REVISTA SAÚDE DOS VALES

ISSN: 2674-8584 V.6 – N.1 – 2023

DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS OU MARCADORES RELACIONADOS À ALERGIA EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS POR LC-MS: UMA REVISÃO

DETERMINATION OF ALLERGY-RELATED PROTEINS OR MARKERS IN BIOLOGICAL SAMPLES BY LC-MS: A REVIEW

Allyne Aparecida Dias da Silva Castro
Docente - Faculdade AlfaUnipac – Teófilo Otoni/MG
Doutoranda em Ciências da Saúde (UFVJM)
Mestra em Tecnologia, Ambiente e Sociedade (UFVJM)
Especialista em Gestão na Saúde
Especialista em Acupuntura e Eletroacupuntura
Especialista em Formação Pedagógica em Educação na Área de Saúde
Enfermeira
e-mail: professoraallynedias@gmail.com

Luiz Gustavo Saboya de Castro Mota
Mestrando em Tecnologia, Ambiente e Sociedade (UFVJM)
Especialista em Direito Constitucional e Gestão Pública
Advogado
e-mail: castro.gustavo@ufvjm.edu.br

Manuella Botelho Laure Nogueira
Docente da Faculdade AlfaUnipac – Teófilo Otoni/MG
Mestra em Tecnologia Ambiente e Sociedade (UFVJM)
Enfermeira, Especialista em Vigilância em Saúde e Gestão Hospitalar,
Especialista em Gestão de Saúde Pública com ênfase em PSF
e- mail: manuellabotelholaure@yahoo.com.br

Jonatas Batista Hamiden
Docente de Enfermagem - Faculdade AlfaUnipac, Teófilo Otoni/MG
Especialista em Saúde Mental e Psiquiatria,
Formação Pedagógica em Ciências Biológicas
Enfermeiro
e-mail: enfhamiden@gmail.com

REVISTA SAÚDE DOS VALES

RESUMO

Objetivo: O presente trabalho teve como objetivo realizar uma revisão de literatura sobre os marcadores relacionados à alergia, focando principalmente em amostras biológicas. Método: Foi realizada uma revisão de literatura, onde as bases consultadas foram, PubMed, Elsevier, SciELO e ScienceDirect. Resultados: Os alérgenos podem provocar hipersensibilidade em pessoas suscetíveis e desenvolver reações alérgicas. A identificação e monitoramento destes alérgenos tem cada vez mais se tornado referência nas indústrias alimentícias. Os métodos analíticos atuam de forma efetiva na análise de proteínas em amostras biológicas. O sistema de Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas (LC/MS) mostrou-se satisfatório qualitativamente e quantitativamente até em pequenas quantidades de amostra. Investimentos na identificação de rotulagem efetiva e a identificação de alérgenos poderá salvar vidas.

Palavras - Chave: alergia, alimentos, proteínas, saúde, método.

ABSTRACT

Determination of allergy-related proteins or markers in biological samples by LC-MS: a review

Objective: The present study aimed to conduct a literature review on allergy-related markers, focusing mainly on biological samples. Method: A literature review was carried out, where the bases consulted were PubMed, Elsevier, SciELO and ScienceDirect.

Results: Allergens can cause hypersensitivity in susceptible people and develop allergic reactions. The identification and monitoring of these allergens has increasingly become a reference in the food industries. Investments in the identification of effective labeling and the analytical methods work effectively in the analysis of proteins in biological samples. The Liquid Chromatography system coupled to Mass Spectrometry (LC / MS) proved to be satisfactory qualitatively and quantitatively even in a small amount of sample. Identifying allergens could save lives.

Keywords: allergy, food, protein, health, method

INTRODUÇÃO

A alergia alimentar consiste na reação adversa do organismo decorrente de uma resposta imunológica imediata frente a uma variedade de antígenos em determinados alimentos, exceto para indivíduos atópicos (geneticamente predispostos a desenvolver alergia). Os alérgenos alimentares são classificados como componentes específicos de um alimento ou ingredientes que possam compô-lo, sendo eles os mais comuns, as proteínas. [15,19]

As proteínas exercem importantes papéis no sistema biológico como: catálise enzimática, transporte e armazenamento, proteção imunológica e controle

do crescimento. São compostas por unidades estruturais básicas de aminoácidos e sintetizadas nos ribossomos.[2] São onipresentes e contribuem para as características tecnofuncionais de diversos alimentos, além de servirem como nutrientes. No entanto, algumas proteínas comuns e peptídeos são alérgenos e sua presença e mecanismos imunológicos podem induzir uma resposta aguda em indivíduos sensibilizados / alérgicos. Os alimentos alérgicos incluem alimentos de plantas e animais, como amendoim, nozes, trigo, soja, leite de vaca, ovos, peixes e crustáceos. [12,13]

A alergia alimentar é uma reação adversa mediada por IgE a certos alimentos proteínas. Anticorpos IgE séricos específicos apresentam papel fundamental nas alergias alimentares IgE-mediadas.[9] A IgE é produzida pela interação de vários tipos celulares após a exposição a antígenos, seja por via inalatória, cutânea ou parenteral. Uma vez acoplado às células apresentadoras de antígenos, o antígeno é processado e apresentado aos linfócitos T auxiliares (TH2), que, pela liberação de citocinas específicas, levam linfócitos B produtores de IgE à proliferação. As moléculas de IgE ligam-se a determinadas células, como mastócitos teciduais e basófilos, criando um estado de sensibilização. Exposições posteriores ao mesmo antígeno acarretam a ligação cruzada de IgE (mastócitos/basófilos e epítopos do alérgeno), aumento do influxo de cálcio intracelular e liberação de mediadores pré-formados (histamina, proteases) e neo-formados (leucotrienos, prostaglandinas). Esses mediadores induzem às alterações fisiológicas e anatômicas que caracterizam os sintomas alérgicos. [7]

ASPECTOS RELACIONADOS À SAÚDE

A prevalência de alergia alimentar no Brasil e no mundo vem aumentando rapidamente nas últimas décadas. O aumento dos casos sugere que além do fator genético, o fator ambiental seja determinante para desenvolver-se a doença. [4] Tem se tornado um problema crescente de saúde pública em muitos países e podem ser desencadeadas por qualquer alimento. [19]

Contudo, existe uma considerável heterogeneidade nas estimativas de prevalência das reações alérgicas aos alimentos, o que pode ser devido a diferenças de metodologia de diagnóstico ou devido a diferenças entre populações. [6]

Os sintomas ocorrem imediatamente e podem ser diversos, a reação mais grave é anafilaxia. Sintomas menos graves afetam a boca, o intestino, a pele e o trato respiratório. Até agora, mais que 160 alimentos mostraram provocar reações alérgicas. Contudo, apenas alguns deles respondem por mais de 90% de todas as alergias alimentares. Em até 8% das crianças, o leite de vaca e o ovo são considerados os alimentos mais alérgicos, cerca de 2% dos adultos são afetados, apresentando uma alta frequência de alergia a frutos do mar.[9,19]

A legislação brasileira referente a rotulagem de alimentos vem sendo alterada com intuito de facilitar a compreensão das informações contidas nos rótulos dos alimentos, auxiliando assim o consumidor a realizar escolhas alimentares mais conscientes, além de colaborar com a divulgação dos ingredientes que compõe os produtos; a declaração da tabela de informação nutricional é obrigatória nos rótulos dos alimentos embalados na ausência dos consumidores, incluindo as bebidas, os

ingredientes, os aditivos alimentares, conforme preconização da normatização da ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária[21].

Considerando o fato de que atualmente não há cura para as alergias alimentares, os pacientes podem contar com dois mecanismos disponíveis para minimizar a ocorrência desse evento, são eles: a análise (leitura prévia antes da aquisição) da rotulagem dos alimentos para evitar os alérgenos [21]; e a utilização de métodos analíticos que sejam sensíveis e precisos o suficiente para rastrear a presença de múltiplos alérgenos em produtos alimentícios. [12]

COLETA E EXTRAÇÃO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS

A espectrometria de massa por cromatografia líquida (LC / MS) é realizadas em tipos de amostra que são termicamente instáveis, grandes, polares, iônicos ou não voláteis, ou que precisam ser derivatizados. Amostras LC / MS típicas incluem nucleotídeos, peptídeos, esteroides, hormônios, corantes, ácidos graxos e álcoois. Como resultado, LC / MS é preferencialmente usado em farmacocinética, proteômica, metabolômica, lipidômica e desenvolvimento de drogas. A cromatografia líquida é usada primeira para separar os componentes da amostra para que suas formas relativamente purificadas possam ser introduzidas no espectrômetro de massa. A ionização por eletrospray (ESI) ou ionização química de pressão atmosférica (APCI) é normalmente aplicada para gerar íons carregados da amostra, e são esses íons que passam para o analisador de massa. A identidade do íon alvo é determinada comparando sua relação massa: carga (m / z) com um banco de dados espectral, como MassBank, METLIN e mzCloud. preparação total da amostra de LC / MS deve levar em consideração tanto a fase móvel (contendo o analito) quanto a fase estacionária (material de embalagem ou suporte). Os componentes da matriz solúveis e insolúveis também devem ser considerados e se eles podem interferir na eluição final do analito da coluna. [18]

O preparo de amostra é parte crucial do procedimento analítico, pois reduz os interferentes que podem comprometer a seletividade e sensibilidade ao analito de interesse na matriz biológica. Nas análises toxicológicas forenses, por exemplo, o aperfeiçoamento de métodos tradicionais para extração de drogas de abuso em amostras biológicas é de extrema importância para otimização da análise. A precipitação proteica é uma técnica de preparo de amostra simples e rápida. Consiste na desnaturação de proteínas (perda de estrutura terciária) presentes na matriz por adição de agentes precipitantes (ácido ou base fortes, temperatura, ou solventes orgânicos, como acetonitrila, metanol). Após adição do agente a amostra é submetida à agitação e centrifugação, possibilitando a separação do precipitado proteico e o sobrenadante, utilizado para análise toxicológica. Nesse processo não ocorre a extração ou pré-concentração da amostra, consistindo na separação da ligação do analito em questão (droga, metabólito ou biomarcador) com a proteína. [3]

IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO

Um biomarcador é um sinal físico ou medida laboratorial que pode servir como um indicador de um processo biológico ou como resposta a uma intervenção

farmacológica. Idealmente, ele deve possuir relevância clínica, indicando clara relação entre eventos patofisiológicos na desordem, alta sensibilidade e especificidade, confiabilidade, reprodutibilidade, simplicidade na coleta de amostras e técnica de mensuração que promove a difusão do uso. [8]

No campo da segurança alimentar, a alergia alimentar é uma questão importante, devido aos perigos para as pessoas afetadas e aos requisitos de higiene e regulamentos legais impostos à indústria alimentar. A proteção ao consumidor e a aplicação da lei requerem técnicas analíticas adequadas para a detecção de alérgenos em alimentos. Os métodos imunológicos são atualmente preferidos; no entanto, alternativas confirmatórias são necessárias, pois, os métodos usados para determinar a alergenicidade de um alimento estão diretamente relacionados a estrutura molecular, integridade e atividade fisiológica dos alérgenos alimentares e dos epítopos. A determinação de proteínas alergênicas por cromatografia líquida e espectrometria de massa (LC/MS) avançou muito nos últimos anos. [1,5]

O método a LC-MS está cada vez mais atraindo a atenção, por possuir alta especificidade e sensibilidade, podendo ser aplicável em alimentos processados ou crus, detectando alérgenos simultaneamente. [14]

LC é a técnica de separação de escolha para moléculas maiores e não voláteis, como proteínas e peptídeos complexos. Quando combinado com MS, LC-MS oferece ampla cobertura de amostra porque diferentes químicas de coluna como cromatografia líquida de fase reversa, podem ser usadas. LC também é um método ideal para separar isômeros, que têm a mesma massa e, de outra forma, não serão diferenciados (isto é, resolvidos) por um espectrômetro de massa. Na verdade, devido ao seu poder de resolução superior e ampla faixa de massa, o LC substituiu amplamente a eletroforese em gel para a separação molecular. Finalmente, LC ajuda a reduzir a supressão de íons, que ocorre quando as moléculas interagem entre si e impedem o processo de ionização completa. [18]

A análise proteômica geralmente envolve a análise simultânea medição de milhares de proteínas de uma matriz complexa biológica. [16]

A proteômica se utiliza dados de espectrometria de massas inerentes a peptídeos para identificar proteínas em bancos de dados. Para tal fim, dois tipos de resultados são usados. O primeiro usa a informação relativa à massa molecular dos peptídeos oriundos da digestão enzimática (Peptide Mass Fingerprint – PMF), enquanto o segundo faz uso de resultados obtidos pela fragmentação de peptídeos individuais previamente detectados. [17]

A identificação de proteínas envolve clivagem de proteínas com proteases, na maioria dos casos com tripsina. Devido à especificidade desta protease, os peptídeos gerados normalmente possuem grupos básicos nas extremidades carboxi- ou amino-terminal. Esta clivagem resulta em uma grande proporção de íons duplamente carregados positivamente que são mais facilmente fragmentados. A digestão da proteína é seguida da detecção de peptídeos segundo a sua relação massa/carga (m/z) seja na sua forma intacta, gerando íons com um ou mais cargas, ou na forma de fragmentos através da fragmentação do peptídeo na câmara de colisão. A diferença de massa entre os picos é usada para reconstruir a sequência de aminoácidos (estrutura primária) do peptídeo. [21]

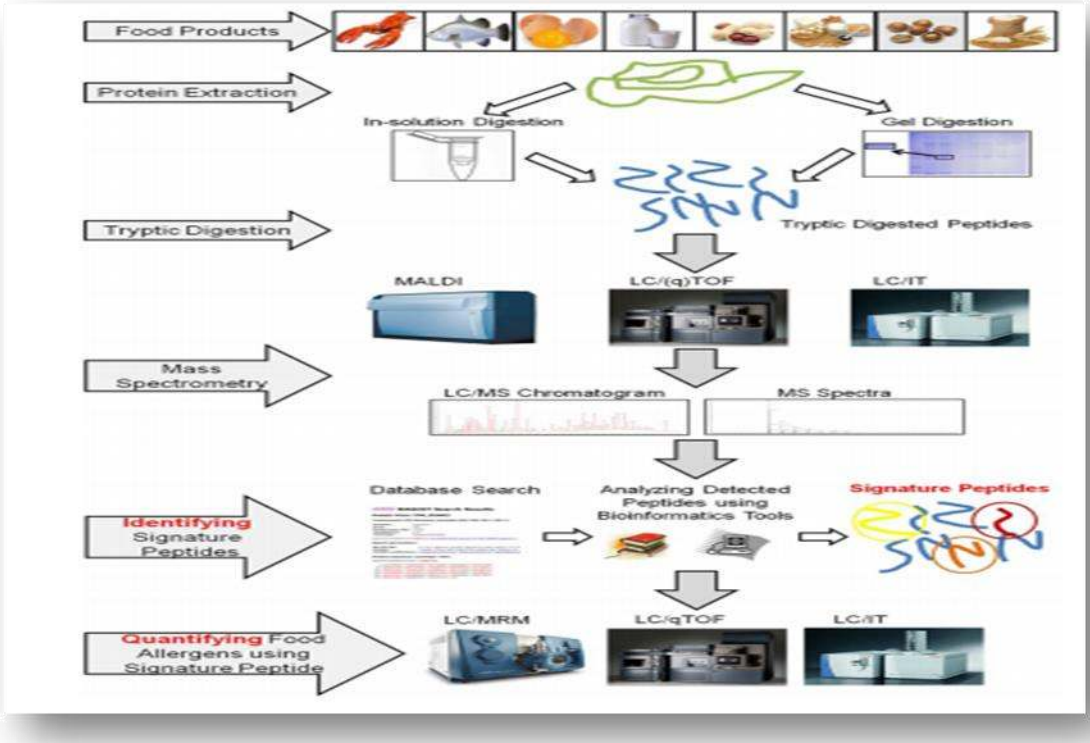

Figura 1: Identidade de peptídeo de assinatura e fluxo de trabalho de caracterização para detecção e quantificação de alérgenos alimentares. [10]

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo teve sua importância pessoal como também profissional, pois, reúne informações acerca de um assunto relevante a toda sociedade. Às indústrias,

pesquisadores e usuários finais estão envolvidos na procura e identificação de alimentos saudáveis e que seu consumo não cause prejuízos.

O monitoramento dos produtos alimentícios tem cada vez mais aumentado, devido à incidência de pessoas apresentando reação de hipersensibilidade a alguns produtos. Os alérgenos podem ser extremamente perigosos, pode vir acompanhados de sintomas leves, assim como também, anafilaxia.

A legislação brasileira tem sido alterada para facilitar a compreensão das informações nutricionais presentes nos rótulos dos alimentos, de forma a auxiliar o consumidor em escolhas alimentares, observa-se recomendações para as empresas alimentícias para realizar investimentos em recursos visuais nas embalagens com intuito de aumentar a legibilidade dessas informações.

A detecção de alérgenos através do método LC/MS apresentou potencial eficácia dentre outras técnicas laboratoriais utilizadas para análise de proteínas em uma amostra.

REFERÊNCIAS

1. Aalberse, RC. Structural biology of allergens. J Allergy Clin Immunol, v.106, p.228-238.2000.

2. Bicudo, RC. Avaliação de sistemas de cromatografia liquida uni e bidimensional acoplados a espectrometria de massas na análise do proteoma dos corpos protéicos do milho. Tese. São Carlos, SP. 2007.

3. Bordin DCM, et al. Técnicas de preparo de amostras biológicas com interesse forense. Scientia Chromatographica 2015; 7(2):125-143 Instituto Internacional de Cromatografia. http://dx.doi.org/10.4322/sc.2015.022

4. Carvalho E; Silva LR; Ferreira CT. Gastroenterologia e Nutrição em Pediatria, 2012. Vol 1, 267-315

5. Christiane Fæste, C. K., Rønning, H. T., Christians, U., & Granum, P. E. (2011). Liquid chromatography and mass spectrometry in food allergen detection. Journal of food protection, 74(2), 316–345. https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-10-336. Disponível em http://meridian.allenpress.com/jfp/article-pdf/74/2/316/1684523/0362-028x_jfp-10-336.pdf Acesso: 13/12/2020

6. Castro, VAOT. Análise Comparativa de mapas protéicos de amostras de soja convencionais e tolerantes ao herbicida glifosato visando à inocuidade alimentar. Tese. USP. SP. 2009. Disponível em:

https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9131/tde-02022010-134832/publico/Tese.pdf Acesso: 13/12/2020

7. Cocco, Renata Rodrigues, Camelo-Nunes, Inês Cristina, Pastorino, Antonio Carlos, Silva, Luciana, Sarni, Roseli Oselka S., Rosário Filho, Nelson Augusto, & Solé, Dirceu. (2007). Abordagem laboratorial no diagnóstico da alergia alimentar. *Revista Paulista de Pediatria*, *25*(3), 258-265. https://doi.org/10.1590/S0103-05822007000300011

8. Diamant, Z. et al. Biomarkers in asthma and allergic rhinitis. Pulm Pharmacol Ther., v. 23, n. 6, p. 468-481, 2010.

9. Heick J., M. Fischer, B. Pöpping, First screening method for the simultaneous detection of seven allergens by liquid chromatography mass spectrometry, Journal of Chromatography A, Volume 1218, Issue 7, 2011, Pages 938-943, ISSN 0021-9673, https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.12.067.

10. Koeberl M et al. Next Generation of Food Allergen Quantification Using Mass Spectrometric Systems. J. Proteome Res. 2014. https://doi.org/10.1021/pr500247r

11. Mari, A., C. Rasi, P. Palazzo, and E. Scala. 2009. Allergen databases: current status and perspectives. Curr. Allergy Asthma Rep. 9:376–383.

12. New, L. S., Schreiber, A., Stahl-Zeng, J., & Liu, H. F. (2018). Simultaneous Analysis of Multiple Allergens in Food Products by LC-MS/MS. Journal of AOAC International, 101(1), 132–145. https://doi.org/10.5740/jaoacint.17-0403

13. Okolie,C.L., A.N.A. Aryee, C.C. Udenigwe, 14 - Detection and deactivation of allergens in food, Editor(s): Rickey Y. Yada, In Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, Proteins in Food Processing (Second Edition), Woodhead Publishing, 2018, Pages 367-387, ISBN 9780081007228, https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100722-8.00015-2. (http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780081007228000152)

14. Planque M. et al. Advances in ultra-high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry for sensitive detection of several food allergens in complex and processed foodstuffs. Journal of Chromatography. Elsevier. 2016.

15. Rayane Louise Fernandes Silva. Alergias alimentares: uma revisão integrativa com foco sobre as proteínas do leite e do ovo. Trabalho de conclusão de curso.

UFRN.2016. Disponível em: https://monografias.ufrn.br/jspui/bitstream/123456789/3399/1/AlergiasAlimentaresrevis%C3%A3o_2016_Trabalho%20de%20Conclus%C3%A3o%20de%20Curso Acesso: 12/11/2020

16. Sadygov, R. G.; Cociorva, D.; Yates, J. R.; *Nature Methods* **2004**, *1*, 195.

17. Shi, Y., R. Xiang, C. Horva´th, and J. A. Wilkins. 2004. The role of liquid chromatography in proteomics. J. Chromatogr. A 1053:27–36

18. Svec F, Huber CG. Materiais Monolíticos de 2006 : Promessas, Desafios, Conquistas. Anal Chem 78 (7): 2100–2107. Thermo Fischer Scientific. Disponível em: https://www.thermofisher.com/br/en/home/industrial/mass-spectrometry/mass-spectrometry-learning-center/liquid-chromatography-mass-spectrometry-lc-ms-information/lc-ms-sample-preparation.html Acesso: 14/12/2020

19. Ventura, Anne Karoline Rocha Medrado. Identificação de proteínas IgE- reativas do camarão sete-barbas (Xiphopenaeus kroyeri). 2018. Dissertação (Mestrado em Alergia e Imunopatologia) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018. doi:10.11606/D.5.2018.tde-13062018-081359. Acesso em: 2020-12-13

20. Wilson & Walker. Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology, Pág, 381. 7ed.

21. BRASIL. Resolução RDC Nº 429, DE 8 DE OUTUBRO DE 2020. Dispõe sobre a rotulagem nutricional dos alimentos embalados. Orgão emissor: ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <legis.anvisa.gov.br/leisref/public>. Acesso em 09/09/2023.