

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

JUCÉLIO BEZERRA LINHARES

**METODOLOGIAS BIOANALÍTICAS PARA A ANÁLISE DE
BIOMARCADORES COM DIFERENTES DETECTORES – UMA
REVISÃO BIBLIOGRAFICA**

João Pessoa/PB
2014

JUCELIO BEZERRA LINHARES

**METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA A ANÁLISE DE
BIOMARCADORES COM DIFERENTES DETECTORES – UMA
REVISÃO BIBLIOGRAFICA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à banca examinadora do curso de Graduação em Farmácia da Universidade Federal da Paraíba como exigência parcial para obtenção do título de farmacêutico (generalista).

Orientador: Prof. Prof. Dr. Fábio Santos de Souza

João Pessoa/PB
2014

JUCELIO BEZERRA LINHARES

**METODOLOGIAS BIOANALÍTICAS PARA A ANÁLISE DE
BIOMARCADORES COM DIFERENTES DETECTORES – UMA
REVISÃO BIBLIOGRAFICA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
à banca examinadora do curso de Graduação
em Farmácia da Universidade Federal da
Paraíba como exigência parcial para obtenção
do título de farmacêutico (generalista).

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fábio Santos de Souza **(Orientador)**
(Departamento de Ciências Farmacêuticas – UFPB)

Prof.^a Msc. Silvana Tereza Lacerda Jales **(Examinadora)**
(Departamento de Ciências Farmacêuticas – UFPB)

Prof.^a Msc Renata da Silva Leite **(Examinadora)**
(Departamento de Ciências Farmacêuticas – UFPB)

João Pessoa/PB
2014

Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana.

Carl Jung

L755m Linhares, Jucelio Bezerra.

I. **Metodologias bioanalíticas para a análise de biomarcadores com diferentes detectores – uma revisão bibliográfica / Jucelio Bezerra Linhares. - -**

João Pessoa: [s.n.], 2014.

40f. : il. -

Orientador: Fábio Santos de Souza.

Monografia (graduação) – UFPB/CCS.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar forças em todos os momentos da minha vida, tanto os bons, quanto os difíceis.

A minha mãe, Eliane, minhas tias, meus primos, a minha família, por sempre estarem lá por mim, ainda que por muitas vezes eu não estivesse lá por eles e por sempre terem acreditado e se esforçado por mim. Meu muito Obrigado!

Aos meus amigos do curso, Renan, André, Guilherme, Alynne, Raissa, Vitor, Gustavo e Raphael pelo convívio e aprendizado mutuo, tornando esses anos de graduação inesquecíveis e bem mais fáceis.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Fabio Santos de Sousa, pela paciência e orientação demonstradas para comigo. E pelo exemplo de profissional que é.

Aos todos os professores que tive a oportunidade de aprender com eles durante o curso, em especial as professoras Sandra, Silvana, Bagnólia, Zélia e Inês, e aos professores Pablo e Adalberto cujo aprendizado não se resumiu a grade curricular.

Aos meus irmãos pela alegria, orgulho e motivação que me dão.

A Universidade Federal da Paraíba, ao Centro de Ciências da Saúde e a Coordenação de Farmácia, pela oportunidade de aprender nesses 5 anos

Muito Obrigado!

LINHARES, J. B. Metodologias Bioanalíticas para a Análise de biomarcadores com diferentes detectores – Uma revisão bibliográfica. 40 fls. Monografia (Graduação). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2014

Resumo

Esta revisão discute as tendências atuais no perfil molecular para os sistemas de aplicações de biologia emergentes na análise de biomarcadores, seus usos e critérios para sua seleção e método de análise. Historicamente, os desenvolvimentos metodológicos da ciência separação foram coincidentes com a disponibilidade de novas técnicas de ionização em espectrometria de massa. Acoplamento técnicas de separação miniaturizadas com instrumentação tecnologicamente avançada – Espectrometria de Massas - e as capacidades de processamento de dados modernos estão no centro das atuais plataformas de proteômica, metabolômica.

Palavras chave: biomarcadores, cromatografia, espectrometria de massas.

LINHARES, JB Bioanalytical Methodologies for the analysis of biomarkers with different detectors - A literature review. 40 fls. Monograph (Undergraduate). Federal University of Paraíba, João Pessoa, 2014

ABSTRACT

This review discusses current trends in molecular profile for systems biology applications emerging in the analysis of biomarkers, their uses and criteria for their selection and analysis method. Historically, methodological developments in science separation coincided with the availability of new ionization techniques in mass spectrometry. Miniaturized separation techniques coupled with technologically advanced instrumentation - Mass Spectrometry - and the processing capabilities of modern data are at the center of current platforms proteomics and metabolomics.

Keywords: biomarkers, chromatography, mass spectrometry.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: O desenvolvimento da doença ao saudável.....	18
Figura 2: Biomarcadores de dose Interna.....	21
Figura 3: Diagrama esquemático dos Indicadores Biológicos.....	23
Figura 4: Cromatograma de esteroides plasmáticos.....	34

LISTA DE GRAFICOS

GRAFICO 1: Número de trabalhos publicados com o termo <i>biomarker</i>	12
GRAFICO 2: Número de trabalhos publicados com o termo <i>biomarker e chromatography</i>	30
GRAFICO 3: Número de trabalhos publicados com o termo <i>biomarker e GC</i>	31
GRAFICO 4: Número de trabalhos publicados com o termo <i>biomarker e HPLC</i>	32
GRAFICO 5: Número de trabalhos publicados com o termo <i>biomarker e capillary chromatography</i>	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CL – Cromatografia Líquida

ESI - Interface de Ionização por Eletrospray

GC- Cromatografia em fase Gasosa

GC/MS – Cromatografia em fase gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas

HPLC- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

LC/MS – Cromatografia Líquida acoplada ao espectrômetro de Massas

MALDI - Matriz a Laser de Dissociação – ionização

MS – Espectrometria de Massas

MS/MS – Espectrometria de Massas *in tandem*

RNM – Ressonância Magnética Nuclear

SQ – Substância Química

UV – Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 METODOLOGIA.....	14
3 OBJETIVOS.....	15
3.1 Objetivo Geral.....	15
3.2 Objetivos Específicos.....	15
4 DE PERFIL METABOLICO PARA BIOLOGIA DE SISTEMA.....	16
5 APLICAÇÃO DOS BIOMARCADORES.....	18
6 SELEÇÃO E VALIDAÇÃO DOS BIOMARCADORES.....	19
7 TIPOS DE BIOMARCADORES.....	20
7.1 Biomarcadores de Exposição (ou dose interna)	20
7.2 Biomarcadores de Efeito.....	22
7.3 Biomarcadores de Suscetibilidade.....	28
8 EVOLUÇÃO DAS TECNICAS DE PERFIS MOLECULARES.....	28
9 LIDANDO COM A COMPLEXIDADE DOS DADOS ANALÍTICOS.....	35
10 CONCLUSÃO.....	36

1. INTRODUÇÃO

As primeiras referências sobre diagnóstico de enfermidades por marcadores datam de 560 anos a.C., quando Hipócrates propôs que modificações em líquidos orgânicos, entre eles o sangue, estavam associadas a patologias. A partir dessa época, as doenças foram mais bem caracterizadas pela busca de alterações em nossos *elementos constitutivos*. Ao final do século XX e início do XXI, foram iniciadas pesquisas para definir a nossa *identidade molecular normal* e as suas modificações devidas a doenças, visando aumentar o poder do diagnóstico. (Carvalho, 2005). Gerando assim um aumento no número de pesquisas e trabalhos publicados na área dos biomarcadores. (Gráfico 1)

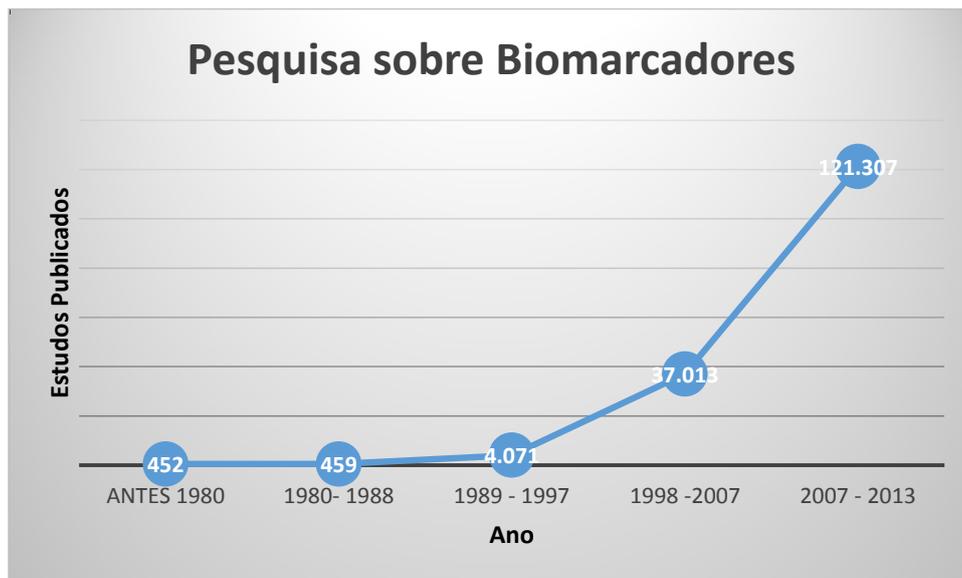


Gráfico 1 : Número de trabalhos publicados com o termo *biomarker*.

Fonte : Periódicos Capes

O rápido desenvolvimento nos campos da genômica, proteômica e metabolômica, que abrangem os principais tipos de biomarcadores, tem sido em grande parte impulsionado por avanços metodológicos/tecnológicos em espectrometria de massa biomolecular e pela ciência de separação em micro escala. Adicionalmente, melhoraram muito as capacidades computacionais para lidar com informações complexas – bioinformática. Quando dados analíticos cada vez mais extensivos e detalhados são relatados (Morel, 2004).

Especialmente em muitas novas e revistas técnico-especializadas, sem explicações sobre os significados bioquímicos ou mesmo tendências, torna-se adequado para alguma generalização, reflexões e comentários sobre as causas diretas e indiretas e atributos da “revolução ômica”. “Nossas áreas específicas estão encontrando sua integração na área do recém promovido “biologia dos sistemas” (Kitano 1966; Ommen, 2002; Morel, 2004; Greef, 2004).

Esta individualidade Bioquímica geralmente implica que um sistema vivo sob condições normais ou padrões é largamente caracterizado por seu conjunto único de parâmetros bioquímicos, compostos particulares e substratos, reações catalisadas enzimaticamente, etc., os quais podem ou não ser facilmente mensuráveis por técnicas manuais de perfil molecular. Como é sabido que micro-organismos simples, até mesmos as suas cepas, mais ou menos virulentas diferem em atividade biológica e interações com o hospedeiro, as diferenças na sua individualidade bioquímica (composição molecular) são automaticamente assumidas. Em Organismos multicelulares, e assim morfológicamente e bioquimicamente mais complexos, medir o perfil de uma certa produção integrada, que é uma função de alteração bioquímica individual de, por exemplo, um indivíduo doente, difere de um indivíduo saudável. Isso não quer dizer que organismos livres de doença não possam ser diferentes entre si, no entanto, ligeiramente, nas suas taxas metabólicas e composição biomolecular por condições diferentes de exercício físico e dieta, e em maior grau, por seu gênero e composição genética. (Morel, 2004)

O entendimento atual de processos biológicos no nível molecular tem sido muito facilitado pelos avanços na química bioanalítica nas últimas duas décadas. Como exemplo de áreas em que algum progresso foi feito, nós caracterizamos a proteômica quantitativa e seu papel na descoberta de biomarcadores. (Ommen, 2002)

2. METODOLOGIA

Foi realizada uma investigação em estudos publicados entre 2009 e 2013, em diversos bancos de dados eletrônicos (Scielo, Pub Med *Lilacs*, *Periódicos Capes*) utilizando as palavras-chaves Biomarkers, Marcadores Biológicos, Chromatography, HPLC, GC.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral: Elaborar um levantamento das metodologias analíticas aplicadas à detecção de biomarcadores

3.2 Objetivos específicos:

- Realizar uma avaliação das metodologias analíticas por cromatografia;
- Avaliação das técnicas de separação mais utilizadas na análise dos biomarcadores.
- Comparar os parâmetros analíticos das metodologias por CLAE e GC;
- Relacionar a aplicabilidade dos métodos por cromatografia em relação aos limites de detecção e quantificação para biomarcadores

4. DE PERFIL METABÓLICO PARA BIOLOGIA DE SISTEMAS

Biomarcador compreende toda substância ou seu produto de biotransformação, assim como qualquer alteração bioquímica precoce, cuja determinação nos fluidos biológicos, tecidos ou ar exalado, avalie a intensidade da exposição e o risco à saúde. (WHO, 1996).

Todo organismo vivo em seu ambiente representa um biosistema quimicamente único, cujas funções vitais podem ser sondadas através de medições analíticas. Além do reconhecimento morfológico de diferentes tipos de células, que tem sido a base de observações biológicas por um longo tempo, estamos agora rotineiramente capazes de fazer uma série de medições analíticas isoladas que podem nos ajudar a avaliar o estado de saúde ou "normalidade" dentro dos organismos em estudo. Embora isto seja verdade, como muito para as pequenas entidades biológicas, ou seja, micro-organismos ou plantas primitivas, do que é para os sistemas eucarióticos mais avançados, o organismo multicelular representa condições mais desafiadoras para nossas medições bioanalíticas. No entanto, estas medições metodologicamente independentes e relativamente simples analiticamente ainda podem ser correlacionados para proporcionar uma imagem biológica útil. Isto pode ser facilmente exemplificado em qualquer caso quando um médico pede uma bateria de testes clínicos a serem realizados em uma amostra de sangue de um paciente. No laboratório, ele/ela está sendo assistida pelo conhecimento de química clínica e epidemiologia que tem sido posta em prática por muitos anos. Um médico experiente pode aprender sobre a condição primária deste paciente, como, possivelmente, uma condição de diabetes ou um dos erros inatos do metabolismo, mas adicionalmente relacionar com a saúde suplementar informações que podem também existir devido ao restante dos doseamentos clínicos. Resultados não usuais de um laboratório clínico muitas vezes levam a testes clínicos adicionais e mais sofisticados, muitas vezes aqueles com base em determinados por anticorpos "marcadores " de uma doença. Enquanto um progresso considerável tem sido feito ao longo dos anos em diagnóstico clínico através de dosagens bioquímicas, uma intensiva busca de biomarcadores de doenças a ainda é tão vivo quanto sempre. (Ommen, 2002)

As questões de biocomplexidade foram cada vez mais reconhecidas na ciência contemporânea e, mais especificamente, no contexto do atualmente popular "biologia de sistemas" (Greef, 2004; Morel, 2004; Ommen 2002). Durante várias décadas, esta emocionante e tecnologicamente orientada área de atividade humana atual teve sua base filosófica na realização inicial do valor de análise de multicomponentes, em vez de medições analíticas isoladas. Embora as técnicas de Williams (1956) e outros pesquisadores eram bastante

primitivas, no seu tempo, ele foi capaz de definir critérios para a variação individual na biodiversidade humana e sugeriu que características metabólicas padrões poderiam ser obtidas a partir de pacientes que sofrem de diferentes doenças. Após Dalglish et al. demonstrarem que foi possível obter multicomponentes por cromatografia gasosa (GC) analisando os derivados de uma variedade de traços de compostos orgânicos presentes na urina e extratos de tecido, Horning (1970) e Horning (1971) introduziram o termo "perfis metabólicos", definindo os padrões de metabólitos relacionados bioquimicamente.

A individualidade bioquímica tem sido reconhecida como uma complicação experimental de aquisição de dados de indivíduos humanos. Este é um problema um tanto paralelo com a distinção entre os indivíduos "aparentemente saudáveis" e "doentes" em ensaios de química clínica onde gamas consideráveis para tanto, muitas vezes existem. Nos seres humanos, o exercício físico, as variações sazonais e diurnas, estado nutricional, fundo genético e etnia, fisiologia ou estado patológico têm sido reconhecidos como importantes, mesmo em ensaios clínicos com base em determinações isoladas (Hutterer, 1971). Num futuro próximo, as variáveis que não podem ser facilmente controladas devem ser, representadas em perfis em estudos de larga escala. Até que ponto as ferramentas mais eficientes da "revolução ômica" vão lidar com a complexidade bioquímica óbvia de tais sistemas biológicos ainda está para ser visto.

A biologia de sistemas fornece uma abordagem "holística" para classificar para fora um vasto conjunto de informação bioquímica fornecidas pelos campos em rápido desenvolvimento da genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica. Seguindo o Projeto Genoma Humano e os seguindo os esforços para caracterizar os genomas de modelos animais, a esmagadora tarefa de caracterizar os proteomas correspondentes com a suas modificações pós-transcricionais tem preocupado muitos laboratórios especializados. Os avanços sem precedentes na caracterização biomolecular e quantificação de proteínas em fluidos e tecidos fisiológicos parecem fornecer fundação para novas investigações. (Diamandis, 1998).

Os aspectos dinâmicos do comportamento dos biomarcadores são mostrados na figura 1, de acordo com van der Greef et al., que ilustram as flutuações temporais na homeostase e progressão em diferentes fases de uma doença. Encontrar biomarcadores importantes na fase precoce de doenças é, obviamente, um objetivo muito importante da pesquisa biomédica, o que exigirá uma "síntese" científica de muitas experiências de perfis moleculares envolvendo amostras humanas, bem como modelos animais apropriados.

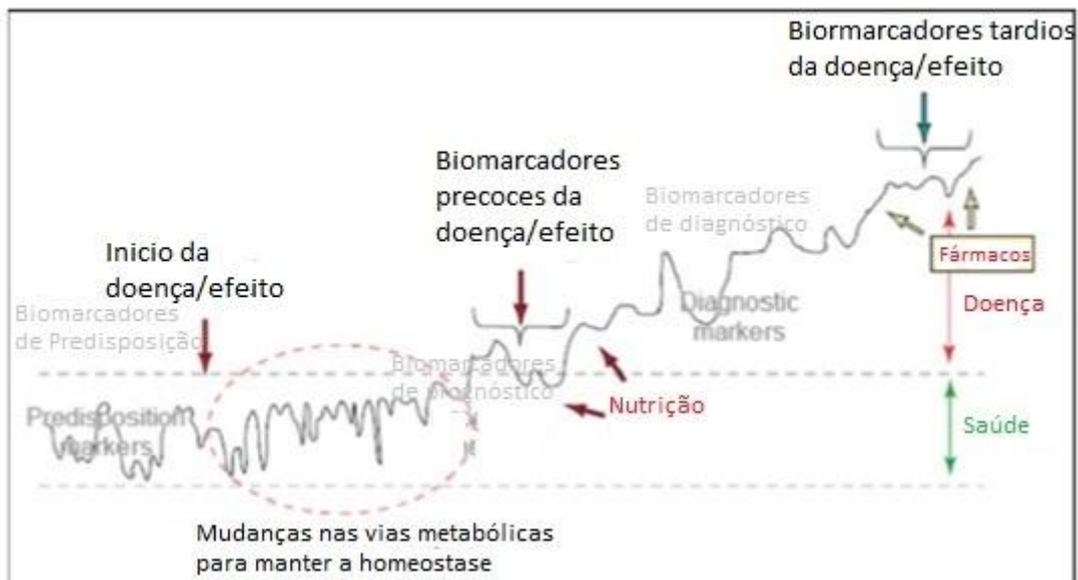


Figura 1: O desenvolvimento da doença de saudável (homeostase dentro de linhas pretas-pontilhada) para a saúde sub-ótima e, eventualmente, um estado de doença declarada. Padrões de biomarcadores (por razões gráficas representados como uma única linha) são essenciais para descrever as alterações de normalidade a disfunção. Reproduzido de (Greef, 2004).

5. APLICAÇÃO DOS BIOMARCADORES

Os Biomarcadores podem ser usados para vários propósitos, dependendo da finalidade do estudo e do tipo da exposição química. Podem ter como objetivos avaliar a exposição (quantidade absorvida ou dose interna), avaliar os efeitos das substâncias químicas e avaliar a suscetibilidade individual. Além disso, podem ser utilizados independentemente da fonte de exposição, seja através da dieta, do meio ambiente geral ou ocupacional. A utilização destes Biomarcadores pode ter como finalidade elucidar a relação causa-efeito e dose-efeito na avaliação de risco à saúde; para fins de diagnóstico clínico; e para fins de monitorização biológica, realizada de maneira sistemática e periódica (World Health Organization 1993).

O uso dos Biomarcadores na avaliação de risco fornece uma ligação crítica entre a exposição à substância química, dose interna e prejuízo à saúde, e eles são valiosos na avaliação de risco. Contudo, existe uma necessidade de identificar e validar para cada sistema orgânico estes parâmetros característicos que são indicativos de indução de disfunção orgânica, alteração clínica e toxicidade patológica, além de estabelecer a especificidade e sensibilidade de cada biomarcador e seu método para determinação (World Health Organization 1993).

Os Biomarcadores podem ser utilizados no diagnóstico clínico para: (World Health Organization 1993).

- confirmar diagnóstico de intoxicação agudo ou crônico;
- avaliação da efetividade de tratamento;
- avaliar o prognóstico de casos individuais.

Os podem ser usados ainda na atividade de monitorização para confirmar a exposição individual ou de uma população a uma determinada substância química e avaliar o risco, quando comparados com uma referência apropriada. Sabendo-se que a Monitorização Ambiental é realizada para reduzir as exposições ocupacionais e comprovar se as medidas preventivas adotadas no ambiente são satisfatórias, a Monitorização Biológica tem como meta principal verificar se existe segurança enquanto ocorre a presença do agente químico no ambiente de trabalho, em exposições presentes, e inclusive passadas, para evitar a ocorrência de efeitos adversos à saúde (World Health Organization 1993).

A realização da Monitorização Biológica permite avaliar a exposição global ao agente tóxico devido à exposição ocupacional, além de considerar os aspectos individuais de exposição aumentada, provenientes, por exemplo, de esforço físico; e as suscetibilidades biológicas (Lauwerys R., 1986)

6. SELEÇÃO E VALIDAÇÃO DOS BIOMARCADORES

O processo de seleção e validação dos indicadores biológicos requer cuidado em relação à especificidade e sensibilidade, assim como a medida da exposição e a manifestação dos efeitos observados. A validação é um processo utilizado para estabelecer a relação quantitativa e qualitativa do biomarcador com a exposição, em função da substância química e do objetivo selecionado (World Health Organization 1993).

Para que uma substância química, seu metabólito ou uma alteração biológica sejam validados e/ou propostos como biomarcador, é desejável que o mesmo apresente as seguintes características: (World Health Organization, 1993).

A quantificação do indicador deve:

- Refletir a interação (qualitativa ou quantitativa) do sistema biológico com a substância química;
- Ter conhecida e apropriada sensibilidade e especificidade para a interação;
- Ser reprodutível qualitativamente e quantitativamente.

- Estar contido em um meio biológico acessível de análise, considerando a necessidade de manutenção da integridade da amostra entre a coleta e o procedimento analítico, e de preferência não ser invasivo.

7. TIPOS DE BIOMARCADORES

7.1 Biomarcadores de exposição (ou dose interna)

O indicador biológico de exposição estima a dose interna, através da determinação da substância química ou de seu produto de biotransformação em fluídos biológicos, como sangue, urina, ar exalado e outros, possibilitando quantificar a substância no organismo, quando a toxicocinética é bem conhecida (Lauwerys, 1993)

Os biomarcadores de exposição refletem a distribuição da substância química ou seu metabólito através do organismo, e por isso são identificados como dose interna. Consequentemente, a dose externa se refere à concentração do agente químico presente no ambiente em contato com o organismo. (Lauwerys, 1993)

Teoricamente, a distribuição da substância no organismo pode ser traçada através de vários níveis biológicos, como tecidos e células, até seu alvo definitivo (World Health Organization 1993).

Da quantidade total absorvida da substância química, somente uma porção chegará até o tecido alvo. Uma porção alcançará o sítio crítico (sítio alvo) na macromolécula, com somente uma fração da última quantidade agindo como a dose biologicamente ativa. A escolha dos Biomarcadores para cada uma destas formas de dose interna seria útil para avaliação do risco (World Health Organization, 1999).

Na figura 2, o afinamento da base, a diminuição da quantidade total absorvida para cada nível, a maneira como ocorre a distribuição e o metabolismo, demonstram a diminuição da concentração da dose interna que alcança o tecido alvo (célula ou sítio crítico) (World Health Organization 1993).



Figura 2: Biomarcadores de dose interna das substâncias químicas, para qual o principal mecanismo de interação ocorre através da interação molecular. (World Health Organization 1993)

Dependendo da substância química e do parâmetro biológico analisado, o termo “dose interna” pode abranger diferentes concepções.

O biomarcador de dose interna pode refletir a quantidade absorvida imediatamente antes da amostragem, como, por exemplo, a concentração de um solvente no ar alveolar ou no sangue durante a jornada de trabalho de indivíduos expostos; pode refletir a quantidade absorvida no dia anterior, como, por exemplo, a concentração do solvente no ar alveolar ou no sangue coletados 16 horas após o final da exposição; ou refletir a quantidade absorvida durante meses de exposição, quando a substância tem um tempo de meia vida longo, como, por exemplo, a concentração de alguns metais no sangue (World Health Organization, 1996).

A dose interna pode significar também a quantidade da substância química armazenada em um ou vários compartimentos do organismo ou distribuída em todo o organismo. (World Health Organization 1996)

Isto geralmente se aplica aos agentes tóxicos acumulativos (Lauwerys, 1993). Por exemplo, a concentração dos inseticidas organoclorados no sangue reflete a quantidade acumulada no principal sítio de depósito (tecido adiposo).

Por último, como uma forma ideal, a dose interna pode representar a dose “verdadeira”, ou seja, a quantidade da substância ligada ao sítio alvo ou biodisponível para interagir. Estes indicadores podem ser viáveis quando o órgão crítico for acessível (por exemplo, a hemoglobina, no caso da exposição ao monóxido de carbono) ou quando o agente tóxico interage com constituintes do sangue de forma similar aos constituintes do órgão crítico (por exemplo,

alquilação da hemoglobina, refletindo a ligação com DNA no tecido alvo). Neste caso, a dose interna pode ser o produto da interação entre um xenobiótico e alguma molécula crítica ou célula, como a medição dos aductos covalentes formados com a substância química e que podem ser mensurados num compartimento dentro do organismo (Lauwerys, 1993).

No entanto, a maioria dos indicadores biológicos de dose interna refletem apenas a exposição, ou seja, a quantidade absorvida do toxicante no organismo.

Para escolha do indicador biológico de dose interna mais adequado a uma situação específica de exposição, é necessário o conhecimento do comportamento cinético do agente químico presente no ambiente. Além disso, é necessário o conhecimento do tempo de permanência da substância química no organismo para a definição do momento ideal para a coleta. Alguns biomarcadores de dose interna, como benzeno no sangue, ácido hipúrico na urina, 2,5 hexanodiona na urina, refletem apenas a exposição recente ao benzeno, tolueno e n-hexano, respectivamente.

Enquanto outros, como chumbo e mercúrio, após a quelação, refletem a exposição média dos últimos meses, e o cádmio na urina reflete a exposição dos últimos anos (Lauwerys, 1993).

7.2 Biomarcadores de efeito

O Biomarcador de Efeito é um parâmetro biológico, medido no organismo, o qual reflete a interação da substância química com os receptores biológicos. Muitos biomarcadores de efeito são usados na prática diária para confirmar um diagnóstico clínico. Mas, para o propósito da prevenção, um biomarcador de efeito considerado ideal, é aquele que mede uma alteração biológica em um estágio ainda reversível (ou precoce), quando ainda não representa agravo à saúde. (World Health Organization 1996)

Geralmente, as alterações bioquímicas são consideradas como uma fonte potencial de indicadores biológicos de efeito. Se considerarmos que estas alterações precedem um dano estrutural, a detecção destas alterações biológicas permite a identificação precoce de uma exposição excessiva e intervenção para prevenir um efeito irreversível, ou seja, a doença. Esta estratégia é baseada na identificação das alterações bioquímicas precoces e reversíveis que são indicadores sensíveis e específicos de uma resposta do organismo à exposição. A extensão em que estes biomarcadores vão predizer uma resposta mais avançada (como doença ou risco de doença) requer necessariamente mais pesquisas e evidências através de estudos epidemiológicos (Rüdiger HW. 1999)

Em geral, um marcador precoce no progresso de uma resposta do organismo tem uma associação menor com o dano; no entanto é mais útil a sua aplicação com o propósito de prevenir a doença (Figura 3). Para a ação preventiva de uma exposição excessiva (ou que provoca danos à saúde), o

efeito biológico medido, que é um biomarcador, tem que ser, necessariamente, um efeito não adverso (World Health Organization, 1996).

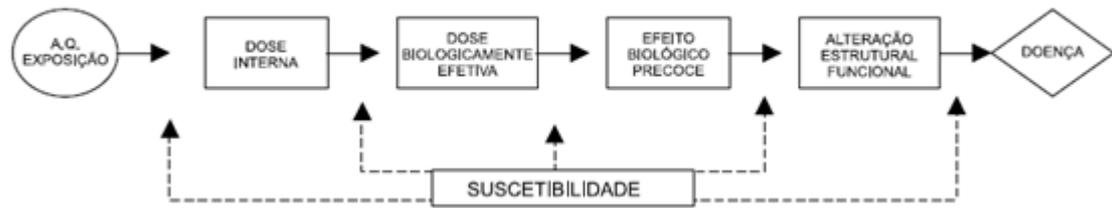


Figura 3: Diagrama esquemático dos indicadores biológicos, indicando uma resposta progressiva do organismo à uma exposição a um agente químico e os fatores de susceptibilidade que podem influenciar as etapas desta progressão. (World Health Organization 1996)

A distinção entre um efeito biológico adverso e um efeito biológico não adverso nem sempre é clara e algumas vezes torna-se arbitrária devido à dificuldade de se avaliar o alcance do efeito na saúde. Entretanto, considera-se a ocorrência de efeitos não adversos quando: (World Health Organization 1993).

- ao serem produzidos numa exposição prolongada, não resultem em transtornos da capacidade funcional nem da capacidade do organismo para compensar nova sobrecarga;
- são reversíveis e não diminuem perceptivelmente a capacidade do organismo de manter sua homeostase orgânica;
- não aumentam a suscetibilidade do organismo aos efeitos indesejáveis e a outros fatores de risco ambiental.

Dentre os indicadores biológicos de efeito tem-se a carboxiemoglobina, a atividade da enzima colinesterase eritrocitária, níveis de enzimas e intermediários da biossíntese do HEME, de proteínas na urina etc. Cada um apresenta características diferentes segundo a sua especificidade. Por exemplo (World Health Organization, 1996):

- Carboxiemoglobina (COHb): a COHb, apesar de ser um biomarcador de efeito, apresenta uma correlação muito significativa com a exposição ambiental ao monóxido de carbono, e reflete a dose interna deste toxicante ligado ao tecido alvo;
- Colinesterases: a determinação da atividade das enzimas colinesterase eritrocitária e colinesterase plasmática em indivíduos expostos aos inseticidas organofosforados e/ou carbamatos é utilizada também para o diagnóstico e o tratamento das intoxicações. Entretanto, não apresenta correlação muito significativa em exposições ambientais e/ou ocupacionais leves ou moderadas a estes inseticidas. Ainda assim, é considerado o indicador biológico de escolha.

- Enzima ácido delta amino-levulínico (ALA-D) nos eritrócitos: esta enzima é altamente sensível à inibição pelo chumbo. Em uma concentração de chumbo na faixa de 5 a 40 mg/dL já é possível observar uma correlação negativa entre a ALA-D e o Pb/sg. Por isso, representa um adequado indicador de efeito para exposição ambiental ao chumbo.

Alguns indicadores biológicos de efeito possibilitam a avaliação da ação de uma substância química no órgão alvo (ou sítio crítico) a partir da medida de uma alteração biológica associada a esta ação. No entanto, esta medida pode ter como limitação a dificuldade de acesso a certos tecidos do organismo. (World Health Organization 1996)

Embora sejam parâmetros importantes para prevenir possíveis efeitos nocivos à saúde, não são, em sua maioria, específicos para as substâncias químicas envolvidas, e por isso requerem pesquisas com o propósito de validação dos mesmos. (World Health Organization 1996)

7.2.1 Biomarcadores de nefro-toxicidade.

Vários tipos de parâmetros têm sido testados e usados como biomarcadores de dano renal. Estes têm sido classificados como:

- marcadores funcionais (por exemplo, creatinina sérica e β_2 – microglobulina);
- proteínas de baixo ou alto peso molecular (por exemplo, albumina, transferrina, globulina ligada ao retinol);
- marcadores de cito-toxicidade (por exemplo, antígenos tubulares);
- enzimas urinárias (por exemplo, N-acetilglicosaminidase, β -galactosidase).

Os biomarcadores de nefro-toxicidade foram bem validados em relação à exposição ao cádmio; no entanto, não têm evidências científicas suficientes para a exposição ao mercúrio e chumbo (Roels H et al. 1993, World Health Organization, 1991).

7.2.2 Biomarcadores de Hepato-toxicidade.

Os efeitos de substâncias químicas no fígado têm sido estimados tradicionalmente por determinação da atividade de várias enzimas, como, por exemplo, aminotransferases, álcool desidrogenase, lactato desidrogenase, glutationa-S-transferase, entre outras. (World Health Organization 1993).

A hepatotoxicidade é causada por várias SQ que são metabolizadas pelo Sistema Citocromo P-450 a intermediários reativos. Por exemplo, para o tetracloreto de carbono, tem sido extensivamente estudada e bem documentada a sua ação hepatotóxica. O metabólito reativo do tetracloreto de carbono inicialmente reduz a glutationa peroxidase (GPX) intracelular a um nível que predispõe a reação do metabólito com macromoléculas críticas, levando à morte celular e à hepatotoxicidade. Neste caso, os biomarcadores de

efeito poderiam incluir níveis de glutathione, peroxidação lipídica ou número de células necrosadas (Yiin SJ, Lin TH, Shih TS 1996). Estes biomarcadores de hepatotoxicidade também estão associados à exposição ao cromo VI no estudo de Huang (1999).

7.2.3 Biomarcadores de geno-toxicidade

Técnicas sensíveis baseadas em métodos físico-químicos ou imunológicos para a detecção de uma variedade de substâncias conhecidas como carcinogênicas têm sido desenvolvidas. Entre estas estão incluídas as aflatoxinas, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, as aminas aromáticas, e os praguicidas (World Health Organization 1993).

Estes biomarcadores incluem os aductos de DNA e proteína (aductos de hemoglobina e albumina), que se referem à ligação do xenobiótico ou de seu metabólito a estas moléculas, formando os aductos (Hemminki K. 1995). Tendo em vista que os aductos constituem a própria substância química ligada ao sítio alvo, os mesmos são também considerados como biomarcadores de exposição ou dose interna.

7.2.4 Biomarcadores de Neuro-toxicidade

A complexidade das funções do sistema nervoso, os eventos neurotóxicos de natureza múltipla e a variabilidade e inacessibilidade dos sítios celulares e moleculares deste órgão são fatores que limitam o estabelecimento de indicadores para se avaliar a ação neurotóxica das substâncias químicas. Acrescente-se a estes fatores o fato de os efeitos neurotóxicos se iniciarem tardiamente, após exposições prolongadas ou mesmo após um período de latência após terminada a exposição. Neste sentido, tem-se procurado validar alguns parâmetros que possam permitir a detecção precoce da ação neurotóxica, antes que seja evidenciado um dano à saúde do indivíduo exposto, seja por exposição ocupacional ou ambiental, considerando principalmente as crianças. São vários os indicadores utilizados para se avaliar o risco e a exposição a uma substância neurotóxica. Alguns estudos podem abordar três enfoques (Manzo L et al 1996; Costa LG 1998; Silbergeld EK. 1993).

7.2.4.1 Enfoque Neurofisiológico

O enfoque neurofisiológico, como o estudo da condução nervosa, o eletroencefalograma etc., é bastante útil no diagnóstico de distúrbios neurológicos, mas a utilização destes parâmetros na identificação dos efeitos neurológicos iniciais é ainda pouco estabelecida e por isso apresenta um baixo valor preditivo. Quanto à avaliação clínica, a mesma deve ser realizada com base num protocolo muito bem detalhado (Hawkins KA, 1990).

7.2.4.2 Enfoque Neurocomportamental

Métodos para avaliar alterações de funções cognitivas, como, por exemplo, aprendizagem e memória, têm sido extensivamente utilizados em indivíduos expostos a solventes e metais pesados. No entanto, em relação aos testes neurocomportamentais, estes podem estar alterados por motivos outros que não por ação de um xenobiótico. (Johnson BL 1993).

Por isso, para concluir sobre uma ação neurotóxica através de testes neurocomportamentais, estes devem ser extremamente bem delimitados e interpretados. (Johnson BL 1993).

7.2.4.3 Enfoque Neuroquímico

No enfoque neuroquímico, várias evidências experimentais mostram que, na progressão de doenças neurotóxicas, os eventos bioquímicos precedem as alterações estruturais e danos permanentes ao Sistema Nervoso Central. Dessa forma, a medida destas alterações poderiam fornecer informações úteis sobre os efeitos precoces (ou iniciais) detectáveis, imediatamente antes ou logo após o início da doença (intoxicação) (Hawkins KA, 1990).

Em geral, os eventos bioquímicos que ocorrem no Sistema Nervoso são considerados como potenciais biomarcadores; no entanto, a principal limitação da medida destes parâmetros é a inacessibilidade do tecido alvo. Geralmente, no sistema nervoso central, muitos precursores e produtos são recicláveis e retidos no local. Além disso, as mudanças que acompanham a função neurológica ocorrem dentro de um pequeno espaço intra ou extra celular do próprio órgão, o que leva à impossibilidade de se implementar as rotinas de análises dos mesmos.

Diante disso, uma nova metodologia de biomarcadores tem sido desenvolvida, procurando alcançar os propósitos da avaliação de risco à saúde, utilizando tecidos mais acessíveis para determinar indicadores “substitutos” daqueles localizados no tecido nervoso (Hawkins KA, 1990).

Por isso, tem-se observado que alguns parâmetros bioquímicos e moleculares, semelhantes aos envolvidos na ação tóxica ocorrida dentro do SNC, podem estar presentes em tecidos mais acessíveis, como fluído cérebro-espinhal, sangue, plasma e células sanguíneas. Alguns destes parâmetros são (Hawkins KA, 1990).

7.2.4.1 Receptores:

- Receptores muscarínicos da Acetilcolina em linfócitos;
- Receptor sigma; receptor Beta e alfa2 em plaquetas;

7.2.4.2 Enzimas:

- Acetilcolinesterase eritrocitária;
- Esterase neurotóxica em linfócitos;
- MAO – tipo B em plaqueta;
- Dopamina Beta hidoxilase no soro;

7.2.4.3 Sistema de Recaptação:

- 5-Hidroxiindolacético (serotonina) em plaquetas;

7.2.4.4 Transdução do sinal nervoso:

- Concentração de cálcio intracelular;
- Fosfoinositol em plaquetas e linfócitos;

A medida destes parâmetros permite avaliar, através de métodos acessíveis, a ação de um agente químico no sistema nervoso central, os quais são denominados Indicadores Substitutos de Neuro-toxicidade ou, simplesmente, Marcadores Substitutos. O estudo destas alterações bioquímicas pode possibilitar a oportunidade de se identificar precocemente uma exposição excessiva e avaliar a neuro-toxicidade para prevenir o aparecimento de efeitos ou danos irreversíveis (Mergler D, Baldwin M 1997).

Entretanto, a escolha dos indicadores substitutos não é fácil e nem sempre é possível. É necessário que estes parâmetros periféricos sejam equivalentes ou então correlacionados funcionalmente ao parâmetro correspondente no SNC. Esta correspondência deve ser comprovada através de estudos experimentais que demonstrem que o parâmetro sob investigação tenha a mesma característica bioquímica e funcional daquele presente no SNC; e que as alterações quimicamente induzidas neste parâmetro ocorrem do mesmo modo nos dois sistemas (periférico e nervoso) (Hawkins KA, 1,990).

Posteriormente, a comprovação de que tal marcador biológico substituto é preditivo para determinado xenobiótico (seja para avaliar risco ou doença), requer necessariamente mais pesquisas, incluindo vigilância epidemiológica e estudos prospectivos para a validação dos mesmos. Vários trabalhos (Baldwin M et al, 1999; Smargiassi A, Mutti A. 1998; Jadhav AL, Ramesh GT. 1997) têm apresentado, ultimamente, contribuições e discussões sobre o uso destes marcadores periféricos (ou marcadores substitutos) de neuro-toxicidade, nos

quais vários autores apontam a necessidade de se incluir a avaliação de outros parâmetros de neuro-toxicidade, como as alterações neuro-comportamental, neurofisiológica e neuro-clínica.

7.3 Biomarcadores de suscetibilidade

A predisposição genética, além de fatores externos, tais como idade, dieta, estilo de vida, podem influenciar/afetar a suscetibilidade de indivíduos expostos a substâncias químicas (World Health Organization 1993).

Embora alguns indivíduos experimentem exposição ambiental similar, diferenças genéticas no metabolismo podem produzir doses marcadamente diferentes no sítio crítico e, conseqüentemente, nível diferente de resposta. Até mesmo quando as doses críticas são similares, respostas diferentes podem ser notadas nos indivíduos devido a variações na suscetibilidade biológica. Os biomarcadores de suscetibilidade podem refletir fatores genéticos ou adquiridos que influenciam na resposta do organismo a uma determinada exposição química. Estes são fatores pré-existent e independem da exposição, são predominantemente genéticos, embora a patologia, alterações fisiológicas, medicamentos e exposição a outros agentes ambientais também possam alterar a suscetibilidade individual. Os biomarcadores de suscetibilidade identificam aqueles indivíduos na população que têm uma diferença genética ou adquirida na suscetibilidade para os efeitos da exposição a substâncias químicas (Akgür AS 1997).

Os biomarcadores de suscetibilidade indicam quais os fatores podem aumentar ou diminuir um risco individual no desenvolvimento da resposta do organismo decorrente da exposição aos agentes químicos ambientais. (Rüdiger HW, 1999).

8. A EVOLUÇÃO DAS TÉCNICAS DE PERFIS MOLECULARES

Biomarcadores apropriados devem fornecer valiosas informações para a seleção de um tratamento médico ou previsão e medidas de resultados. Na situação atual, com o procedimento de descoberta para biomarcadores, os investigadores, utilizando diferentes perfis de tecnologias moleculares geralmente olham para um grande número de fatores biológicos que compõe a amostra, como expressão gênica (genômica e transcriptômica), mapas completos de peptídeos (proteômica *shotgun*), produtos de desglicosilação a partir de misturas de glicoproteínas, ou perfis complexos de metabolitos endógenos (metabolômicos). Uma vez que um número de indivíduos e seus perfis tem que ser julgado em uma estatística base, a busca de biomarcadores putativos equivale a procura de um agulha num palheiro sem o uso de

computador ligado a técnicas de reconhecimento de padrões. Esta conexão entre as metodologias de perfis avançados e análise dos dados foi ocasionalmente encontrada com sucesso na identificação preliminar de biomarcadores. O objetivo final é identificar um biomarcador ou um conjunto de biomarcadores com a maior possibilidade de a avaliação de risco (medicina preventiva), diagnóstico precoce de uma doença, e prognóstico. (Nilcholson, J.K. 2004)

Quando se trata da exposição às substâncias químicas a avaliação biológica só é possível quando estiverem disponíveis suficientes informações toxicológicas referentes ao mecanismo de ação e/ou à toxicocinética dos agentes químicos aos quais os indivíduos estão expostos. (Glass, L. 1988)

Quando a Monitorização Biológica está baseada na determinação da substância química ou do seu metabólito no meio biológico, torna-se essencial o conhecimento de como a substância é absorvida pelas diferentes vias; posteriormente, de como é distribuída para os diferentes compartimentos do organismo; de como é biotransformada; e, finalmente, de como é eliminada. Além de ser necessário saber também se a substância se acumula ou não no organismo (Rüdiger HW. 1999). Da mesma forma, se a Monitorização Biológica estiver baseada na medida de uma alteração biológica do organismo, causada pelo agente químico, é necessário conhecer o processo da toxico dinâmica, ou seja, é preciso conhecer o mecanismo de ação da substância química para identificar quais são os efeitos não adversos decorrentes daquela ação (Bernard A, Lauwerys R. 1986). Isso se faz necessário porque só a identificação e a medida de um efeito precoce, não adverso, podem ser usadas para fins de prevenção. (Rüdiger HW. 1999)

Vários são os parâmetros biológicos que podem estar alterados como consequência da interação entre o agente químico e o organismo; entretanto, a determinação quantitativa destes parâmetros usados como Indicadores Biológicos ou Biomarcadores, só é possível se existir correlação com a intensidade da exposição e/ou o efeito biológico da substância (World Health Organization, 1996).

Claramente, a cromatografia tem feito incursões significativas desde décadas atrás para que estivéssemos um pouco mais perto de um completo conhecimento dos sistemas vivos. Em primeiro lugar, o advento da cromatografia gás – líquido e novos detectores de ionização sensível desenvolvidos, durante o final dos anos 1950 e ao longo da década de 1960, definem o tom para cromatografia como um método analítico quantitativo para as determinações de multicomponentes. Estudos subsequentes por diferentes grupos de pesquisa, levando à conversão de biocompostos polares (esteroides, açúcares, ácidos urinário, etc) em seus derivados passíveis de análise por CG, alargaram enormemente o âmbito de aplicações biomédicas para GC. O quase desenvolvimento coincidente de CG-capilar e GC- MS, em particular, para separações bioquímicos e medições adicionou a resolução necessária, a sensibilidade e o poder de identificação para estudar uma vasta gama de

moléculas biologicamente importantes. Naturalmente, o âmbito dos inquéritos metabolômicos tornou-se significativamente enriquecido duas décadas mais tarde, quando a combinação de cromatografia líquida com espectrometria de massa (LC - MS) e outras tecnologias relevantes começaram a facilitar a detecção e perfilamento quantitativo dos diversos compostos biológicos que estavam fora do alcance de técnicas com base em GC - MS. (Nilcholson, J.K 1999). Um histórico da pesquisa de biomarcadores utilizando cromatografia é mostrado no Gráfico 2.

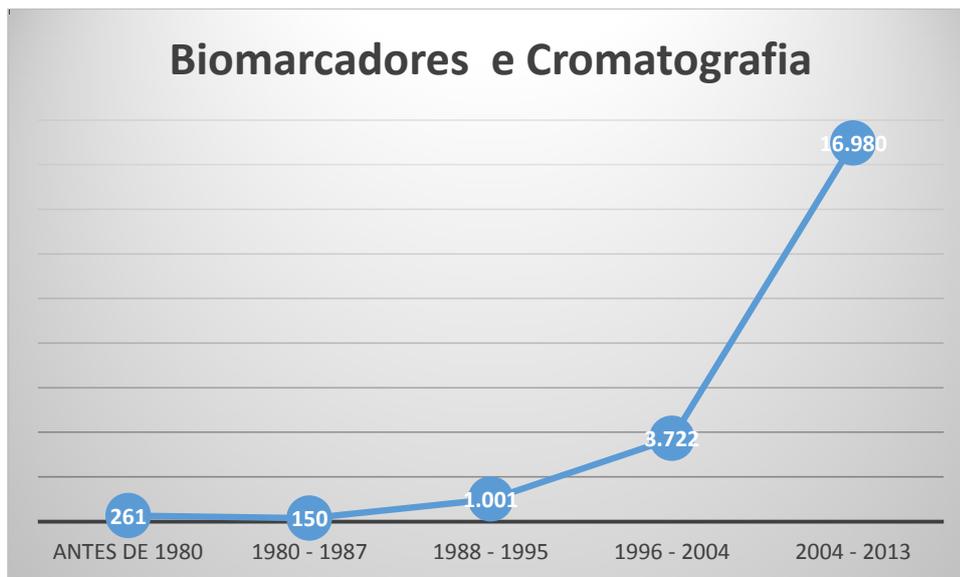


Gráfico 2 : Número de trabalhos publicados com o termo *biomarker e chromatography*. Fonte : Periódicos Capes

O objetivo principal da prática de quantificar vários perfis de fluidos corporais e constituintes de tecidos tem sido o de definir o bioestado químico na saúde e na doença. Isto foi resumido por Jellum (1977) há muitos anos em que "parece razoável supor que se alguém fosse capaz de identificar e determinar a concentração de todos os compostos dentro do corpo humano, incluindo elevado peso molecular , bem como substâncias de baixo peso molecular, este alguém provavelmente acharia que quase todas as doenças conhecidas resultariam em alterações características da composição bioquímica das células e fluidos corporais". Tecnologias por espectrometria de massa de separação de biomoléculas e as ferramentas de bioinformática de hoje sejam formidáveis , eles são provavelmente ainda estão muito longe de atingir um inventário completo de todos os constituintes de fluidos e tecidos do corpo.

Ao longo da história o desenvolvimento da cromatografia e eletroforese, muitas vezes nos lembra de que a capacidade de quantificar e velocidade analítica são os ingredientes essenciais de sucesso na aplicação de uma

técnica específica para um problema biomédico significativo. De todos os métodos cromatográficos, cromatografia em fase gasosa (GC) foi o primeiro a obter as análises de componentes múltiplos de urina e extratos de tecidos, incluindo ácidos alifáticos e aromáticos esteroides, bem como a sua glicina e conjugados glucuronídicos (Dalglish, 1966). Como a maioria das substâncias bioquímicas são termicamente lábeis, isso só foi possível após o desenvolvimento de técnicas de derivação química da amostra que estabilizaram tais solutos. Um histórico do número de publicações utilizando GC é mostrado no Gráfico 3.

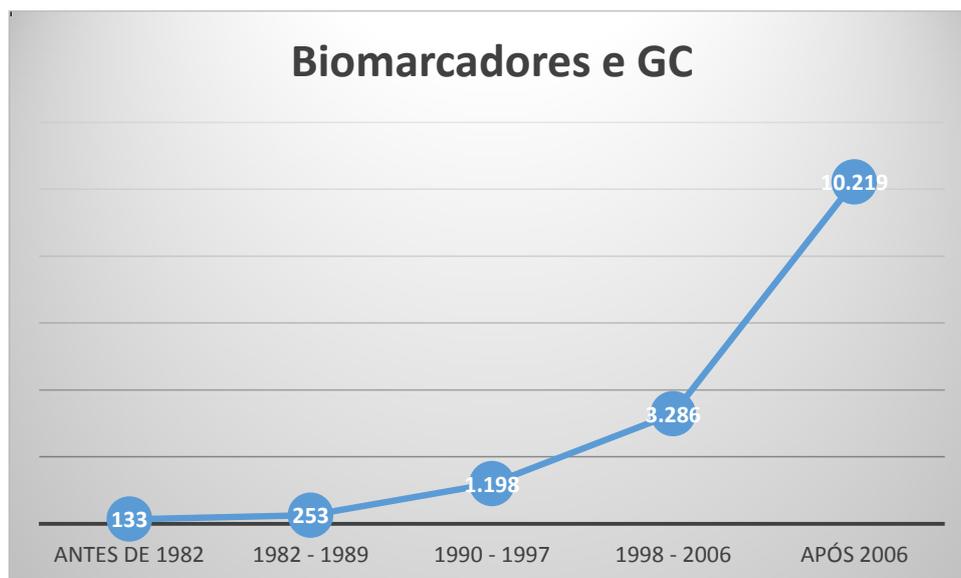


Gráfico 3: Número de trabalhos publicados com o termo *biomarker* e GC.

Fonte : Periódicos Capes.

Tornou-se cada vez mais claro a partir da perspectiva de hoje que os estudos de perfil molecular só podem ter êxito se eles prontamente fornecerem, pelo menos, os seguintes atributos: (Novotny M. 2003)

- Resolução adequada da maioria, se não todos, os componentes da mistura importantes;
- Inequívoca estrutural identificação / verificação dos componentes a serem medidos e quantificados, e;
- Quantificação fiável, com a precisão de medição necessária, de modo que os erros de medição não devem exceder as diferenças genuínas devido aos perfis individuais distintos dos diferentes sujeitos do estudo.

A maioria das aplicações bioquímicas da GC ao longo dos anos 1970 refletem essas metas: desenvolvimento de GC capilar para dosagens bioquímicas (Novotny, 1971); uma coincidente disponibilidade de sua

combinação com a espectrometria de massa (GC-MS) para identificação de metabólitos importantes, e, as melhorias gerais na confiabilidade da GC-capilar como uma técnica de perfil de exemplo em termos de amostragem e instrumentação (Novotony, 1978).

A maioria destas questões aparecem em paralelo em um tarde desenvolvimento de abordagens metabolômicas baseadas em espectrometria de RMN (Nicholson, J.K 1989; Nicholson, J.K 1999), uma técnica inerentemente quantitativo, o qual também fornece a identificação estrutural, ainda com base em princípios físicos diferentes. Em certas aplicações, as técnicas baseadas em RMN apresentam vantagens de uma preparação mínima da amostra e sua natureza não-destrutiva, por outro lado, elas são muitas vezes obrigadas a perca pequena, mas biologicamente importante, de componentes, devido à falta geral de sensibilidade.

Com suas limitações inerentes da volatilidade do soluto, a GC capilar e GC- MS não poderiam cobrir uma ampla gama de metabólitos polares e outras biomoléculas. As tentativas para a amostra de derivação (Novotny, 1984) para uma revisão) ou degradação de biomoléculas através de pirólise (J.B.M. Dr. Oge, 1987) trouxe apenas um progresso relativamente marginal este problema. Embora o advento de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) removeu as limitações de migrações moleculares para moléculas de não- voláteis e grandes, os problemas inerentes a detecção e identificação de soluto têm impedido o progresso na área. As tentativas anteriores para o rastreio de fluidos biológicos por HPLC produziu sucesso limitado, quando as técnicas de detecção foram largamente favorecendo, solutos fluorescentes, ou eletroquimicamente ativas para absorção de UV, sem a disponibilidade de LC-MS para a identificação estrutural. Um histórico dos trabalhos publicados utilizando HPLC é mostrado no gráfico 4.

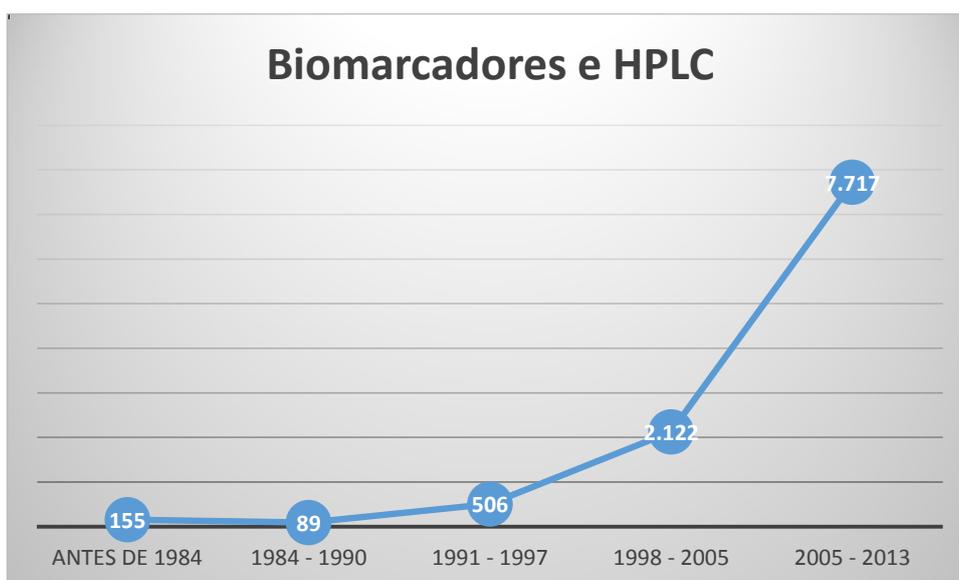


Grafico 4: Número de trabalhos publicados com o termo *biomarker* e *HPLC*. Fonte : Periódicos Capes.

Técnicas semelhantes foram também desenvolvidas para outros fluidos fisiológicos. Com a alta resolução de colunas GC capilar, a disponibilidade de GC-MS para identificação, e as primeiras aplicações de quimiometria para esses perfis complexos (McConnell 1981; Rhodes, 1981), esta parte do campo estava pronto para aplicações biomédicas significativas bem antes da era genômica. Enquanto as anteriores técnicas de amostra de enriquecimento nesta área foram recentemente substituídas por métodos mais quantitativos e versáteis baseados em fibra micro extração (Pawliszyn, 1977) e a barra de agitação com abordagem sortiva (Baltussen, 2002; Soini, 2005), esta área ainda têm significado para os esforços atuais em metabolômica moderna.

O perfil metabólico através de GC- MS de compostos polares derivados, tais como esteroides (Alasandro, 1982) e ácidos urinário (Gates, 1978), foram menos comumente perseguido por laboratórios de pesquisa clínica e biomédica, presumivelmente devido às suas complicações processuais e as dificuldades de interpretação de espectros de massa compostos de derivatizados. Sem dúvida, a interface de ionização por eletrospray (ESI) e assistida por matriz a laser Dissorção-ionização (MALDI). A espectrometria de massas (MS) durante o final da década de 1980 revolucionou o campo da análise biomolecular. Ela tornou possível analisar proteínas intactas , peptídeos, nucleotídeos, glicoconjugados, e outras biomoléculas, dando assim origem aos campos emergentes da proteômica e suas novas subdisciplinas denominados " glicoproteômica", "neuropeptidômica", " lipidômica", etc. melhorias substanciais e graduais em praticamente todos os aspectos da instrumentação MS. Juntamente com as enormes capacidades de hoje para aquisição, processamento e interpretação de dados (bioinformática), a espectrometria de massas contemporânea, especialmente os seus instrumentos com capacidade em tandem (MS/ MS), estão cada vez mais complementando as técnicas de alto desempenho (capilar) de separação que, efetivamente, fracionam e separam as miríades de moléculas biológicas.

Sempre que é necessária uma separação de misturas biológicas complexas, técnicas de separação capilares são quase invariavelmente empregues em virtualmente todas as investigações contemporâneas da biologia de sistemas. Separações capilares na fase condensada tem sua ligação histórica com a evolução dos sistemas de separação miniaturizados em cromatografia (Tsuda, 1978; Novotny, 1983; Borra, 1987) e eletroforese (Jorgenson, 1981) no final de 1970 e início de 1980, seguido pela introdução mais recente de canais de separação microfabricados (Dittrich 2006) e a chamada abordagem analítica " lab-on- a -chip ". Enquanto a cromatografia líquida (LC) com colunas de procedimentos para proteômica e metabolômica

usadas hoje em dia, em sua maioria foram desenvolvidas com base no tipo de pequeno diâmetro desenvolvido por Karlsson e Novotny (Karlsson, 1988) e Kennedy e Jorgenson (Kennedy, 1989), algumas tendências atuais também enfatizam o uso colunas monolíticas (para uma revisão, ver referência (Svec, 2004) e de tamanho de partículas cada vez menores, atualmente em 1 -2 μ m (MacNair, 1997; Patel, 2004). No jargão da proteômica e metabolômica de hoje, é cada vez mais comum ouvir falar de sistemas de "microfluxo " (acima 1 μ l/min) e " nanofluxo " (abaixo de 1 μ l/min), em vez de os próprios tipos de coluna, provavelmente devido à sua ligação com MS. Além das vantagens de eficiência de LC capilar e eletroforese, existem atributos bioquimicamente importantes dos sistemas miniaturizados de separação (Novotny, 1996), tais como a sua compatibilidade com o MS, o aumento da sensibilidade de massa de detectores sensíveis à concentração, melhor inércia para biomoléculas sensíveis, tais como proteínas, durante micro isolação, compatibilidade com pequenas amostras e pequenos objetos biológicos, tais como preparações de dissecação a laser e as células biológicas únicas (Novotny, 1996). Como exemplo da aplicação "state-of-the-art" bioquimicamente importante da década de 1980, demonstra-se na figura 4, um Cromatograma de esteroides plasmático em uma coluna capilar (Gluckman, 1984). E um histórico das publicações sobre biomarcadores utilizando cromatografia capilar é mostrado no gráfico 5.

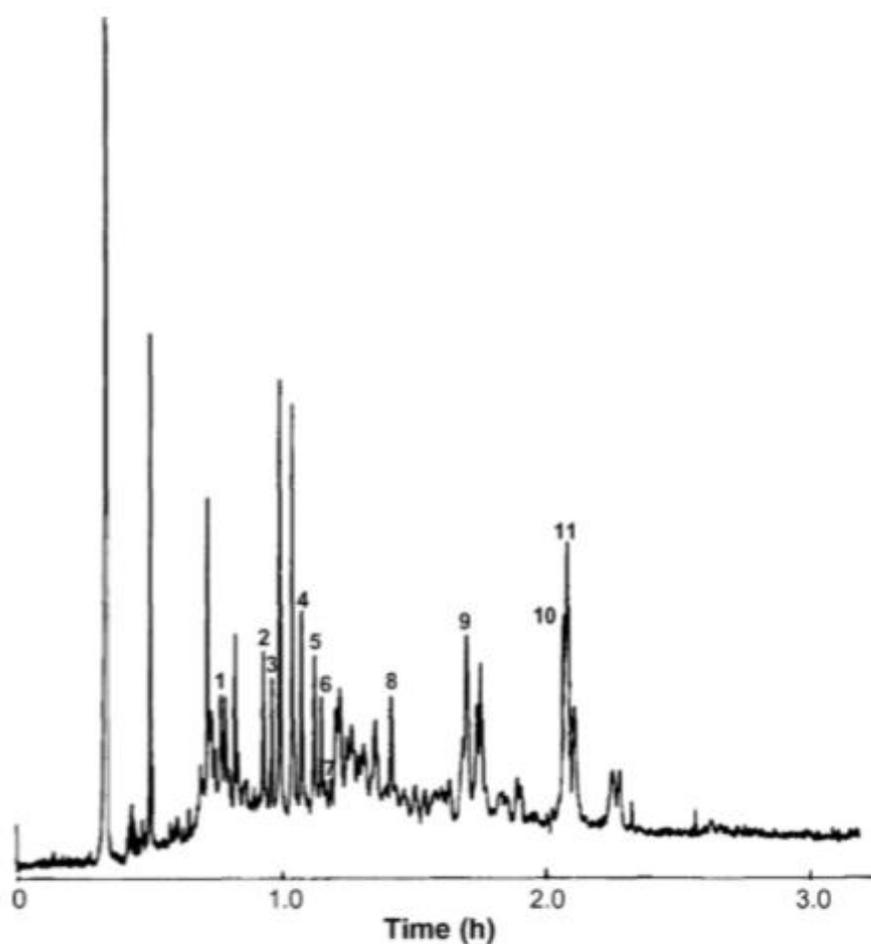


Figura 4: Cromatograma de esteróides plasmáticos. (Gluckman, 1984)

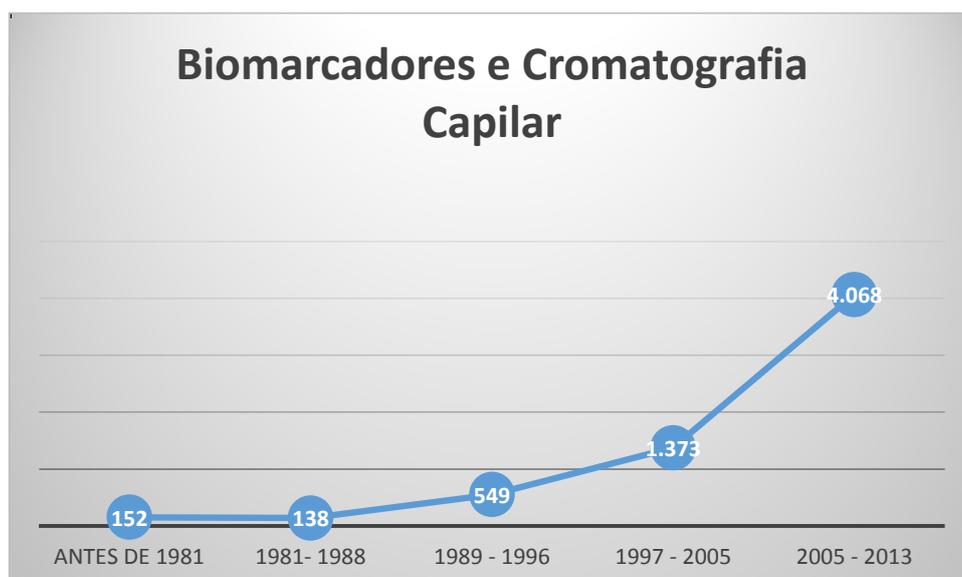


Grafico 5: Número de trabalhos publicados com o termo *biomarker e capillary chromatography*. Fonte : Periódicos Capes

9. LIDANDO COM A COMPLEXIDADE DE DADOS ANALITICOS

9.1 Ferramentas de bioinformática

O sucesso de qualquer abordagem quantitativa baseia-se fortemente no desenvolvimento de ferramentas de bioinformática eficazes confiáveis e de fácil utilização .

Esforços foram investidos pelos pesquisadores quando se trata de proteômica quantitativa com base na análise LC/MS. Aqui, os pesquisadores concentraram seus esforços no desenvolvimento de ferramentas de identificação de proteínas e peptídeos , e não na quantificação de dados adquiridos por LC / MS. Portanto , os pesquisadores individuais, muitas vezes desenvolvem diversas ferramentas de bioinformática , permitindo uma interpretação de dados automatizada e a avaliação dos dados LC / MS e LC / MSMS . Até agora , as ferramentas de bioinformática desenvolvidas para a quantificação de biomarcadores proteômicos adotam uma de duas abordagens: A primeira baseia-se na identificação de peptídeos e proteínas, através da análise LC / MSMS , seguido por quantificação de peptídeos e , subsequentemente , as suas proteínas correspondentes . A segunda abordagem é mais global em sua natureza, com foco na comparação de todos os íons em uma análise LC / MS através de várias ferramentas estatísticas , tais como máquinas de vetor de suporte , árvores de decisão , análise de componentes principais , e algoritmos genéticos. Tais análises resultam na criação de uma lista de ions, permitindo a segregação das duas amostras comparadas, ou conjuntos de amostras. (Dittrich, 2006)

10. CONCLUSÃO

Os maiores desafios de complexidade bioquímica dos sistemas vivos estão sendo gradativamente atendidas através de avanços na química bioanalítica.

A recente disponibilidade de ferramentas genômicas forneceu impulso de olhar para diferentes aspectos da expressão fenotípica, particularmente os proteômas e metabolômas. A expansão bioinformática dos últimos anos é mais um meio essencial para lidar com os enormemente grandes conjuntos de dados gerados através de alta resolução de perfis moleculares. Os bancos de dados e pesquisas têm sido cada vez mais disponíveis para o campo da proteômica, mas os esforços similares em metabolômica ainda estão em sua infância. A Ciência da Separação e espectrometria de massa desempenharam papéis enormes em desvendar os atributos moleculares da vida desde o início dos conceitos de "individualidade bioquímica" e "perfil metabólico", que foram formuladas durante a década de 1960.

A medida que a GC e metodologias baseadas em GC - MS amadureceram agora para a fase de utilização de rotina de forma automatizada, tornam-se ferramentas muito valiosas para a metabolômica e a consequente descoberta de novos biomarcadores, em conjunto com as outras escolhas óbvias, tais como LC - MS e espectroscopia de RMN. Depois de uma lenta taxa de aceitação durante a década de 1980, sistemas miniaturizados (capilares) separações no estado líquido, ou seja, LC capilar e CE, estão se tornando técnicas comuns em praticamente todos os campos referentes a biologia de sistemas. Enquanto as suas capacidades de lidar com biomoléculas, efetivamente em níveis baixos sem precedentes, foram demonstrados anteriormente, foi, sem dúvida, a "revolução MS" do final dos anos 1980 e com a chegada de novas técnicas de ionização que deram as separações em nanoescala seu novo significado. Elas agora estão incorporadas rotineiramente em todas as principais plataformas analíticas em proteômica. A ênfase recente no perfil molecular de materiais biológicos tem sido claramente na melhoria da quantificação. Além de ajudar na descoberta de biomarcadores e futuros usos de diagnóstico / prognóstico, de técnicas de análise biomolecular, metodologias quantitativas confiáveis, sem dúvida, respondendo a muitas perguntas adicionais de futuras pesquisas na biocomplexidade.

11. REFERÊNCIAS

- [1] H. Kitano, **Science** 295 (2002) 1662.
- [2] B. van Ommen, R. Stierum, **Curr. Opin. Biotechnol.** 13 (2002) 517.
- [3] M.N. Morel, J.M. Holland, J. van der Greef, E.W. Maple, C. Clish, J. Loscalzo, S. Naylor, **Mayo Clin. Proc.** 79 (2004) 651.
- [4] J. van der Greef, P. Stroobant, R. van der Heijden, **Curr. Opin. Chem. Biol.** 8 (2004) 559.
- [5] R.J. Williams, *Biochemical Individuality*, Wiley and Sons, **New York**, 1956.
- [6] C.E. Dalglish, E.C. Horning, M.G. Horning, K.L. Knox, K. Yarger, **Biochem. J.** 101 (1966) 792.
- [7] E.C. Horning, M.G. Horning, **Methods Med. Res.** 12 (1970) 369.
- [8] E.C. Horning, M.G. Horning, **J. Chromatogr. Sci.** 9 (1971) 129.
- [9] L. Pauling, A.B. Robinson, R. Teranishi, P. Cary, **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 68 (1971) 2374.

- [10] E. Jellum, **J. Chromatogr.** 143 (1977) 427.
- [11] F. Hutterer, J. Roboz, L. Sarkozi, A. Ruhig, P. Bacchin, **Clin. Chem.** 17 (1971) 789.
- [12] E. Diamandis, Trends Endocrinol. **Metab.** 9 (1998) 310.
- [13] M.K. Brawer, CA Cancer **J. Clin.** 49 (1999) 264.
- [14] L. Glass, M.C. Mackey, From Clocks to Chaos: The Rhythms of Life, Princeton University Press, **Princeton**, New Jersey, 1988.
- [15] J.K. Nicholson, E. Holmes, J.C. Lindon, I.D. Wilson, Nat. **Biotechnol.** 22 (2004) 1268.
- [16] M. Novotny, A. Zlatkis, **J. Chromatogr. Sci.** 8 (1970) 346.
- [17] M. Novotny, A. Zlatkis, **Chromatogr. Rev.** 14 (1971) 1.
- [18] C.D. Pfaffenberger, E.C. Horning, **J. Chromatogr.** 112 (1975) 581.
- [19] M. Novotny, M.L. McConnell, M.L. Lee, R. Farlow, **Clin. Chem.** 20 (1974) 1105.
- [20] M. Novotny, M.P. Maskarinec, A.T.G. Steverink, R. Farlow, **Anal. Chem.** 48 (1976) 468.
- [21] M. Novotny, **Anal. Chem.** 50 (1978) 16A.
- [22] J.K. Nicholson, I.D. Wilson, Prog. **NMR Spectrosc.** 21 (1989) 449.
- [23] J.K. Nicholson, J.C. Lindon, E. Holmes, **Xenobiotica** 29 (1999) 1181.
- [24] H. Pearson, **Nature** 446 (2007) 8.
- [25] M. Novotny, D. Wiesler, in: Z. Deyl (Ed.), Separation Methods: New Comprehensive **Biochemistry**, Elsevier, Amsterdam, 1984, p. 41.
- [26] J.B.M. Drogen, W.J. Rinsma, H.A. van't Klooster, A.C. Tas, J. van der Greef, **J. Chemom.** 1 (1987) 231.
- [27] H.M. Liebich, O. Al-Babbili, A. Zlatkis, K. Kim, **Clin. Chem.** 21 (1975) 1294.
- [28] M.L. McConnell, G. Rhodes, U. Watson, M. Novotny, **J. Chromatogr.** 162
- [29] G. Rhodes, M. Miller, M.L. McConnell, M. Novotny, **Clin. Chem.** 27(1981) 580.
- [30] G. Rhodes, M.L. Holland, D. Wiesler, M. Novotny, S.A. Moore, R.G. Peterson, D.L. Felten, **Experientia** 38 (1982) 75.
- [31] M. Yancey, R. Stuart, D. Wiesler, M. Novotny, **J. Chromatogr.** 382 (1986) 47.
- [32] M. Novotny, M.F. Yancey, R. Stuart, D. Wiesler, R.G. Peterson, **Biochim. Biophys. Acta** 1226 (1994) 145.
- [33] M. Novotny, B. Jemiolo, S. Harvey, D. Wiesler, A. Marchlewska-Koj, **Science** 231 (1986) 722.
- [34] M.V. Novotny, W. Ma, L. Zidek, E. Daev, in: R.E. Johnston, D. Mueller-Schwarze, P. Sorenson (Eds.), Advances in Chemical Communication in Vertebrates, **Kluwer Academic/Plenum Publishers**, New York, 1999, p.99.
- [35] M.V. Novotny, Biochem. **Soc. Trans. (London)** 31 (2003) 117.
- [36] J. Pawliszyn, Solid-Phase Microextraction-Theory and Practice, Wiley, New York, 1997.
- [37] E. Baltussen, C.A. Cramers, P.J.F. Sandra, **Anal. Bioanal. Chem.** 373 (2002) 3.
- [38] H.A. Soini, D. Wiesler, R. Apfelbach, P. Koenig, N.Y. Vasilieva, M.V. Novotny, **J. Chem. Ecol.** 31 (2005) 1125.
- [39] M. Alasandro, D. Wiesler, G. Rhodes, M. Novotny, **Clin. Chim. Acta** 126 (1982) 243.
- [40] S.C. Gates, C.C. Sweeley, W. Krivit, D. DeWitt, B.E. Blaisdell, **Clin. Chem.** 24 (1978) 1680.

- [41] T. Tsuda, M. Novotny, **Anal. Chem.** 50 (1978) 632.
- [42] M. Novotny, M. Alasandro, M. Konishi, **Anal. Chem.** 55 (1983) 2375.
- [43] M. Novotny, K.E. Karlsson, M. Konishi, M. Alasandro, **J. Chromatogr.** 292 (1984) 159.
- [44] M.V. Novotny, D. Ishii, in: M.V. Novotny, D. Ishii (Eds.), *Microcolumn Separations*, **Elsevier**, Amsterdam, 1985.
- [45] C. Borra, S.M. Han, M. Novotny, **J. Chromatogr.** 385 (1987) 75.
- [46] J.W. Jorgenson, K.D. Lukacs, **Anal. Chem.** 53 (1981) 1298.
- [47] P.S. Dittrich, K. Tachikawa, A. Manz, **Anal. Chem.** 78 (2006) 3887.
- [48] S.C. Jacobson, C.T. Culbertson, in: J.P. Kutter, Y. Fintschenko (Eds.), *Separation Methods in Microanalytical Systems*, **CRC Press, Taylor & Francis Group**, Boca Raton, 2006, p. 19.
- [49] K.E. Karlsson, M. Novotny, **Anal. Chem.** 60 (1988) 1662.
- [50] R.T. Kennedy, J.W. Jorgenson, **Anal. Chem.** 61 (1989) 1128.
- [51] F. Svec, **J. Sep. Sci.** 27 (2004) 1419.
- [52] J.E. MacNair, K.C. Lewis, J.W. Jorgenson, **Anal. Chem.** 69 (1997) 983.
- [53] K.D. Patel, A.D. Jerkovich, J.C. Link, J.W. Jorgenson, **Anal. Chem.** 76 (2004) 5777.
- [54] M. Novotny, **Methods Enzymol.** 270 (1996) 103.
- [55] J. Gluckman, D. Shelly, M. Novotny, **J. Chromatogr.** 317 (1984) 443
- [56] Bernard A, Lauwerys R. Assessment of human exposure to chemicals through biological monitoring. In: Kopfler FC, Craun, GF (eds). *Environmental Epidemiology*. Chelsea: **Lewis Publ. Inc.**; 1986. p.17-28.
- [57] World Health Organization – *Biological Monitoring of Chemical Exposure in the Workplace*. Volumes 1 e 2. Geneva; 1996.
- [58] Rüdiger HW. Biomonitoring in occupational medicine. In: Marquart H, Schäfer SG, McClellan R, Welsch F (eds.). **Toxicology**. San Diego: Academic Press; 1999. p.1027-39.
- [59] World Health Organization – *International Programme on Chemical Safety (IPCS) – Environmental Health Criteria 155: Biomarkers and risk assessment: concepts and principles*. Geneva; 1993.
- [60] Lauwerys R.R. – *Industrial Chemical Exposure – Guidelines for Biological Monitoring*. 2^a ed. London: Lewis Publishers; 1993.
- [61] World Health Organization – *International Programme on Chemical Safety (IPCS) – Environmental Health Criteria 210: Principles for the assessment of risks to human health from exposure to chemicals*. Geneva; 1999.
- [62] World Health Organization – *International Programme in Chemical Safety (IPCS) – Environmental Health Criteria 119: Principles and methods for the assessment of nephrotoxicity associated with exposure to chemicals*. Geneva; 1991.
- [63] Roels H et al. Markers of early renal changes induced by industrial pollutants. Applications to workers exposed to cadmium. **Br J Ind Med** 1993; 50: 37-48.
- [64] Yiin SJ, Lin TH, Shih TS. Lipid peroxidation in workers exposed to manganese. **Scand J Work Environ Health** 1996; 22(5): 381-6.
- [65] Huang Y. Lipid peroxidation in workers exposed to hexavalent chromium. **J Toxicol Environ Health A** 1999; 56: 235-47.
- [66] Hemminki K. DNA adducts in biomonitoring. **J Occup Environ Med** 1995; 37: 44-9.

- [67] Manzo L et al. Biochemical markers of neurotoxicity. A review of mechanistic studies and applications. **Human & Experimental Toxicology** 1996; 15(1): 20-35.
- [68] Costa LG. Biochemical and molecular neurotoxicology: relevance to biomarker development, neurotoxicity testing and risk assessment. **Toxicol Lett** 1998; 102-103:417-21.
- [69] Silbergeld EK. Neurochemical approaches to developing biochemical markers of neurotoxicity: review of current status and evaluation of future prospects. **Environ Res** 1993; 63: 274-86.
- [70] Hawkins KA. Occupational neurotoxicology: some neuropsychological issues and challenges. **Journal of Clinical and Experimental Neuropsychology** 1990; 12(5):664-80.
- [71] Johnson BL. Neurobehavioral toxicology in the 21st century: a future or a failure?. **Environ Res** 1993; 62: 114-24.
- [72] Iregren A. Using psychological tests for early detection of neurotoxic effects of low level manganese exposure. **Neurotoxicology** 1994; 15: 671-8.
- [73] Mergler D, Baldwin M. Early manifestations of manganese neurotoxicity in humans: an update. **Environ Res** 1997; 73: 92-100.
- [74] Castoldi A et al. Biomarkers in environmental medicine: alterations of cell signalling as early indicators of neurotoxicity. **Funct Neurol** 1994; 9: 101-9.
- [75] Baldwin M et al. Bioindicator and exposure data for a population based study of manganese. **Neurotoxicology** 1999; 20(2-3): 343-53.
- [76] Smargiassi A, Mutti A. Peripheral biomarkers and exposure to manganese. **Neurotoxicology** 1993; 20(2-3): 401-6.
- [77] Smargiassi A, Mutti A. Selective vulnerability of dopaminergic systems to industrial chemicals: risk assessment of related neuroendocrine changes. **Toxicol Ind Health** 1998; 14(1-2): 311-23.
- [78] Jadhav AL, Ramesh GT. Pb-induces alterations in tyrosine hydroxylase activity in rat brain. **Mol Cell Biochem** 1997; 175: 137-41.
- [79] Akgür AS. Paraoxonase and acetylcholinesterase activities in humans exposed to organophosphorous compounds. **J Toxicol Environ Health A** 1999; 58: 469- 74.