

Análise de dissacarídeos derivados de GAGs via metanólise por CL-EMAR para investigação das mucopolissacaridoses

Clarisse L. Torres¹ (PG), Gustavo R. C. dos Santos¹ (PQ), Fernanda B. Scalco¹ (PQ), Maria Lúcia C. Oliveira¹ (PQ), Rafael Garrett¹ (PQ)*

¹Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro; *rafael_garrett@iq.ufrj.br

Palavras Chave: Mucopolissacaridoses, GAGs, urina, CL-EMAR.

Introdução

As Mucopolissacaridoses (MPSs) são doenças metabólicas hereditárias raras causadas pela deficiência ou ausência de enzimas que catalisam a etapa de degradação dos glicosaminoglicanos (GAGs). Os GAGs são macromoléculas formadas por cadeias de polissacarídeos lineares carregados negativamente, consistindo em unidades de dissacarídeos que se repetem, com níveis variados de sulfatação¹. Dependendo do tipo de MPS, a deficiência de enzimas específicas leva ao acúmulo dos GAGs condroitina sulfato (CS), dermatan sulfato (DS), heparan sulfato (HS) e keratan sulfato (KS) no interior dos lisossomos, resultando em uma série de manifestações clínicas no indivíduo, como displasias esqueléticas, retardamento mental, organomegalia, dentre outras. Os métodos mais sensíveis e acurados para o diagnóstico das MPSs são baseados na análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (CL-EM/EM) dos dissacarídeos derivados dos GAGs em amostras de fluidos biológicos². Neste trabalho, foram avaliadas diferentes condições do processo de metanólise³ para obtenção dos dímeros derivados de CS, DS, KS e HS e posterior monitoramento dos produtos formados por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (CL-EMAR), tendo como objetivo estabelecer um método para ser utilizado na investigação dos diferentes tipos de MPS em urinas de pacientes com suspeita clínica.

Resultados e Discussão

Para as reações de metanólise, foram utilizados os padrões CS, DS, HS e KS, uma urina de paciente previamente diagnosticado com MPS tipo IV e o reagente HCl-metanólico. Os padrões e a urina previamente seca foram transferidos para diferentes tubos de ensaio com tampa de rosca. Após essa etapa, foi adicionado HCl-metanólico (1,25M ou 3M) e os tubos foram fechados, agitados e, em seguida, mantidos em incubadora por diferentes tempos e temperaturas. Posteriormente, o conteúdo foi evaporado e os produtos da reação foram solubilizados em água milli-Q contendo CH₃COONH₄. As soluções foram então analisadas por CL-EMAR usando uma coluna HILIC-Amide (Waters) em equipamento híbrido (Thermo Q-

Exactive Plus) de alta resolução e exatidão em massas. Os cromatogramas de íons extraídos e os perfis de fragmentação monitorados mostraram que foi possível obter e analisar por CL-EMAR os dissacarídeos derivados de CS, DS, HS e KS para todas as condições de metanólise, tanto para os padrões quanto para a urina. A concentração do HCl-metanólico foi a principal variável que controla a formação dos dímeros, além também de influenciar na proporção entre os isômeros formados (figura 1). Diferentemente das análises tradicionais que usam MRM, o uso do PRM permitiu que fosse selecionado o melhor fragmento para a diferenciação dos isômeros. De acordo com os resultados, a condição que mais favorece a formação equilibrada dos dímeros de todos os GAGs é: HCl-metanólico 3M, 65°C e 1h. A amostra de urina nessas condições apresentou uma quantidade expressiva do KS frente aos outros GAGs. Este resultado preliminar corrobora com dados da literatura, que utilizam o KS como biomarcador para a MPSIV.

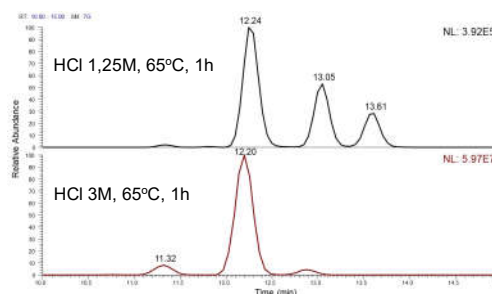


Figura 1. Cromatogramas de íons extraídos pelo m/z 236,11286 para CS após metanólise

Conclusões

O acúmulo e a excreção de determinados tipos de GAGs variam de acordo com o tipo de MPS. A abordagem apresentada neste trabalho, portanto, poderá contribuir para um melhor entendimento do perfil de GAGs acumulados e excretados na urina, podendo ser importante no diagnóstico precoce de pacientes com suspeita de diferentes tipos de MPS.

Agradecimentos

CNPQ, LABEIM-IQ/UFRJ, LADETEC/UFRJ

¹Tomatsu, S. *et al.* *Mol. Genet. Metab.* **2013**,110, 42.

²Kubaski, F. *et al.* *G Mol. Genet. Metab.* **2017**, 120, 67.

³Zhang, H. *et al.* *Curr. Protoc. Hum. Genet.* **2013**, 1.