

## Desenvolvimento de metodologia por CL-EMAR para análise de compostos envolvidos na via de sinalização purinérgica

Palavras Chave: Espectrometria de massas, HILIC, metabólitos polares, PRM.

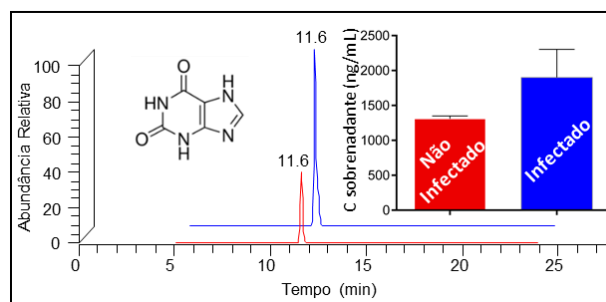
### Introdução

O sistema purinérgico é um sistema de comunicação celular complexo que participa de vários eventos fisiológicos e processos patológicos, desde a manutenção do fluxo sanguíneo até a resposta imune, como nas infecções causadas pela bactéria *Klebsiella pneumoniae*. Moléculas presentes nessa via, como o ATP, ADP, AMP e produtos do seu metabolismo atuam como mensageiros extracelulares e são capazes de sinalizar e mediar efeitos diversos pela ativação de receptores específicos na superfície das células.<sup>1</sup> Logo, a determinação dessas espécies é extremamente importante. Porém, devido às diferentes características físico-químicas dos metabólitos, o desenvolvimento de um método único capaz de analisar todos os envolvidos na via é um desafio. A cromatografia líquida de interação hidrofílica (HILIC) acoplada à espectrometria de massas com ionização por *electrospray* se tornou uma alternativa eficiente para análise de nucleotídeos e nucleosídeos.<sup>2</sup> Portanto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um método simples e eficiente para extração, detecção e quantificação de metabólitos presentes na via de sinalização purinérgica utilizando CL-EMAR. Este método foi aplicado para a análise do sobrenadante de cultura de macrófagos infectados e não infectados pela *K. pneumoniae*.

### Resultados e Discussão

Foram utilizados os padrões de ATP, ADP, AMP, adenosina, inosina, hipoxantina, xantina e ácido úrico para o estabelecimento das melhores condições cromatográficas usando uma coluna de fase polar (HILIC; Waters Xbridge Amide 4,6 mm x 150 mm; 3,5 µm) e das condições do espectrômetro de massas de alta resolução (Thermo QExactive Plus). Foi realizado o experimento de varredura total de íons combinado com o monitoramento de reações paralelas onde os metabólitos alvo foram filtrados individualmente e fragmentados para aumentar a sensibilidade e especificidade da análise. As análises quantitativas foram realizadas através de curvas analíticas em diferentes concentrações para cada padrão. Sobrenadantes de cultura de célula de macrófagos da linhagem THP1 não infectados e infectados pela *K. pneumoniae* em diferentes tempos foram extraídos pelo método de extração líquido-líquido (ELL) em sistema bifásico

(MTBE/MeOH/H<sub>2</sub>O 2,6:2,0:2,4 (v:v:v))<sup>3</sup> e por um método direto (*dilute-and-shoot*). A extração bifásica se mostrou mais eficiente na recuperação dos analitos de interesse, além de diminuir a quantidade de interferentes nas amostras. Foram identificados e quantificados inosina, hipoxantina, ácido úrico e xantina (**Figura 1**) nas amostras contendo macrófagos infectados por *K. pneumoniae* em concentrações diferentes das amostras controle, sugerindo que a infecção modula os níveis destas moléculas.



**Figura 1:** Cromatogramas de íons extraídos e quantificação da xantina (ng/mL) nos meios não infectado e infectado por *K. pneumoniae*.

### Conclusões

Foi desenvolvido um método por CL-EMAR usando coluna HILIC para determinação de diferentes metabólitos envolvidos na via de sinalização purinérgica em meio de cultura de célula de macrófagos infectados e não infectados por *K. pneumoniae*. Foram avaliados dois métodos de extração dos metabólitos de interesse e a ELL com sistema bifásico mostrou-se mais eficiente. Os resultados preliminares sugerem que a via de metabolização da adenosina está sendo direcionada para a formação do ácido úrico. O método está sendo ampliado para análise de novos metabólitos e visa contribuir também para o estudo de outras vias de sinalização.

### Agradecimentos

BRASIL (CNPq) – código de financiamento 132818/2019-1; PGQu-UFRJ, LADETEC-IQ/UFRJ

<sup>1</sup>Burnstock, G. The Keio Journal of Medicine, **2013**, 62, 63-67.

<sup>2</sup>King, A.M. et al *Metabolomics* **2019**, 15, 17.

<sup>3</sup>Sostare, J. et al. *Anal. Chim. Acta* **2018**, 1037, 301-315.