

Metabolômica alvo para estudo de diabetes mellitus tipo 2: Determinação de ácido biliar tauroursodeoxicólico em células hepáticas e soluções fisiológicas por GC-MS

Palavras-Chave: Metabolômica, Diabetes mellitus tipo 2, Ácido Tauroursodeoxicólico

Autores:

Alessandra de Sousa Mesquita*; Alan Gonçalves Amaral; Hans Zamora Obando; Bruna Eduarda Santos Simões; Laiza Bruzadelle Loureiro; Uenifer Rodrigues Couto; Mariana Roberta Rodrigues Muniz; Prof. Dr. Everardo Magalhães Carneiro; Prof^a. Dr^a. Ana Valéria Colnaghi Simionato* - UNICAMP

INTRODUÇÃO:

A Diabetes é um grupo de doenças causadas por uma desordem metabólica caracterizada por hiperglicemia, que pode ser resultante de múltiplas etiologias, como defeitos na secreção de insulina, ação da insulina ou ambos, resultando na resistência insulínica.^{1,2} Existe uma associação da obesidade ao diabetes mellitus tipo 2 (DM2) devido seu estabelecimento gerar resistência à ação da insulina. Os adipócitos apresentam receptores para insulina, que regulam o funcionamento da célula, como a diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos e, em adipócitos maduros, estimulando o transporte de glicose e a síntese de triglicerídeos (lipogênese), além de inibir a lipólise.³ Na DM2 ocorre um grau de hiperglicemia suficiente para causar alterações patológicas e funcionais em vários tecidos-alvo, no entanto, a doença pode estar presente por um longo período de tempo sem apresentar sintomas clínicos.²

A DM pode ser diagnosticada com base nos testes de hemoglobina glicada (Hb A1c), critérios de glicose plasmática, glicose plasmática em jejum, ou no valor de glicose plasmática de 2 h (2 h PG) após um teste de tolerância oral à glicose de 75 g. Estes testes podem ser usados para diagnóstico e rastreamento, sendo possível identificar indivíduos pré-diabéticos, pacientes assintomáticos, pacientes sintomáticos e indivíduos de alto risco.⁴

Os ácidos biliares (BA) são secretados como moléculas conjugadas com glicina ou taurina, formando os sais biliares, como por exemplo o ácido tauroursodeoxicólico (TUDCA), que é formado pela conjugação do ácido biliar ursodeoxicólico (UDCA) com a taurina. A epimerização de grupos hidroxila de CDCA pelas desidrogenases hidroxisteróides de bactérias intestinais leva à formação de UDCA.⁵

Os BAs UDCA e TUDCA são classificados como chaperonas químicas, pois ajudam a estabilizar as proteínas em suas conformações, apresentam efeito citoprotetor por reduzir a formação de espécies reativas de oxigênio, prevenir a disfunção mitocondrial e inibir a apoptose. Eles podem ativar receptores nucleares específicos e receptores acoplados à proteína G, influenciando a expressão de genes que codificam proteínas envolvidas na regulação da glicose, ácidos graxos, síntese de lipoproteínas, metabolismo energético e regulação de sua própria síntese.⁶

O estresse do retículo endoplasmático (ERS) é um dos gatilhos moleculares da disfunção adipocitária em indivíduos obesos resistentes à insulina e na baixa inflamação crônica que acompanha a obesidade. Um estudo de análise de estrutura-função revelou que o UDCA, é responsável pela inibição da indução de GRP78 e que o UDCA é 10 vezes mais eficaz do que seu conjugado de taurina,

o TUDCA. Este efeito inibidor foi confirmado em um ensaio sem células, onde TUDCA e UDCA, com exceção da taurina, inibiram efetivamente a agregação de BSA (albumina de soro bovino) desnaturada termicamente.⁷ Sendo assim, o ERS pode ser aliviado pelo uso das chaperonas químicas UDCA e TUDCA, podendo potencialmente diminuir os efeitos metabólicos adversos da obesidade, através da regulação das funções dos adipócitos por meio da ativação dos receptores FXR e TGR5.⁸

A hiperinsulinemia causada pela obesidade potencializa a resistência à insulina, podendo desencadear a DM2. A depuração da insulina ocorre principalmente no fígado pela ação da enzima degradadora de insulina (IDE), que degrada aproximadamente 50% da insulina em sua primeira passagem pelo sistema portal hepático. Assim o mal funcionamento da enzima está relacionado com a DM2. O TUDCA melhora a depuração de insulina através do aumento da expressão de IDE recuperando a sensibilidade à insulina.⁹

O potencial do TUDCA no tratamento do DM2, bem como regulador da homeostase glicêmica e da secreção de insulina, motivou o estudo deste BA como um possível marcador biológico para o DM2. Ainda, a escolha de células hepáticas da linhagem HepG2 como matriz de análise combinada ao estudo metabolômico do TUDCA permite a investigação da enzima de degradação de insulina, cuja expressão pode ser modulada por este BA.

METODOLOGIA:

Preparo das soluções padrão de TUDCA e Derivatização: Foram preparadas soluções do padrão TUDCA em metanol (grau HPLC), na concentração de 1,0 g/L. Foram secados 50 µL de amostra utilizando um *speed vacuum* a temperatura ambiente. Posteriormente, 20,0 µL de metoxiamina em piridina foram adicionados nas concentrações 20,0 g/L, e em seguida, 40,0 µL de BSTFA + 1% TCMS (N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida com trimetilclorosilano), cada uma individualmente por 3 h a 70 °C. Ao final, foram adicionados 100 µL de heptano em cada vial para injeção no GC-MS.

Análise por GC-MS: As análises por GC-MS foram feitas no equipamento Agilent 7595 com um analisador de massas quadrupolo instalado no Laboratório Institucional de Espectrometria de Massas. Será usada uma coluna HP-5MS (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm), com fase estacionária de baixa polaridade composta por 5% fenil e 95% dimetilpolisiloxano (Agilent Technologies). A temperatura do injetor foi de 280°C, a temperatura de fonte foi de 200°C e a temperatura de interface 250°C. O gás de arraste utilizado na separação foi o Hélio. A temperatura de forno para a coluna foi inicial de 120°C por 1 min, seguindo aquecimento 15°C/min até 250°C, seguido de aquecimento a 5°C/min até atingir 300°C, mantendo por 4 min.¹⁰ Os íons foram monitorados no modo scan (50 a 900 Da) a uma taxa de 30 espectros/s.

Análise por RMN: foram analisados 10 mg do padrão de TUDCA derivatizado para GC-MS e seco em fluxo de N₂, e 7 mg do mesmo padrão sem a etapa de derivatização. Ambos foram solubilizados em 750 µL de DMSO-d₆. As análises foram realizadas em um Espectrômetro de RMN de 400 MHz Bruker Avance, operando a 400,13 MHz para hidrogênio a 25 °C. As taxas de relaxamento de spin foram medidas usando a sequência (180 ° –s – 90 ° –t). Os valores de s usados para os experimentos seletivos e não seletivos foram 0,01, 0,2, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 1, 1,2, 1,5, 2, 3 e 5,0 s. O tempo de atraso t, neste caso, foi de 5 s.¹¹

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

GC-MS

Os ácidos biliares são ácidos esteroidais produzidos durante o metabolismo hepático do colesterol, apresentando um grupamento carboxila na cadeia lateral. Para a separação e análise do TUDCA por GC-MS se faz necessário tornar o composto volátil e com estabilidade térmica, através da reação de

derivatização.¹⁰ A Figura 1 mostra o composto inicial TUDCA e o composto esperado após a reação de derivatização.

Com a análise das amostras derivatizadas de TUDCA por GC-MS, não foi possível detectar picos do TUDCA no cromatograma, conforme mostra a Figura 2. Foram detectados apenas os compostos: *4-Methyl-2,4-bis(4'-trimethylsilyloxyphenyl)pentene-1* (t_r 8,5914 min) e *2-Hydrazinoethanol* (t_r 6,7013 min).

A derivatização de ácidos biliares, incluindo o TUDCA, já foi reportada na literatura científica, no entanto, o TUDCA não foi encontrado, mostrando que a derivatização foi ineficiente.¹²⁻¹⁶ Sendo assim, após descartar possíveis erros experimentais, de equipamento e de reagentes, foram realizadas análises por RMN para verificar se a reação de derivatização estava de fato ocorrendo na molécula de TUDCA.

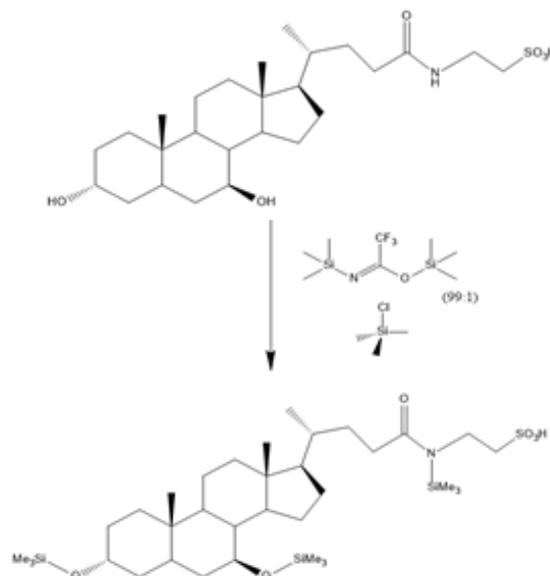


Figura 1 – Representação da reação de Sililação dos reagentes BSTFA + 1% TCMS com a molécula de TUDCA. Ao final é exibido o produto derivatizado esperado ao final da reação.

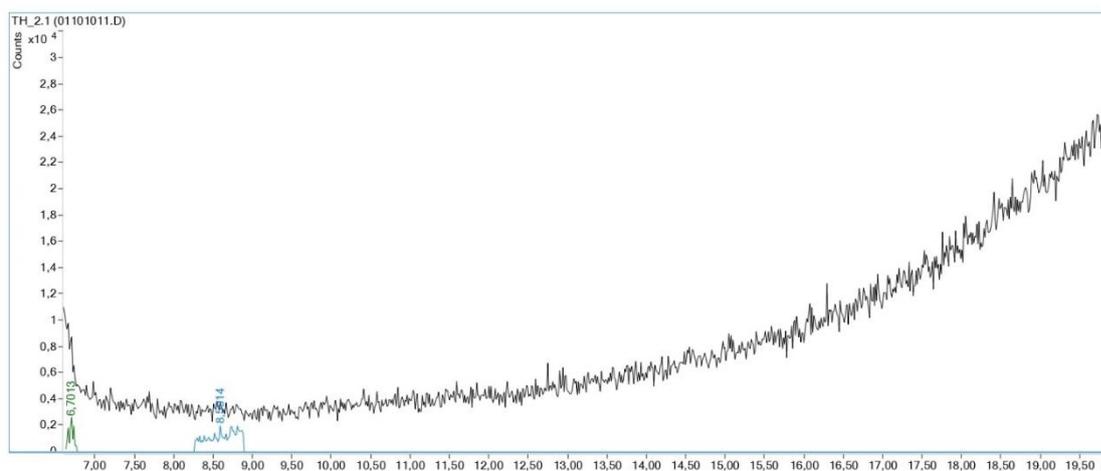


Figura 2 – Cromatograma obtido por GC-MS com a análise da amostra de TUDCA derivatizada.

RMN

Para verificar se a reação de sililação foi efetiva, foram comparados espectros de RMN de ^1H em DMSO-d_6 do padrão de TUDCA antes e depois da reação de derivatização. Contudo, apesar da presença de sinais referentes aos grupos trimetilsilil aparecerem na região esperada (0.0-1.0 ppm), não foi possível concluir que esses grupos estão quimicamente ligados ao TUDCA. Assim, foram obtidos os coeficientes de difusão através da sequência de pulsos *oneshot*.¹⁷

O coeficiente de difusão é uma medida da mobilidade molecular no meio e é inversamente proporcional ao tamanho da molécula. Tornando possível, através do experimento *oneshot*, diferenciar moléculas através de seus raios hidrodinâmicos. O mapa de contorno de difusão (DOSY, Figura 3) obtido, permitiu identificar que os sinais do grupo trimetilsilil não estão ligados ao TUDCA, pois enquanto o TUDCA apresenta coeficiente de difusão $4.9 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$, os grupos trimetilsilil apresentam coeficiente de difusão $1.9 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$. Os sinais que não foram destacados referem-se a hidrogênios de troca química (ex. $-\text{OH}$, sinais em aprox. 8-9 ppm) ou que apresentam sobreposição.

Em ambos os casos, o coeficiente de difusão obtido não é confiável, pois é um valor intermediário entre as espécies envolvidas na troca ou na sobreposição. Dessa forma, conclui-se que a reação de silição não ocorreu e que a metodologia adotada não é eficaz para a derivatização do TUDCA para posterior análise por cromatografia gasosa (CG).

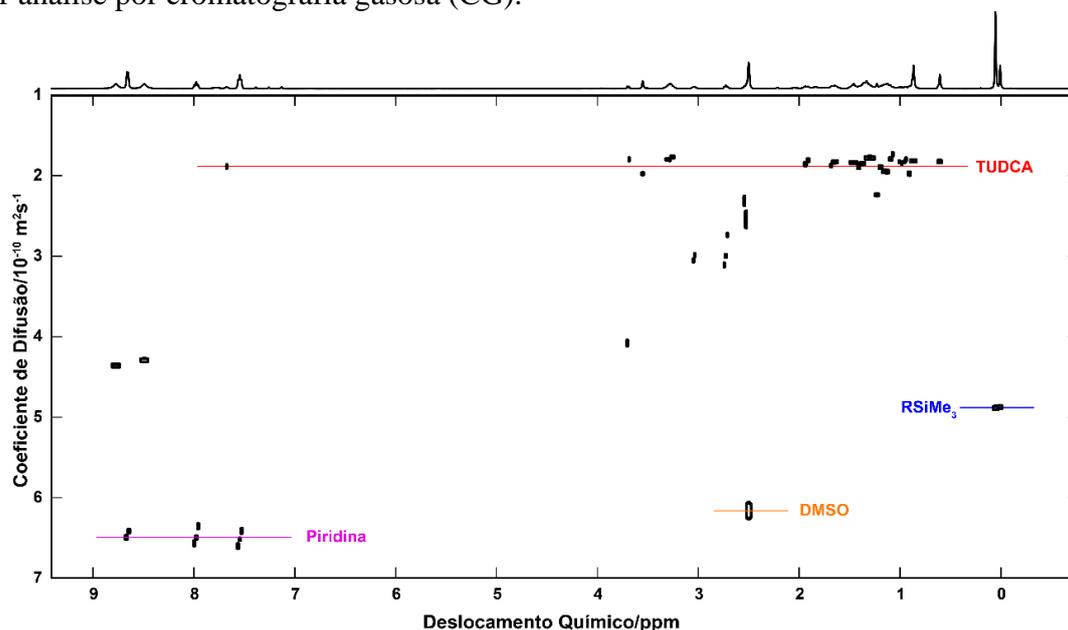


Figura 3 – Mapa de contorno de difusão de ^1H (DOSY) em DMSO-d_6 para o bruto da reação de derivatização do TUDCA, medido através da sequência de pulsos oneshot no espectrômetro operando a 400 MHz para o ^1H .

CONCLUSÕES:

O projeto original possuía como objetivo desenvolver, validar e aplicar uma metodologia para quantificação do TUDCA empregando a técnica de GC-MS, podendo assim avaliar as alterações na produção do TUDCA pelas células hepáticas e caracterizar o ácido como um potencial biomarcador para diabetes mellitus. No entanto, na etapa de validação do método foi observado que a molécula de interesse não era detectada por GC-MS. A análise por RMN confirmou a hipótese levantada de que o TUDCA não estava sendo derivatizado. Sendo assim, para análises futuras é preciso considerar técnicas que não necessitem deste tipo de reação ou avaliar diferentes estratégias de derivatização.

BIBLIOGRAFIA

- ¹ Sociedade Brasileira de Diabetes. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2019-2020. Clannad Editora Científica. 2019.
- ² American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care. 2012.
- ³ Kahn, B.B.; Flier, J. S. Obesity and insulin resistance. J Clin Invest, 106, 4, 473-81, 2000.
- ⁴ American Diabetes Association. Classification and diagnosis of diabetes. Diabetes Care. 2015.
- ⁵ Daruich, A.; Picard, E.; Boatright, J. H.; Behar-Cohen, F. Review: The bile acids urso- and tauroursodeoxycholic as neuroprotective therapies in retinal disease. Mol Vis, 25, 610-624, 2019.
- ⁶ Cortez, L.; Sim, V. The therapeutic potential of chemical chaperones in protein folding diseases. Prion, 8, 2, 197-202, 2014.
- ⁷ Berger, E.; Haller, D. Structure-function analysis of the tertiary bile acid TUDCA for the resolution of endoplasmic reticulum stress in intestinal epithelial cells. Biochem Biophys Res Commun. 409, 4, 610-5, 2011.

⁸ Malisová, L.; Kovacová, Z.; Koc, M.; Kracmerová, J.; Stich, V.; Rossmeislová, L. Ursodeoxycholic acid but not tauroursodeoxycholic acid inhibits proliferation and differentiation of human subcutaneous adipocytes. *PLoS One*, 3, 8, 12, 2013.

⁹ Vettorazzi, J. F.; Kurauti, M. A.; Soares, G. M.; Borck, P. C.; Ferreira, S. M.; Branco, R. C. S.; Michelone, L. S. L.; Boschero, A. C.; Costa Junior, J. M.; Carneiro, E. M. Bile acid TUDCA improves insulin clearance by increasing the expression of insulin-degrading enzyme in the liver of obese mice. *Scientific Reports*, 7, 1, 14876, 2017.

¹⁰ Paiva, M. J. N. Desenvolvimento de Métodos de Extração e Derivatização para Análises Cromatográficas dos Ácidos Biliares e Aminoácidos em Estudos Metabolômicos. Tese apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para a obtenção do grau de Doutor em Ciências – Química. Belo Horizonte, 2013.

¹¹ Wu, D.; Zhai, Y.; Yan, J.; Xu, K.; Wang, Q.; Li, Y.; Li, H. Binding mechanism of tauroursodeoxycholic acid to human serum albumin: insights from NMR relaxation and docking simulations. *The Royal Society of Chemistry*, 5, 11036–11042, 2015.

¹² Kakiyama, G.; Muto, A.; Takei, H.; Nittono, H.; Murai, T.; Kurosawa, T.; Hofmann, A. F.; Pandak, W. M.; Bajaj, J. S. A simple and accurate HPLC method for fecal bile acid profile in healthy and cirrhotic subjects: validation by GC-MS and LC-MS. *J Lipid Res.* 55, 5, 978-90, 2014.

¹³ Miyagawa, H.; Bamba, T. Comparison of sequential derivatization with concurrent methods for GC/MS-based metabolomics. *J Biosci Bioeng.* 127, 2, 160-168, 2019.

¹⁴ Rodrigues, C. M.; Kren, B. T.; Steer, C. J.; Setchell, K. D. Tauroursodeoxycholate increases rat liver ursodeoxycholate levels and limits lithocholate formation better than ursodeoxycholate. *Gastroenterology.* 109, 2, 564-72, 1995.

¹⁵ Setchell, K. D.; Rodrigues, C. M.; Clerici, C.; Solinas, A.; Morelli, A.; Gartung C.; Boyer, J. Bile acid concentrations in human and rat liver tissue and in hepatocyte nuclei. *Gastroenterology.* 112, 1, 226-35, 1997.

¹⁶ Invernizzi, P.; Setchell, K. D.; Crosignani, A.; Battezzati, P. M.; Larghi, A.; O'Connell, N. C.; Podda, M. Differences in the metabolism and disposition of ursodeoxycholic acid and of its taurine-conjugated species in patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatology.* 29, 2, 320-7, 1999.

¹⁷ Pelta, M. D.; Morris, G. A.; Stchedroff, M. J.; Hammond, S. J. A one-shot sequence for high-resolution diffusion-ordered spectroscopy. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 40, S147-S152, 2002.