

# LIPIDÓMICA NA SAÚDE - À PROCURA DE BIOMARCADORES

BÁRBARA M. MACEDO\*

Nas últimas décadas, a procura de biomarcadores de suporte à medicina translacional conduziu ao avanço científico das chamadas "ómicas". O estudo do perfil metabólico de um organismo, a metabolómica, surge como a inovação mais recente depois da genómica, da transcriptómica e da proteómica. A lipidómica, a análise quantitativa e qualitativa dos lípidos no organismo, tem despertado o interesse da comunidade científica devido à sua íntima ligação com inúmeras patologias humanas (tais como diabetes, obesidade, aterosclerose, doença de Alzheimer), a distúrbios lipídicos, levando a que se questione cada vez mais o papel destes metabolitos na homeostase celular. A Unidade de Metabolómica do Instituto de Biologia Molecular e Celular do Porto especializou-se nos últimos anos na identificação e quantificação de esfingolípido, tendo sido desenvolvidos esforços para se tornar um centro de referência para o diagnóstico da doença de Fabry. A variedade estrutural e funcional dos metabolitos lipídicos, sejam esfingolípido, glicolípido, ou outros, tornam bastante complexa a sua abordagem analítica. O trabalho aqui apresentado aborda a análise de uma mistura de lípidos, desde a purificação e fracionamento prévio da matriz até à deteção por espectrometria de massa, assim como um resumo da aplicação de um espectrómetro de massas triplo quadrupolo na esfingolipidómica.

Nas últimas décadas, a procura de biomarcadores de suporte à medicina translacional conduziu ao avanço científico das chamadas "ómicas" [1]. O estudo do perfil metabólico de um organismo, a metabolómica, surge como a inovação mais recente depois da genómica, da transcriptómica e da proteómica. As mais-valias deste novo campo de estudo refletem-se a vários níveis. Por um lado, sabendo que o fenótipo de um determinado organismo depende dos metabolitos secundários expressos por este, podemos observar num determinado contexto biológico os resultados analíticos de interações celulares, tanto no tempo, como no espaço. Além disso, o facto de esta análise poder ser trabalhada quantitativamente, facilita o enquadramento das alterações, por vezes subtis, dos níveis basais para níveis patológicos, ou permite visualizar uma resposta adaptativa a uma agressão externa ou a uma intervenção terapêutica.

De entre as várias componentes da metabolómica, pode destacar-se a lipidómica, que mais recentemente tem despertado o interesse da comunidade científica. Tal interesse fica a dever-se à íntima ligação de inúmeras

patologias humanas (tais como diabetes, obesidade, aterosclerose, doença de Alzheimer), a distúrbios lipídicos, levando a que se questione cada vez mais o papel destes metabolitos na homeostase celular.

Por sua vez, a lipidómica está subdividida em diferentes áreas de estudo, dentro das quais a esfingolipidómica. A ceramida e as esfingosina-1-fosfato (S1P) são esfingolípido bioativos essenciais em inúmeras cascatas de sinalização molecular [2]. A ceramida tem um papel fundamental nos processos de apoptose celular, reagindo a estímulos extracelulares, tal como stress oxidativo, radiação, oxidações lipoproteicas, etc. [3]. A ceramida induz a apoptose regulando proteínas alvo às quais se liga, atuando como um segundo mensageiro típico. Por outro lado, a ligação da ceramida à bicamada lipídica das membranas celulares origina a formação dos chamados "lipid rafts" ou micro-domínios de sinalização, contribuindo também desta forma para a regulação apoptótica.

Finalmente, a ceramida pode também atuar diretamente a nível mitocondrial, formando canais de transporte para o citocromo C, cuja libertação irá ativar as cascatas apoptótica mediada pelas caspases [3]. Por seu lado, também a S1P pode atuar como mensageiro

primário ou secundário. Como mensageiro primário, a S1P regula processos como a angiogénese, o desenvolvimento embrionário, a migração celular, etc. Como mensageiro secundário, a sua atuação ocorre a nível da homeostase do cálcio, do crescimento celular e da supressão da apoptose. A S1P parece ter um papel oposto ao da ceramida em muitos dos processos em que estes dois compostos estão simultaneamente envolvidos. Tal observação é especialmente válida para os processos relacionados com sobrevivência e crescimento celular, em que a ceramida está envolvida na inibição do crescimento e em efeitos pró-apoptóticos, enquanto a S1P promove o crescimento celular, logo contrariando o efeito apoptótico da ceramida [3]. Resumindo, o resultado entre a sobrevivência e a morte celular está dependente de um equilíbrio constante entre estas duas moléculas e para que tal possa ser analisado num dado contexto biológico, temos de ter ao nosso dispor ferramentas técnicas de grande rigor e sensibilidade para a quantificação dos seus níveis celulares.

A variedade estrutural e funcional dos metabolitos lipídicos, sejam esfingolípido, glicolípido, ou outros, tornam bastante complexa a sua abordagem analítica. Como exemplo, encontra-

\* Unidade de Metabolómica do Instituto de Biologia Molecular e Celular do Porto  
Rua do Campo Alegre, 823, 4150-180 Porto  
E-mail: barbamacedo@gmail.com

mos desde lípidos apolares (ex. ésteres de esteróis) a lípidos polares (ex. fosfolípidos), passando pelos lípidos neutros (ex. triacilglicerídeos) numa mesma matriz.

A estratégia mais comum para a análise de uma mistura de lípidos passa pela purificação e fracionamento prévio da matriz antes da detecção propriamente dita [4]. Às técnicas preparativas como a cromatografia em camada fina (TLC) e/ou a extração em fase sólida (SPE) segue-se a separação e detecção de diferentes classes lipídicas como lípidos neutros, ácidos gordos, fosfolípidos, entre outros, por cromatografia analítica associada a detetores (por exemplo cromatografia líquida de alta resolução (HPLC)). No entanto, a pouca sensibilidade de métodos de detecção mais comuns, como a espectrofotometria na zona do ultravioleta (UV), o grande volume de amostra requerido e os múltiplos passos de purificação necessários, tornaram imperativo o desenvolvimento de metodologias mais eficazes.

Finalmente, o acoplamento da detecção por espectrometria de massa às técnicas de separação cromatográfica correspondeu a significativo “salto” qualitativo no conhecimento estrutural, na identificação e na quantificação dos analitos lipídicos. Com esta metodologia, foi possível fazer a identificação de um maior número de subespécies de lípidos, através da manipulação na mesma amostra de moléculas com diferentes propriedades físico-químicas (polares ou apolares, neutras ou com carga) permitindo assim a detecção e quantificação de diferentes espécies de lípidos em concentrações distintas.

Em relação aos esfingolipídios, a aplicação da espectrometria de massa por *electrospray* com equipamentos de utilização mais acessível ao analista biomédico tornou-se uma ferramenta universal para a monitorização simultânea de vários compostos lipídicos, entre os quais se destacam os esfingóides base, ceramidas, S1P, e a esfingomielina, entre outros [4]. De acordo com este pressuposto, passou a ser prática corrente a utilização das metodologias acima descritas na Unidade de Metabolómica do IBMC, um instituto dedicado às

ciências biológicas e sem tradição na área da química. O trabalho desenvolvido recorreu a um espectrómetro de massas Quattro Premier XE triplo quadrupolo (Waters Corporation, Milford, MA), equipado com uma sonda de ionização por *electrospray* (ESI) híbrido com um sistema de separação Acquity UltraPerformance LC (UPLC). Os equipamentos de espectrometria de massa são, de uma forma geral, constituídos por quatro módulos: a fonte de ionização, o analisador, o detetor e a estação de controlo de tratamento e aquisição de dados. Particularizando a fonte de ionização, a metodologia em causa assenta principalmente na ESI ou ionização por “*electrospray*”; ocorre à pressão atmosférica e consegue-se através de um *spray* da amostra que sofre uma descarga elétrica, formando um feixe de gotas eletricamente carregadas que se vão tornando cada vez mais pequenas devido às forças de repulsão electroestáticas, até que se vaporizam. Apenas os analitos com carga oposta à do analisador serão atraídos para este. Quanto ao analisador, a utilização do quadrupolo nas dissociações por colisão induzida (CID) de baixa energia mostrou-se eficiente e reprodutível na conversão do ião precursor para o produto. Este analisador de massa funciona como um filtro de massa, combinando corrente contínua com potenciais aplicados a uma dada frequência, de tal forma que se selecionam os iões ou os valores massa/carga que entram no analisador e atingem a saída, encaminhando-se posteriormente para o detetor, que os regista e sinaliza no espectro de massa. O analisador do tipo quadrupolo é o mais robusto dos analisadores, com vantagens na identificação e quantificação de compostos em matrizes complexas do tipo plasma, urina, sangue total, tecidos biológicos, etc. Permite, além disso, alguma elucidação estrutural quando utilizado em série, como no caso do triplo quadrupolo, em que se efetua uma leitura em MS/MS no espaço, com ou sem fragmentação na fonte de ionização. Quando utilizado em série, como no caso do triplo quadrupolo, efetua-se uma leitura em MS/MS no espaço sem fragmentação no primeiro quadrupolo e com fragmentação no segundo, em que a molécula é “quebrada” em gru-

pos químicos específicos, permitindo alguma elucidação estrutural.

Os trabalhos realizados na Unidade de Metabolómica ao longo destes últimos anos permitiram a exploração das matrizes mais distintas, desde linhas celulares a tecidos humanos e de roedores passando por fluidos biológicos, como plasma e urina. Estas amostras foram fortificadas com padrão interno, extraídas com um sistema de solventes neutros em fase orgânica e analisadas por LC-MS/MS. A análise qualitativa dos esfingolipídios utiliza como método a seleção do ião precursor de um determinado fragmento, que seja comum a uma classe de esfingolipídios (Parent Scan) [5].

No trabalho realizado por Dória L. e colaboradores em linhas celulares de cancro da mama, o perfil fosfolipídico destas matrizes é explorado com base nas diferenças entre as subclasses de cada espécie [6]. Como exemplo, a comparação das subespécies pertencentes à classe da esfingomielina por seleção ião precursor  $m/z$  184 comum a todas (Figura 1).

Por seu lado, a análise quantitativa é baseada na extrapolação de curvas de calibração. Estas são construídas a partir de quantificações realizadas a uma matriz isenta do analito em questão, à qual foram adicionadas concentrações crescentes de padrão externo. O padrão interno manter-se-á numa concentração fixa, equivalente à adicionada às amostras a analisar [5]. Estas curvas são obtidas com um modelo de regressão linear que têm por base a razão das áreas dos picos cromatográficos *versus* a concentração do padrão que mimetiza o analito (padrão externo). Diferentes subespécies de analitos em causa terão diferentes declives de reta, sendo estas otimizadas para o máximo de subespécies possíveis. Este procedimento analítico revela-se bastante robusto e fiável para a determinação de quantidades basais de esfingolipídios endógenos em variadas matrizes, podendo atingir os limites de detecção ao nível de picomole ou mesmo inferiores. Para além dos esfingolipídios, a Unidade de Metabolómica tem desenvolvido esforços para se tornar um centro de referência para o diagnóstico da doença de Fabry. A acumulação

do lípido globotriaosilceramida (GB3) nos lisossomas do endotélio vascular, devido à deficiência da enzima alfa-galactosidase A, torna este lípido um biomarcador periférico de excelência [7]. No caso de fluidos biológicos, como a urina, foram otimizados procedimentos que permitem num curto período de tempo de análise a determinação simultânea das várias subespécies de GB3 e de esfingomielina, sendo esta última usada para normalização da amostragem, uma vez que não varia em caso de doença. Do ponto de vista académico, têm sido desenvolvidos vários projetos envolvendo esta doença metabólica rara, nomeadamente a caracterização do modelo animal quanto ao seu perfil lipídico, a quantificação de GB3 em diferentes órgãos e a resposta destes à terapia de substituição enzimática. Os resultados obtidos por espectrometria de massa estão de acordo com a semiquantificação por TLC (ainda usada como método de referência), tendo como mais valia ser um método quantitativo de extrema sensibilidade

que fornece mais informação, nomeadamente no que diz respeito às subespécies identificadas. A quantificação das espécies individuais de Gb3 (C16, C18, C20, C22, C24, C24:1, C24-OH, C24:1-OH, C24:2-OH) nas amostras é realizada usando a monitorização de reação-múltipla (MRM). Neste método, um ião específico (ião precursor) é selecionado entre os vários gerados na fonte de ionização, sendo de seguida cindido na célula de colisão. Dos fragmentos resultantes, um único ião (ião filho) será detetado. Podem ser configurados múltiplos canais numa única medição, permitindo para além de uma elevada sensibilidade, a quantificação de múltiplos analitos numa só corrida.

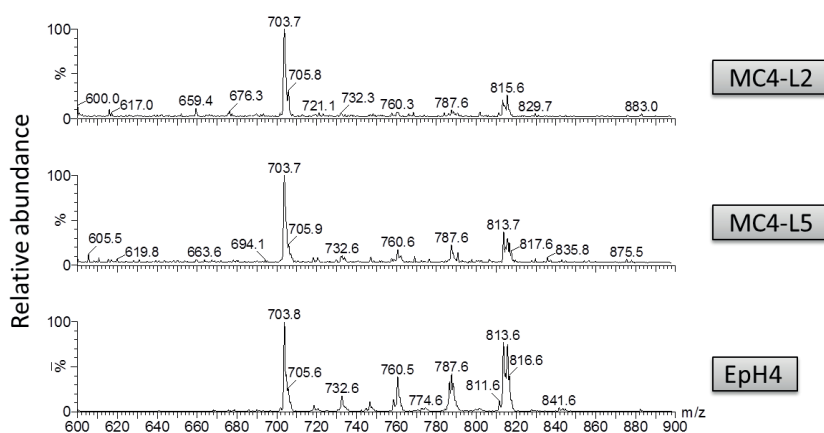
São aplicadas curvas de calibração para as diferentes espécies variando de 5 ppb a 1 ppm. O Gb3 total é calculado através da soma das espécies individuais.

Um longo caminho terá ainda de ser percorrido até que a espectrometria

de massa seja vista como uma ferramenta essencial na prática biomédica nacional. A nós foi-nos concedido o privilégio de, através deste sofisticado equipamento que aqui descrevemos, contribuir de alguma forma para aproximar a investigação em lipidómica da clínica e dos seus doentes.

## REFERÊNCIAS

- [1] Wenk MR. (2010) Lipidomics: new tools and applications. *Cell*. 143(6):888-95.
- [2] Bartke N, Hannun YA. (2009) Bioactive sphingolipids: metabolism and function. *J Lipid Res* 50 Suppl:S91-6.
- [3] Lahiri S, Futerman AH. (2007) The metabolism and function of sphingolipids and glycosphingolipids. *Cell Mol Life Sci*.;64(17):2270-84.
- [4] Haynes CA, Allegood JC, Park H, Sullards MC. (2008) Sphingolipidomics: methods for the comprehensive analysis of sphingolipids. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*.;877(26):2696-708.
- [5] Bielawski J, Szulc ZM, Hannun YA, Bielawska A. (2006) Simultaneous quantitative analysis of bioactive sphingolipids by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Methods*; 39(2):82-91.
- [6] Dória ML, Cotrim Z, Macedo B, Simões C, Domingues P, Helguero L, Domingues MR. (2011) Lipidomic approach to identify patterns in phospholipid profiles and define class differences in mammary epithelial and breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*. 2011 Oct 25. [Epub ahead of print]
- [7] Pinto R, Caseiro C, Lemos M, Lopes L, Fontes A, Ribeiro H, Pinto E, Silva E, Rocha S, Marcão A, Ribeiro I, Lacerda L, Ribeiro G, Amaral O, Sá Miranda MC. (2004) Prevalence of lysosomal storage diseases in Portugal. *Eur J Hum Genet*.; 12(2):87-92.



**Figura 1** – Espectro de massa da esfingomielina obtido por ionização por “electrospray” (ESI-MS) nas diferentes linhas celulares. A seleção das subespécies de esfingomielina foi feita por base ião precursor comum de  $m/z$  184, em modo positivo



Esteja sempre no topo da informação com o QUÍMICA- - Boletim da SPQ: Notícias, Artigos, Entrevistas, Destaques e uma Agenda sempre atual e do seu interesse.

# Sociedade Portuguesa de Química