Futuras: Um dos principais desafios das pesquisas relacionadas às ciências ômicas é a análise integrada de todas as áreas (lipidômica, proteômica, metabolômica, genômica, metabonômica e transcriptômica), principalmente devido à complexidade e ao volume dos conjuntos de dados provenientes das análises individuais por cada um dos ramos dessas ciências.⁵ Avançar nesse sentido poderia trazer grandes inovações em diversos ramos da ciência nos quais a metabolômica pode ser aplicada como agricultura, análises clínicas e toxicologia.

No caso do setor médico e diagnóstico, mais especificamente para o Transtorno Afetivo Bipolar, a análise integrada de ciências ômicas vem permitindo a identificação de alguns possíveis marcadores biológicos para esta condição psiquiátrica. Alguns deles permitem diferenciar pacientes com Transtorno Afetivo Bipolar (TAB) e Controles, como hidroxibutirato, colina, isobutirato e N-metilnicotiamida. É possível, ainda, diferenciar pacientes portadores de TAB e portadores de transtornos cognitivos moderados por meio de alguns metabólitos como propionato, formiato, ácido (R*, S*) 2,3-dihidroxi-butanoico, fenilamina, 2,4-dihidroxipirimidina e β -alanina.⁶

Nesse estudo foi possível avaliar qual das três principais técnicas utilizadas atualmente na extração de metabólitos de soro sanguíneo permite o maior índice de recuperação de proteínas da amostra. Porém, a precipitação correta de proteínas não é o único fator que determina a qualidade de extração da amostra. Alguns outros fatores que também devem ser avaliados são a reprodutibilidade e a repetibilidade da técnica, sua adequação à plataforma analítica, além da quantidade de etapas de extração e o custo dos solventes. Além disso os parâmetros de análise da plataforma analítica também devem ser otimizados para a avaliação adequada do perfil metabólico da amostra.

Referências Bibliográficas:

1. Lee, D. Y., Kind, T., Yoon, Y.-R., Fiehn, O., & Liu, K.-H. (2014). Comparative evaluation of extraction methods for simultaneous mass-spectrometric analysis of complex lipids and primary metabolites from human blood plasma. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406(28), 7275–7286. doi: 10.1007/s00216-014-8124-x
2. Coman, C., Solari, F. A., Hentschel, A., Sickmann, A., Zahedi, R. P., & Ahrends, R. (2016). Simultaneous Metabolite, Protein, Lipid Extraction (SIMPLEX): A Combinatorial Multimolecular Omics Approach for Systems Biology. *Molecular & Cellular Proteomics*, 15(4), 1453–1466. doi: 10.1074/mcp.m115.053702
3. Sündermann, A., Eggers, L. F., & Schwudke, D. (2016). Liquid Extraction: Bligh and Dyer. *Encyclopedia of Lipidomics*, 1–4. doi: 10.1007/978-94-007-7864-1_88-1
4. Hammond, J. B. W., & Kruger, N. J. (1988). The Bradford Method for Protein Quantitation. *New Protein Techniques*, 3, 25–32. doi: 10.1385/0-89603-126-8:25
5. Beale, D. J., Karpe, A. V., & Ahmed, W. (2016). Beyond Metabolomics: A Review of Multi-Omics-Based Approaches. *Microbial Metabolomics*, 289–312. doi: 10.1007/978-3-319-46326-1_10
6. López-López, Á., López-González, Á., Barker-Tejeda, T. C., & Barbas, C. (2018). A review of validated biomarkers obtained through metabolomics. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 18(6), 557–575. doi: 10.1080/14737159.2018.1481