UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Uso da cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à
espectrometria de massas sequencial para determinação do perfil
de eicosanoides em plasma após estimulação: comparação entre
pacientes com anemia falciforme e indivíduos saudáveis**

Alyne Fávero Galvão Meirelles

**Ribeirão Preto
2016**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Uso da cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à
espectrometria de massas sequencial para determinação do perfil
de eicosanoides em plasma após estimulação: comparação entre
pacientes com anemia falciforme e indivíduos saudáveis**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Biociências
Aplicadas à Farmácia para obtenção do
Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biociências

Aplicadas à Farmácia

Orientada: Alyne Fávero Galvão Meirelles

Orientadora: Profa. Dra. Lúcia Helena
Faccioli

RIBEIRÃO PRETO

2016

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Meirelles, Alyne Fávero Galvão

Uso da cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial para determinação do perfil de eicosanoides em plasma após estimulação: comparação entre pacientes com anemia falciforme e indivíduos saudáveis. 84 p.: il. 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Faccioli, Lúcia Helena

1. Eicosanoides; 2. Lipidoma; 3. HPLC-MS/MS; 4. Plasma humano; 5. Lipidoma; 6. Estimulação de sangue total; 7. Anemia Falciforme; 8. Hidroxiureia; 9. Transfusão sanguínea

FOLHA DE APROVAÇÃO

Alyne Fávero Galvão Meirelles

Uso da cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial para determinação do perfil de eicosanoides em plasma após estimulação: comparação entre pacientes com anemia falciforme e indivíduos saudáveis

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Biociências
Aplicadas à Farmácia para obtenção do
Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biociências
Aplicadas à Farmácia

Orientadora: Profa. Dra. Lúcia Helena
Faccioli

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

**APOIO FINANCEIRO: FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE
SÃO PAULO (FAPESP), PROCESSO 2014/07125-6 e CONSELHO NACIONAL DE
DESENVOLVIMENTO À PESQUISA, PROCESSO 443560/2014-5.**

Dedico este trabalho

Aos meus pais Suzinei e Luís, pelo amor, incentivo e dedicação em me proporcionar o melhor...

À minha irmã Gabriela, por todo carinho e admiração...

Ao meu esposo Franklin, por todo companheirismo e amor.

Agradecimentos

À Profª. Drª. Lúcia Helena Faccioli, minha chefe imediata e orientadora, minha imensurável gratidão pela oportunidade de realizar este trabalho e pelos ensinamentos.

À Dra. Tânia Petta pela colaboração e discussões em todas as etapas deste trabalho, principalmente nas que envolveram a Espectrometria de Massas.

Ao prof. Dr. Nicolas Flamand, pela colaboração na padronização de algumas etapas experimentais e na redação do artigo científico.

Ao Prof. Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes pelas discussões e auxílio nas etapas analíticas do projeto.

Às funiconárias Cláudia Helena Perone e Ana Paula Zueli Barião, do Laboratório de Análises Clínicas da FCFRP-USP, pela realização dos hemogramas dos voluntários sadios.

À profa. Drª. Fabiani Gai Frantz pelo apoio e disponibilidade em sempre ajudar.

Às profas Drª. Belinda Simões Pinto e Drª. Kelen Cristina Ribeiro Malmegrin pela parceria no estudo dos pacientes com anemia falciforme, e à Ms. Luciana Ribeiro Jarduli pelo auxílio na coleta de amostras e dados dos pacientes.

Aos amigos, Ms. Caroline Fontanari, Dr. Carlos Artério Sorgi, Fabiana Rosetto de Moraes e Drª. Elyara Maria Soares, pelo apoio durante o desenvolvimento do trabalho e pelos ótimos momentos de convivência.

Aos colegas do Laboratório de Imunologia e Inflamação das Parasitoses (LIIP) e do Laboratório de Imunologia e Epigenética (LIME) pela compreensão e pela convivência diária.

Aos voluntários do estudo, pela paciência e compreensão em participar do trabalho.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, em especial ao Henrique Theodoro, pela prestatividade.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho.

“O conhecimento nos faz responsáveis”

Che Guevara

RESUMO

MEIRELLES, A.F.G. **Uso da cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial para determinação do perfil de eicosanoides em sangue periférico total após estimulação: comparação entre pacientes com anemia falciforme e indivíduos saudáveis.** 2016. 101f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Os eicosanoides, produtos do metabolismo do ácido araquidônico, apresentam papel importante na homeostasia e na patogênese de diversas doenças humanas. A biossíntese desses compostos pode ser estimulada por agentes farmacológicos como ionóforos e inibidores da Ca^{2+} -ATPase, e também por agonistas naturais como o formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP). Considerando os interesses em avaliar e comparar o perfil de mediadores lipídicos, como os leucotrienos (LTs), as prostaglandinas (PGs), os ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs), os ácidos dihidroxitetraenoicos (DiHETEs) e os ácidos hidroxieicosatetraenoicos (HETEs), na saúde e na doença, o objetivo deste trabalho foi padronizar um método analítico para determinar do perfil de eicosanoides em plasma humano após estimulação do sangue total, e assim observar diferenças entre indivíduos saudáveis e doentes. Dessa forma, um método por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (HPLC-MS/MS) foi validado para quantificação de 22 eicosanoides em plasma de indivíduos saudáveis. A análise por HPLC-MS/MS foi realizada em modo negativo pelo modo de varredura por monitoramento de reações múltiplas (MRM). A linearidade do método apresentou coeficiente de correlação (r) maior que 0,98 para todos os eicosanoides analisados. A precisão e exatidão intra e inter-ensaios tiveram desvio padrão e erro relativo menores que 15%, exceto para o limite inferior de quantificação cujos valores foram menores que 20%. Para estimulação das células do sangue total, quatro estímulos (fMLP, ionomicina, A23187 e tapsigargina) foram utilizados. A análise estatística mostrou que o A23187 e a tapsigargina foram os estímulos mais potentes na indução da produção de eicosanoides. Em seguida, comparamos o perfil de eicosanoides em amostras de plasma de indivíduos saudáveis com pacientes com anemia falciforme (AF), em tratamento com hidroxiureia (HU) ou transfusão sanguínea crônica. Os resultados demonstraram que o método é preciso para determinação de diferenças entre os pacientes e indivíduos saudáveis quanto à produção dos mediadores lipídicos 5-HETE, 12-HETE, LTB_4 , LTE_4 , TXB_2 e PGE_2 . Portanto, nosso método analítico é sensível, específico e reprodutível para identificar e quantificar diferenças no perfil de eicosanoides em amostras de sangue estimuladas *in vitro*, e poderá contribuir para o estabelecimento do perfil de mediadores lipídicos em diferentes doenças inflamatórias e infecciosas.

Palavras-chave: Eicosanoides, validação de método, HPLC-MS/MS, Plasma humano, Lipidoma, Estimulação de sangue total, Anemia Falciforme (AF), Hidroxiureia (HU), Transfusão sanguínea.

ABSTRACT

MEIRELLES, A.F.G. **High performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry to investigate eicosanoid profile in peripheral blood after stimulation: comparison between sickle cell anemia patients with healthy individuals.** 2016. 101f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Eicosanoids, products from arachidonic acid metabolism, play an important role in the homeostasis and in the pathogenesis of various human diseases. Pharmacological agents such as Ca^{2+} ionophores and Ca^{2+} -ATPase inhibitors, as well as natural agonists such as fMet-leu-Phe (fMLP) can stimulate eicosanoid biosynthesis. Considering the interests in evaluate and compare the profile of lipid mediators, as leukotriens (LTs), prostaglandins (PGs), epoxyeicosatrienoic acids (EETs), dihydroxytetraenoic acids (DiHETEs) and hydroxyeicosatetraenoic acids (HETEs), in healthy and disease, the aim of this work was to standardize a method to determine the eicosanoid profile of human plasma samples after whole blood stimulation, and to assess differences between healthy and sick individuals. For this purpose, a liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method was validated for the quantification of 22 eicosanoids using human plasma from healthy volunteers. In addition, we optimized a method for the stimulation of eicosanoids in human whole blood. LC-MS/MS analyses were performed by negative electrospray ionization and multiple reaction monitoring. An assumption of linearity resulted in a regression coefficient ≥ 0.98 for all eicosanoids tested. The mean intra-assay and inter-assay accuracy and precision values had relative standard deviations and relative errors of $\leq 15\%$, except for the lower limit of quantification, where these values were $\leq 20\%$. For whole blood stimulation, four stimuli (fMLP, ionomycin, A23187, and thapsigargin) were used. Results of the statistical analysis showed that A23187 and thapsigargin were potent stimuli to induce the production of eicosanoids. We next compared the eicosanoid profiles of healthy volunteers to those of patients with sickle cell anemia (SCA) under treatment with hydroxyurea (HU) or after chronic red blood cell (RBC) transfusion. The results indicate that the method was sufficient to find a difference between lipid mediators released in whole blood of SCA patients compared to healthy subjects for 5-HETE, 12-HETE, LTB_4 , LTE_4 , TXB_2 , and PGE_2 . In conclusion, our analytical method is sensitive, specific and reproducible for indentify and quantify changes in eicosanoid profiles in whole blood stimulated in vitro, which can contribute to establishing the eicosanoid profiles associated with different inflammatory and infectious diseases.

Keywords: Eicosanoids, Method validation, HPLC-MS/MS, Human plasma, Lipidome, Whole blood stimulation, Sickle cell anemia (SCA), Hydroxyurea (HU), Chronic red blood cell (RBC) transfusion

RESUMEN

MEIRELLES, A.F.G. **El uso de la cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas en tándem para determinar el perfil de los eicosanoides en el sangre periférica entera después de la estimulación: comparación entre los pacientes con enfermedad de células falciformes y sujetos sanos.** 101f. Disertación (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Los eicosanoides, productos del metabolismo del ácido araquidónico, tienen un papel importante en la homeostasis y en la patogénesis de varias enfermedades humanas. La biosíntesis de estos compuestos podría ser mejorada por agentes farmacológicos tales como ionóforos y Ca^{2+} - ATPasa y también inhibidores de agonistas naturales tales como formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP). Teniendo en cuenta el interés en evaluar y comparar el perfil de los mediadores lipídicos tales como leucotrienos (LT), prostaglandinas (PGs), los ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs), los dihidroxitetraenoicos ácidos (DiHETEs) y ácidos hidroxieicosatetraenoico (HETE), en la salud y en la enfermedad, el objetivo era estandarizar un método analítico para determinar el perfil de eicosanoides en el plasma humano después de la estimulación de sangre entera, y así observar las diferencias entre sujetos sanos y pacientes. Por lo tanto, un método por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas en tándem (HPLC-MS / MS) fue validado para cuantificar 22 eicosanoides en el plasma de individuos sanos. El análisis por HPLC-MS / MS se realizó en forma negativa el modo de seguimiento de múltiples reacciones. La linealidad del método mostró un coeficiente de correlación (r) mayor que 0,98 para todos los eicosanoides examinados. La precisión y exactitud de intra e inter-ensayo tenían desviación estándar y el error relativo inferior al 15%, excepto en el límite inferior de cuantificación cuyos valores fueron inferiores a 20%. Para la estimulación de las células de sangre entera se utilizaron cuatro estímulos (fMLP, ionomicina, A23187 y thapsigargin). El análisis estadístico mostró que A23187 y thapsigargin fueron los estímulos más potentes para la inducción de la producción de eicosanoides. Entonces, comparando el perfil de eicosanoides en muestras de plasma de individuos sanos con anemia de células falciformes, se trató con hidroxiiurea o transfusión de sangre crónica. Los resultados mostraron el método tiene precisión para determinar las diferencias entre los pacientes y los individuos sanos para la producción de mediadores lipídicos 5-HETE, 12-HETE, LTB_4 , LTE_4 , TXB_2 y PGE_2 . Por lo tanto, nuestro método analítico es sensible, específico y reproducible para identificar y cuantificar las diferencias en el perfil de muestras de sangre eicosanoides estimuladas *in vitro*, y puede contribuir a la creación del perfil de los diferentes mediadores lipídicos de enfermedades inflamatorias e infecciosas.

Palabras claves: Eicosanoides, Validación del método, HPLC - MS/MS, Plasma humano, Lipidome, Estimulación de sangre entera, Anemia de células falciformes, Hidroxiiurea, Transfusión de sangre.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Biossíntese dos principais eicosanoides a partir do ácido araquidônico	3
Figura 2. Estrutura química dos eicosanoides avaliados neste trabalho.....	5
Figura 3. Representação do analisador triplo quadrupolar.....	11
Figura 4. Cromatogramas obtidos por HPLC-MS/MS para análise dos eicosanoides no modo MRM para 23 transições incluindo o padrão interno.....	28
Figura 5. Padronização do método de extração em fase sólida para purificação de eicosanoides.....	31
Figura 6.1. Gráficos de linearidade dos eicosanoides 5-HETE, 5-oxo-ETE, 5,6-DiHETE, 11,12-DHET, 11(12)-EET, 12-HETE e 14,15-DHET.....	36
Figura 6.2. Gráficos de linearidade dos eicosanoides 15-HETE, 20-HETE, LTB ₄ , 6-trans- LTB ₄ , LTD ₄ , 11-trans- LTD ₄ , LTE ₄ e LXA ₄	37
Figura 6.3. Gráficos de linearidade dos eicosanoides PGD ₂ , PGE ₂ , 15-Keto-PGE ₂ , 20-OH-PGE ₂ , PGJ ₂ , 15-deoxi-Δ ¹² ,14-PGJ ₂ e TXB ₂	38
Figura 7. Estímulos para liberação de eicosanoides por leucócitos totais de um voluntário sadio.....	47
Figura 8.1. Concentração dos eicosanoides LTB ₄ , 6-trans-LTB ₄ , LTD ₄ , 11-trans-LTD ₄ e LTE ₄ em plasma de indivíduos saudáveis após estimulação <i>in vitro</i>	51
Figura 8.2. Concentração dos eicosanoides PGD ₂ , PGE ₂ , 20-OH-PGE ₂ e TXB ₂ em plasma de indivíduos saudáveis após estimulação <i>in vitro</i>	52
Figura 8.3. Concentração dos eicosanoides 5-oxo-ETE, 5-HETE, 11 (12)-EET, 12-HETE, 15-HETE e 5,6-DiHETE em plasma de indivíduos saudáveis após estimulação <i>in vitro</i>	53
Figura 9.1. Comparação das concentrações dos eicosanoides 5-HETE, 12-HETE e 5,6-DiHETE em plasma de indivíduos saudáveis e em pacientes com anemia falciforme em tratamento com hidroxiureia ou transfusão sanguínea crônica após estimulação do sangue periférico total <i>in vitro</i>	56
Figura 9.2. Comparação das concentrações dos eicosanoides LTB ₄ e LTE ₄ em plasma de indivíduos saudáveis e em pacientes com anemia falciforme em tratamento com hidroxiureia ou transfusão sanguínea crônica após estimulação do sangue periférico total <i>in vitro</i>	57
Figura 9.3. Comparação das concentrações dos eicosanoides TXB ₂ e PGE ₂ em plasma de indivíduos saudáveis e em pacientes com anemia falciforme em	

tratamento com hidroxiureia ou transfusão sanguínea crônica após estimulação do sangue periférico total <i>in vitro</i>	58
Figura 10. Comparação do perfil de produção de eicosanoides após a estimulação do sangue periférico total <i>in vitro</i> em indivíduos saudáveis e pacientes com AF em tratamento.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Gradiente de eluição dos mediadores lipídicos.....	21
Tabela 2. Métodos de extração em fase sólida utilizando cartuchos Sep-Pak C18 para purificação de eicosanoides.....	22
Tabela 3. Parâmetros de Monitoramento de Reação Múltipla (MRM) e tempos de retenção dos eicosanoides.....	29
Tabela 4. Efeito de matriz (plasma) para quantificação de eicosanoids por HPLC-MS/MS em oito amostras de plasma diferentes (n = 8).....	33
Tabela 5. Linearidade e coeficiente de correlação (r) de cada analito.....	35
Tabela 6.1. Avaliação da precisão e exatidão intra e inter-dia de amostras de plasma para os metabólitos da via das lipoxigenases.....	40
Tabela 6.2. Avaliação da precisão e exatidão intra e inter-dia de amostras de plasma para os metabólitos da via das cicloxigenases.....	42
Tabela 6.3. Avaliação da precisão e exatidão intra e inter-dia de amostras de plasma para os metabólitos da via do P450.....	43
Tabela 7. Precisão e exatidão do limite de quantificação.....	45
Tabela 8. Hemograma e informações dos voluntários saudáveis.....	49
Tabela 9. Hemograma e informações dos pacientes com AF em tratamento com HU ou com transfusão crônica de hemácias.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA: Ácido araquidônico

ACN: Acetonitrila

AF: Anemia falciforme

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BLT₁ e BLT₂: Receptor de LTB₄

CID: do inglês, *Collision induced dissociation*

CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência

CQA: Controle de qualidade alto

CQB: Controle de qualidade baixo

COXs: Cicloxigenases

cPLA₂: Fosfolipase A₂ citosólica

CV: Coeficiente de variação

CYP 450: Citocromo P450

CysLT₁ e CysLT₂: Receptor de Cys leucotrieno

DiHETEs: Ácidos dihidroxieicosatetraenoicos

DMSO: Dimetil sulfóxido

EETs: Ácidos epoxieicosatrienoicos

EM: Espectrometria de massas

ESI: do inglês, *Electrospray ionization*

fMLP: Formil-metionil-leucil-fenilalanina

FMN: Fator de matriz normalizado

Hb: Hemoglobina

HbF: Hemoglobina fetal

HETEs: Ácidos hidroxieicosatetraenoicos

HPLC: do inglês, *High performance liquid chromatography*

HU: Hidroxiureia

IMC: Índice de massa corpórea

LC: do inglês, *Liquid Chromatography*

LIQ: Limite inferior de quantificação

LOXs: Lipoxigenases

LTs: Leucotrienos

Lxs: Lipoxinas

MeOH: Metanol

MRM: Monitoramento de reações múltiplas

MS: do inglês, *mass spectrometry*

PG (PGD₂, PGE₂, PGF_{2α}): Prostaglandinas D₂, E₂ e F_{2α}

PGHS: Prostaglandina H sintase

PGI₂: Prostaciclina

PMNs: Polimorfonucleares

ROS: do inglês, *reactive species of oxygen*

SPE: do inglês, *solid phase extraction*

TCTH: Transplante de células tronco hematopoiéticas

TX (TXA₂, TXB₂): Troboxanos A₂ e B₂

WBC: do inglês, *White blood cells*

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Resumen	iii
Lista de figuras	iv
Lista de tabelas	vi
Lista de abreviaturas e siglas	vii
1. INTRODUÇÃO	01
1.1. <i>Metabolismo do ácido araquidônico</i>	01
1.2. <i>Lipidoma de eicosanoides</i>	06
1.3. <i>Anemia falciforme</i>	06
1.4. <i>Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial para quantificação de mediadores lipídicos</i>	08
2. OBJETIVOS	16
3. MATERIAL e MÉTODOS	18
3.1. <i>Casuística</i>	19
3.2. <i>Reagentes e Solventes</i>	20
3.3. <i>Soluções-padrão.</i>	20
3.4. <i>Quantificação dos eicosanoides em amostras de plasma</i>	21
3.4.1. <i>Análise por HPLC-MS/MS</i>	21
3.4.2. <i>Validação do método analítico.</i>	22
3.4.2.1. <i>Recuperação</i>	22
3.4.2.2. <i>Efeito de matriz</i>	23
3.4.2.3. <i>Linearidade</i>	23
3.4.2.4. <i>Precisão e exatidão</i>	24
3.4.2.5. <i>Limite inferior de quantificação</i>	25
3.5. <i>Padronização da estimulação do sangue periférico total</i>	25
3.6. <i>Contagem de células</i>	26
3.7. <i>Análise estatística</i>	26
4. RESULTADOS	27
4.1. <i>Quantificação dos eicosanoides em amostras de plasma</i>	28
4.1.1. <i>Análise dos eicosanoides por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial</i>	28

4.1.2. Validação do método analítico	30
4.1.2.1. Recuperação	30
4.1.2.2. Efeito de matriz	32
4.1.2.3. Linearidade	34
4.1.2.4. Precisão e exatidão	39
4.1.2.5. Limite inferior de quantificação	44
4.2. Padronização do melhor estímulo do sangue periférico total para liberação dos eicosanoides	46
4.3. Análise do lipidoma dos indivíduos	48
4.3.1. Características gerais dos voluntários saudáveis	48
4.3.2. Análise qualitativa e quantitativa de eicosanoides em plasma de indivíduos saudáveis	50
4.4. Determinação do lipidoma dos pacientes com anemia falciforme	54
4.4.1. Hemograma e informações clínicas dos pacientes	54
4.4.2. Análise qualitativa e quantitativa de eicosanoides em plasma de sangue total (estimulado in vitro) de pacientes com anemia falciforme	55
5. DISCUSSÃO	59
5.1. Validação do método analítico	60
5.1.1. Recuperação	60
5.1.2. Efeito de matriz	61
5.1.3. Precisão e exatidão	62
5.1.4. Linearidade e limite inferior de quantificação	63
5.2. Estimulação do sangue periférico total	63
5.3. Análise qualitativa e quantitativa de eicosanoides em plasma de indivíduos saudáveis e dos pacientes com anemia falciforme	64
6. CONCLUSÕES	68
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
8. ANEXOS	81

*“A mente que se abre a uma nova ideia
jamais voltará ao seu tamanho
original.”*

Albert Einstein

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Metabolismo do ácido araquidônico

O ácido araquidônico (AA) é um ácido graxo poli-insaturado que faz parte dos fosfolipídios de membranas podendo ser liberado por ativação celular através de diferentes estímulos como agentes infecciosos, químicos, físicos, radiação ultravioleta, interação antígeno-anticorpo e resposta imune (FUNK, 2001). Estes induzem distúrbio da membrana celular e aumento de cálcio intracelular, resultando na translocação de fosfolipase A_2 citosólica ($cPLA_2$) para as membranas nuclear e plasmática, culminando na liberação do AA (LEWIS et al., 1984), o qual pode ser convertido enzimaticamente em compostos biologicamente ativos (Figura 1) pela ação das cicloxigenases (COXs), lipoxigenases (LOXs) ou citocromo P450 (CYP 450), ou não enzimaticamente por espécies reativas de oxigênio (ROS) (HAEGGSTROM, FUNK, 2011).

A enzima COX, chamada também de prostaglandina H sintase (PGHS), existe em duas isoformas: a COX-1 (PGHS-1), que é expressa constitutivamente e por isso está relacionada com a homeostasia do organismo; e a COX-2 (PGHS-2) que embora seja induzida após um estímulo inflamatório, seus produtos podem apresentar atividade anti ou pró-inflamatória. As COXs catalisam a formação da PGH_2 , a qual pode ser convertida em prostaciclina (PGI_2), tromboxanos (TXA_2 , TXB_2) e nas demais prostaglandinas (PGD_2 , PGE_2 , $PGF_{2\alpha}$) (VANE et al., 1998; SMITH et al., 2000). Os prostanoides desempenham papel central no processo inflamatório induzindo edema, dor, febre e recrutamento celular (DUBOIS et al., 1998; RICCIOTI, FITZGERALD, 2011; FIGUEIREDO et al., 2012). Além disso, regulam respostas fisiológicas como coagulação sanguínea, ovulação, indução do parto, metabolismo ósseo, cicatrização, filtração renal, tônus dos vasos sanguíneos e integridade gastrointestinal (NEEDLEMAN, IZAKSON, 1997; DUBOIS et al., 1998). A inibição de PGs tem sido considerada benéfica em doenças como Alzheimer (STEWART et al., 1997) e câncer (THUN et al., 1993; GIOVANNUCCI et al., 1994) sugerindo que as PGs são liberadas e desempenham importante papel nessas patologias. Outras funções relevantes das PGs têm sido descritas tanto na resposta imune inata quanto na adaptativa (LONE, TASKEN, 2013). A PGE_2 , por exemplo, inibe ativação de neutrófilos (TALPAIN et al., 1995), regula as funções de células dendríticas (POLOSO et al., 2013) e inibe a fagocitose e a atividade microbicida de macrófagos (ARONOFF et al., 2004; SEREZANI et al., 2007), entre outras funções.

Com relação à LOX, são três as descritas. A 5-LOX é responsável pela produção de leucotrienos (LTs), e a 12/15-LOX pela formação de lipoxinas (LXs). A 5-LOX, em presença de sua proteína acessória, a proteína ativadora da 5-LOX (em inglês FLAP), converte o AA em um composto instável, o LTA₄, que é convertido em LTB₄ por ação da LTA₄ hidrolase, ou em LTC₄, após adição de glutathione pela LTC₄ sintase. Posteriormente, o LTC₄ é degradado em LTD₄ e LTE₄, sendo esses três compostos coletivamente conhecidos como cisteinil-LTs (CysLTs) (LEWIS, AUSTEN, 1984). O LTB₄ é um potente quimioatraente de leucócitos (FACCIOLI et al. 1991) e regulador da ativação, migração e apoptose celular (revisado em PETERS-GOLDEN et al., 2005; FUNK, 2001) pela ligação em receptores BLT₁, de alta afinidade e mais abundantemente expresso nos leucócitos, mas também em células de estroma do baço, timo e medula óssea, e em receptores BLT₂, de baixa afinidade e expresso em células endoteliais, neutrófilos e células neoplásicas (YOKOMISO et al., 2000; HENNIG et al., 2008). Além disso, é relatado que o LTB₄ é um potente ativador e regulador da resposta imune inata, e essencial para o controle de infecções por bactérias, fungos e outros parasitas (MEDEIROS et al., 1999; MEDEIROS et al., 2004; MACHADO et al., 2005; PERES et al., 2007). Os LTC₄, LTD₄ e LTE₄ são potentes vasoconstritores, que atuam em receptores CysLT₁ e CysLT₂, ambos ligados à proteína G (KANAKA, BOYCE, 2004), e estão intimamente relacionados com a patobiologia das respostas alérgicas e da asma (DRAZEN et al., 1992), além de estarem envolvidos em doenças cardiovasculares (RICCIONI et al., 2010), câncer (MAGNUSSON et al., 2010) e fibrose (BELLER et al., 2004). Recentemente também foi descrito o LTE₄R (CysLT₃), receptor específico para LTE₄ (MAEWAKA et al., 2008).

Ainda pela via das LOXs, são geradas as lipoxinas (LXs) A₄ e LXB₄ que são mediadores endógenos anti-inflamatórios que podem ser sintetizadas por três vias transcelulares. Na primeira há formação de LTA₄ pela 5-LOX presente em células mieloides, o qual é convertido em LXA₄ pela ação da 12-LOX. A segunda envolve a 15-LOX derivada de monócitos e/ou epitélio que forma 15-HETE, o qual é substrato para 5-LOX de neutrófilos, formando as LXA₄ e LXB₄. A terceira via é desencadeada pela aspirina, a qual inibe irreversivelmente a COX-1 e acetila a COX-2 resultando na formação de 15-HETE, o qual é transformado, pela enzima 5-LOX derivada de leucócitos, em 15-epi-LXA₄ ou 15-epi-LXB₄ (SERHAN et al., 1984). As LXs são consideradas mediadores da fase de resolução das doenças, uma vez que inibem a

produção de citocinas, a migração de células dendríticas, eosinófilos e neutrófilos (SERHAN, CHIANG, 2002) e a resposta imune e inflamatória (VANDYKE, SERHAN, 2003; MACHADO, ALIBERTI, 2006).

Por fim, as CYPs são responsáveis pela conversão do AA em ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs), ácidos dihidroxieicosatrienoicos (DiHETEs) e ácidos hidroxieicosatetraenoicos (HETEs). Esses metabólitos podem estar envolvidos em processos fisiológicos, como migração e proliferação celular (SPECTOR, NORRIS, 2007; PANIGRAHY et al. 2011), ou patológicos, como em doenças renais (MAIER, ROMAN, 2001), cardiovasculares (ISSAN et al., 2013), hepáticas (SACERDOTI et al., 2003) e câncer (PANIGRAHY et al., 2010).

Figura 1. Biossíntese dos principais eicosanóides a partir do ácido araquidônico (Adaptado do Wikipidea).

Esses produtos da oxidação do AA (LTs, PGs, LXs, EETs, HETEs, DHETEs) que apresentam 20 átomos de carbono são coletivamente chamados de eicosanoides e participam de funções homeostáticas, inflamação e resposta imune nas infecções (MEDEIROS et al., 1999; FUNK, 2001; MEDEIROS et al., 2004; MACHADO et al., 2005; PERES et al., 2007; MEDEIROS et al., 2008; NICOLETE et al., 2008; SORGI et al., 2009; NICOLETE et al., 2009; MACHADO et al., 2010; CARLOS et al., 2011; BUZALAF et al., 2011; MACHADO et al., 2011; SANTOS et al., 2011; TRINDADE et al., 2012; SECATTO et al., 2012; SOARES et al., 2013). As estruturas químicas dos 22 mediadores lipídicos avaliados no presente trabalho estão representadas na Figura 2.

A biossíntese dos diferentes compostos gerados pela ativação da cascata do AA depende do microambiente e da distribuição dessas enzimas nos diferentes tecidos e células (LEWIS, AUSTEN, 1984; MEDEIROS et al., 2012). Uma vez produzidas, estas substâncias podem se ligar em receptores presentes na própria célula produtora, ou serem transportados para o meio externo, onde se ligam aos receptores específicos das células circunvizinhas de ação parácrina ou autócrina (BOYCE, 2007). Uma vez ligados aos seus receptores acoplados à proteína G, esses mediadores são considerados moléculas sinalizadoras, pois desencadeiam aumento ou diminuição de segundos mensageiros como cálcio ou AMPc (adenosina 3',5'-monofosfato cíclico), desempenhando assim diferentes funções (HATA, BREYER, 2004; WERZ, STEINHILBER, 2006). Neste contexto, agentes farmacológicos tais como os ionóforos de cálcio A23187 e ionomicina, os bloqueadores da Ca^{2+} -ATPase como a tapsigargina, e os agonistas naturais, como o formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP), são indutores da biossíntese de alguns eicosanoides e têm sido frequentemente utilizados para estudos sobre a regulação do metabolismo do AA em leucócitos humanos (BORGEAT, SAMUELSSON, 1979; HOFFMAN et al., 1988; FLAMAND et al., 2002; FLAMAND et al., 2006). O aumento na concentração de cálcio estimula a translocação da 5-LOX e da cPLA₂ do citosol para o envelope nuclear, bem como a liberação de AA, permitindo a formação dos metabólitos da 5-LOX (FLAMAND et al., 2002; ZARINI et al., 2006). Estudos também demonstram que a estimulação de células com ionóforo de cálcio aumenta a produção de alguns prostanoídeos como PGE₃, PGE₂, PGF_{2α} e TXB₂ (TANAKA et al., 2014). Neste trabalho, demonstramos a importância da seleção do agente farmacológico apropriado e sua concentração ideal para avaliar a produção de

mediadores lipídicos por leucócitos humanos após estimulação do sangue periférico total. Com isso pudemos estabelecer o perfil de eicosanoides em indivíduos saudáveis para comparar com diferentes doenças inflamatórias e infecciosas.

Figura 2. Estrutura química dos eicosanoides avaliados neste trabalho (Estruturas foram desenhadas no programa Chemdraw).

1.2. Lipidoma de eicosanoides

Os lipídeos constituem uma importante e vasta classe de biomoléculas. Além do seu papel como constituinte estrutural de membranas celulares e de armazenamento energético, estes compostos também são conhecidos pelas suas propriedades sinalizadoras que os permitem controlar vários processos fisiológicos nas células (WYMAN, SCHNEITER, 2008). Os lipídeos podem ser classificados em diversas categorias principais, como por exemplo, os ácidos graxos, os glicerolipídeos, os glicerofosfolipídeos, os esfingolipídeos e os esteroides (QUEHENBERGER et al., 2010). Esta enorme variedade estrutural reflete na grande diversidade de funções biológicas destas biomoléculas (KHALIL et al., 2010).

Dentre os lipídeos citados, os eicosanoides têm sido amplamente estudados em diversas desordens, tais como hipertensão (IMIG, 2015), diabetes (SCHWARTZMAN et al., 2010), obesidade (VIRTUE et al., 2015), câncer (SALIM et al., 2014), doença de Alzheimer (CZAPSKI et al., 2015) e doenças infecto-contagiosas (MEDEIROS et al., 1999; BUZALAF et al., 2011).

Uma das estratégias para compreender melhor essas e outras doenças consiste na avaliação de como a composição dos lipídeos celulares, bem como as membranas lipídicas, mudam em resposta a sinais como patógenos, agentes oxidantes, toxinas, hormônios, dieta e processos patobioquímicos (BALAZY, 2004). Nesse contexto, a análise lipidômica surge como uma importante estratégia para a compreensão de diversas alterações que ocorrem no sistema biológico, sendo definida como um estudo qualitativo e quantitativo em larga escala dos lipídeos celulares e que permite avaliar as estruturas, funções e interações de lipídeos, bem como determinar mudanças que ocorrem durante processos fisiológicos e perturbações fisiopatológicas (KHALIL et al., 2010; SHINDE et al. 2012; SONG et al., 2013).

1.3. Anemia falciforme

A anemia falciforme (AF) é uma doença monogênica caracterizada por anemia hemolítica crônica e fenômenos vaso-oclusivos que levam a crises dolorosas agudas e à lesão tecidual crônica e progressiva (REES et al., 2010). É causada pela substituição da base nitrogenada adenina por timina (GAG->GTG) no gene da β -globina, levando à codificação do aminoácido valina (hidrofóbico) ao invés do ácido glutâmico (hidrofílico) na posição 6 da cadeia da β -globina da hemoglobina (Hb).

Essa mutação provoca alterações físico-químicas que levam à formação da Hb S anormal (HbS) ao invés da Hb normal (HbA) (ZAGO, SILVA- PINTO, 2007; BUNN, 1997).

Em determinadas situações, como desoxigenação, as moléculas de HbS podem sofrer polimerização, ocasionando falcização e diminuição da vida média dos eritrócitos. Além de formar polímeros entre si, a HbS também pode se polimerizar com proteínas da membrana, induzindo aumento da expressão de moléculas de adesão na superfície das células endoteliais. Com isso, há aumento da adesão de hemácias ao endotélio, resultando na oclusão e hipóxia dos vasos sanguíneos, com consequente isquemia. Esse quadro ativa uma cascata adicional de eventos patológicos que incluem hemólise, disfunção endotelial, inflamação, hipercoagulabilidade, estresse oxidativo, dano por reperfusão e hipoxemia. Esses processos causam dano em múltiplos órgãos, resultando em problemas clínicos agudos, tais como dor, infecções e síndrome torácica aguda; e complicações crônicas como falência renal, doença cerebrovascular e hipertensão pulmonar (FRENETTE, ATWEH, 2007; ZAGO, SILVA-PINTO, 2007; REES et al., 2010; REES, GIBSON, 2012).

Os tratamentos disponíveis para a AF são a hidroxiureia (HU), a transfusão sanguínea e o transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH) alogênicas (ZAGO, SILVA-PINTO, 2007). Embora o mecanismo de ação da HU não seja totalmente elucidado, ela tem vários efeitos diretos no mecanismo fisiopatológico da AF, atuando no aumento da síntese da Hb fetal (Hb F), o que reduz a polimerização intraeritrocitária da Hb S em condições de desoxigenação, como também promovendo hidratação eritrocitária e redução da expressão de moléculas de adesão dos eritrócitos (PLATT et al., 1984; CARTRON, ELION, 2008). Esses mecanismos conferem redução da hemólise, diminuição da aderência dos eritrócitos, leucócitos e plaquetas ao endotélio vascular e melhora da reologia com diminuição da viscosidade sanguínea e vasodilatação, contribuindo para a diminuição dos fenômenos inflamatórios e vaso-oclusivos (ZAGO, SILVA-PINTO, 2007).

Para o controle e a prevenção de eventos neurológicos, o uso de transfusão crônica ainda parece ser o tratamento de escolha. Estudos avaliaram o impacto do regime de hipertransfusão no controle de eventos neurológicos, mostrando sua eficácia, embora a interrupção da transfusão leve à recorrência do evento (ADAMS,

BRAMBILLA, 2005). Além disso, a transfusão sanguínea reduz a porcentagem e síntese de Hb S, diminui a anemia e a hemólise. Entretanto, pacientes em transfusão crônica apresentam risco de aloimunização (VICHINSKY et al., 1990) e sobrecarga de ferro, sendo importante a quelação deste metal com o objetivo de evitar danos principalmente no fígado e coração (WOOD et al., 2004).

Com relação ao TCTH, a ideia de substituir a medula óssea do paciente, que é a fonte das hemácias falciformes defeituosas, por medula óssea que produz glóbulos vermelhos normais é a única terapia curativa para AF (JOHNSON et al., 1984). Embora tal abordagem tenha sido considerada arriscada por muitos anos, a redução na mortalidade após o TCTH devido os recentes avanços na terapia imunossupressora e cuidados de suporte, resultou em renovado interesse por esta terapia para doenças falciformes (VOLTARELLI et al., 2009).

Apesar da AF seja devido uma alteração estrutural da molécula de Hb, a doença é caracterizada por recorrentes hemólises, infecções, oclusões da microcirculação e inflamação aguda e crônica (ZAGO, PINTO, 2007). Estudos demonstram que pacientes com AF apresentam elevada concentração plasmática de PGE₂ quando comparados com indivíduos saudáveis (LANARO et al., 2009), e que a concentração de LTE₄ está aumentada em pacientes com AF com crises de dor (JENNINGS et al., 2008). Embora a participação dos eicosanoides em doenças humanas tem sido investigada (SORGI et al., 2009; TRINDADE et al., 2012, STARLING et al., 2015), poucos trabalhos avaliaram o papel desses mediadores lipídicos na AF, principalmente após diferentes terapias.

Dessa forma, para comprovar a aplicabilidade do método em avaliar diferenças entre o lipidoma de indivíduos saudáveis com o de pacientes de diferentes doenças, realizamos um estudo comparativo entre indivíduos normais e pacientes com AF submetidos a dois tipos de tratamentos: HU ou transfusão crônica de hemácias.

1.4. Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial para quantificação de mediadores lipídicos

A investigação do potencial envolvimento dos eicosanoides em doenças exige ensaios sensíveis e específicos que permitam a quantificação desses produtos em amostras biológicas. A identificação destes compostos em extratos celulares ou tecidos representa um grande desafio do ponto de vista analítico, uma vez que

esses sistemas são constituídos por uma mistura complexa de lipídeos estruturalmente distintos, dentre eles várias espécies isoméricas (mesma fórmula molecular) presentes nos fluidos biológicos em concentrações muito baixas (MESAROS et al., 2009; SHINDE et al. 2012; SONG et al., 2013). Embora os ensaios imunoenzimáticos sejam comumente empregados para a quantificação individual de mediadores lipídicos, sabe-se que pode haver reatividade cruzada entre compostos, principalmente em amostras biológicas complexas. Além disso, o uso de “kits” comerciais limita-se à quantificação de um mediador por vez, o que representa um problema quando o volume de amostra é limitado. Vale ressaltar ainda que os kits de ELISA não estão disponíveis para todos os eicosanoides (IL'YASOVA al., 2004; GRAUW et al., 2011). Desta forma, surge a necessidade de utilização de uma metodologia de análise altamente sensível e específica (MESAROS et al., 2009) que permita a identificação do maior número possível de lipídeos nestas amostras.

Diversas ferramentas analíticas têm sido utilizadas para a identificação, quantificação e compreensão da estrutura de lipídeos, sendo as técnicas de espectrometria de massas (EM ou MS, do inglês Mass Spectrometry) as mais utilizadas.

A MS é uma técnica analítica qualitativa e quantitativa que oferece informação sobre peso molecular e as características estruturais da molécula. É uma técnica destrutiva, mas que apresenta alta sensibilidade sendo rotineiramente utilizada para análise de compostos presentes em baixas concentrações nas amostras biológicas (CHIARADIA et al., 2008). Resumidamente, a análise por MS consiste na geração de íons por meio de um método de ionização da molécula apropriado. Em seguida, os íons são separados por meio de sua relação massa-carga (m/z) em um analisador de massas e detectados qualitativa e/ou quantitativamente por meio de um detector. A magnitude do sinal elétrico em função da razão m/z é convertida por um processador de dados, o qual gera o espectro de massas correspondente (HAN, GROSS, 2005).

A análise por MS pode ser feita inserindo as amostras diretamente no espectrômetro de massas, ou acoplando o equipamento a um sistema de separação, como a cromatografia líquida (LC, do inglês Liquid Chromatography). A possibilidade de automação aliada à rapidez das análises permite que grande número de amostras seja analisado em curto período de tempo (CHIARADIA et al.,

2008). A MS moderna vem sendo utilizada em lipidômica para identificar e quantificar lipídeos em sistemas biológicos, sendo uma ferramenta poderosa para possibilitar a compreensão da função destes compostos no sistema estudado (IVANOVA et al., 2009). Também, a análise de múltiplos lipídeos tornou-se possível com o desenvolvimento da ionização por electrospray (ESI, do inglês *Electrospray Ionization*). ESI se caracteriza como uma técnica de ionização branda (*soft ionization*) que permite determinar a massa molecular dos compostos de interesse em uma amostra devido à ausência de fragmentação dos analitos (HAN, GROSS, 2005). O desenvolvimento da fonte de ESI possibilitou à MS analisar biomoléculas termolábeis e não voláteis, sem a necessidade de derivatização dos analitos.

Embora a determinação da massa molecular seja facilitada pelo emprego dos métodos de ionização “brandos”, pouca ou nenhuma informação estrutural é obtida, devido à produção de um número reduzido de íons fragmentos. Além disso, uma única análise pode resultar em um espectro de lipídeos extremamente complexo, com milhares de diferentes íons. Tal dificuldade impulsionou o desenvolvimento da MS sequencial operando com mais de um analisador de massas para a obtenção de informações estruturais relativos às moléculas de interesse (HERDERICH et al., 1997).

Dentre os analisadores de massas disponíveis atualmente, destacam-se os equipamentos multi-quadrupolares (QqQ). Estes são constituídos por vários analisadores, por exemplo, dois quadrupolos onde **Q1** e **Q3** são usados como filtros de massa e **q2** como célula de colisão (Figura 3), o que possibilita análises de espectrometria de massas sequencial (MS/MS). Neste tipo de análise, íons precursores formados a partir da ionização do composto de interesse são selecionados e posteriormente fragmentados através do processo dissociativo denominado CID (do inglês, *Collision Induced Dissociation*), fornecendo informações estruturais detalhadas como grupos funcionais presentes na molécula (CHIARADIA et al., 2008).

Figura 3. Representação do analisador triplo quadrupolar (Adaptado de Wikipedia)

Para a obtenção do máximo de informações estruturais de um determinado composto de interesse, alguns experimentos podem ser realizados no MS pela simples alteração desses modos de varredura dos quadrupolos. Em particular, o modo por Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM) é um método rápido, sensível e seletivo, o que o torna um método ideal para a determinação quantitativa e qualitativa de analitos múltiplos, amplamente empregado na análise de eicosanoides (MESAROS et al., 2009, DALLI, SERHAN, 2012; TANAKA et al., 2013).

Nos experimentos de MRM, os fragmentos produto resultantes da fragmentação do íon selecionado em **Q1** são selecionados em **Q3** durante a análise. Neste caso, não ocorre varredura numa faixa de m/z , uma vez que os analisadores **Q1** e **Q3** são focalizados nas massas pré-selecionadas. A ausência de varredura permite que o equipamento focalize apenas o íon precursor e o seu fragmento, aumentando a sensibilidade e, conseqüentemente, a seletividade do experimento para um dado analito de interesse. Assim, os íons selecionados pelo primeiro analisador serão detectados se estes produzirem o íon fragmento de interesse selecionado em **Q3** (WANG, 2009).

Dada a facilidade com que a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou HPLC, do inglês high performance liquid chromatography) é acoplada a uma fonte de ESI, HPLC-MS é a técnica cromatográfica frequentemente empregada para a análise de lipídeos em baixa abundância. Trata-se de uma técnica altamente sensível, rápida, seletiva com alto potencial para determinar qualitativa e quantitativamente múltiplas espécies de lipídeos de forma simultânea sem a

necessidade de derivatização ou isolamento prévio dos compostos de interesse (CHIARADIA et al., 2008).

Alguns trabalhos recentes descrevem a utilização de LC-MS/MS para determinação de eicosanoides em amostras biológicas (LUNDSTRON et al., 2012; MESAROS et al., 2009; HARKEWICZ, DENNIS, 2011). Utilizando esta técnica, Flamand et al. (2006) avaliaram os efeitos da inibição da biossíntese de LTs e PGs em polimorfonucleares (PMNs) humanos estimulados em diversas condições experimentais. Estes pesquisadores utilizaram a LC no modo reverso, com detecção na região do visível para a quantificação dos eicosanoides de interesse. Além disso, os autores avaliaram a presença de AA nas amostras por LC-MS utilizando a ESI no modo negativo. A técnica de LC-MS/MS também foi utilizada por Dalli e Serhan (2012) como ferramenta para observar que PMNs apoptóticos estimulam a produção de mediadores lipídicos pró-resolução por macrófagos humanos durante a esferocitose. Também Shinde et al. (2012) desenvolveram e validaram um método por LC-MS/MS para identificação e quantificação de 32 eicosanoides em plasma de apenas seis voluntários saudáveis. Além disso, os autores observaram o efeito da aspirina administrada uma hora antes da coleta do sangue. Todos esses relatos validam o uso da LC-MS/MS para a realização de estudos em diversas amostras biológicas.

Podemos ressaltar ainda que a MS ganhou espaço expressivo na área das ciências médicas, onde é aplicada principalmente para a determinação de biomarcadores, tais como os produtos do metabolismo do AA, de uma variedade de doenças. Por exemplo, o eicosanoide 12- HETE é um candidato a biomarcador da síndrome de Churg-Strauss, doença que apresenta sintomas semelhantes à asma e à síndrome hipereosinofílica (HIGASHI et al., 2010). Outro caso bem estudado é o do 8-iso-PGF_{2α}. Este mediador lipídico é empregado como biomarcador em estresse oxidativo (KADIISKA et al., 2005), o qual ocorre em níveis elevados em pacientes com doenças neurodegenerativas ou diabetes dos tipos 1 e 2 (PRATICO et al., 1998; DAVI et al., 2003).

Embora existam na literatura vários trabalhos que utilizam as técnicas de LC-MS/MS para análise de lipidoma, poucos se referem à determinação dos mediadores lipídicos em plasma humano (SHINDE et al., 2012; SONG et al., 2013).

“É preciso, antes de mais nada, querer.”

Amyr Klink

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

O objetivo deste projeto foi padronizar um método para estimulação do sangue periférico total para determinar os eicosanoides em plasma de indivíduos saudáveis ou de pacientes com AF em tratamento com HU ou com transfusão sanguínea, bem como validar uma metodologia analítica empregando a HPLC-MS/MS para identificar e quantificar simultaneamente esses compostos (lipidoma de eicosanoides).

Estratégias para atingir os objetivos

1. Análise dos eicosanoides por HPLC-MS/MS;
2. Validação do método por HPLC-MS/MS para quantificação dos mediadores lipídicos;
3. Padronização do método de extração dos mediadores lipídicos em fase sólida;
4. Padronização dos estímulos para indução dos eicosanoides em sangue periférico total;
5. Recrutamento dos voluntários saudáveis para determinação dos valores de referência do lipidoma de eicosanoides em amostras de plasma, por HPLC-MS/MS, após estimulação do sangue periférico total;
6. Aplicação do método em pacientes com anemia falciforme em tratamento com HU ou transfusão sanguínea.

“Você pode não mudar o vento, mas pode ajustar as velas do barco para chegar aonde quer.”

Confúcio

3. MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL e MÉTODOS

3.1. Casuística

Para estabelecimento do perfil de produção de mediadores lipídicos foram selecionados 19 indivíduos saudáveis (docentes, discentes e funcionários) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FCFRP-USP) e da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras (FFCLRP-USP), para doação espontânea de no máximo 20 mL de sangue periférico. Esses indivíduos eram de ambos os sexos, clinicamente saudáveis, com idade entre 23 e 58 anos, e que não haviam administrado qualquer anti-inflamatório no período de sete dias que antecederam a coleta. Antes da coleta do sangue foi aplicado um questionário, no qual os voluntários foram indagados sobre idade, uso de medicamentos ou outras substâncias que pudessem interferir em nossos dados.

Para comparação do perfil de produção de mediadores lipídicos de indivíduos saudáveis com pacientes, realizamos um estudo piloto composto por 9 pacientes com AF recrutados do Hemocentro de Ribeirão Preto, em tratamento com HU ou em transfusão sanguínea por mais de um ano. Esses voluntários eram de ambos os sexos, com idade entre 11 e 36 anos.

Os indivíduos foram convidados a participar voluntariamente do estudo, registrando a sua autorização através da assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, aprovado pelo Comitê de Ética da FCFRP-USP (nº CAAE 13492213.8.0000.5403), no caso dos indivíduos saudáveis, ou pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (nº CAAE 41799015.9.0000.5440), quando aplicado nos pacientes.

Os voluntários foram informados quanto ao conteúdo do estudo, procedimentos de coleta e uso do material biológico antes de assinarem o termo de consentimento livre e esclarecido. Os resultados obtidos foram disponibilizados individualmente para os doadores de sangue, se assim eles desejassem.

Além disso, o médico prof. Dr. Valdes Roberto Bollela, do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP-USP), colaborador do trabalho, foi responsável pela avaliação dos hemogramas dos indivíduos saudáveis e pelo devido encaminhamento à unidade de saúde, caso o hemograma apresentasse alguma alteração. Os pacientes com anemia falciforme são

cl clinicamente acompanhados pela hematologista Dra. Ana Cristina Silva Pinto do Hemocentro de Ribeirão Preto.

As amostras de plasma utilizadas na validação do método analítico foram obtidas de voluntários doadores de sangue do Centro Regional de Hemoterapia do HCFMRP-USP.

3.2. Reagentes e solventes

Os padrões de eicosanoides (LTB₄, 6-trans-LTB₄, LTD₄, 11-trans-LTD₄, LTE₄, PGD₂, PGE₂, 20-OH-PGE₂, 15-keto-PGE₂, 15-deoxy-Δ^{12,14}-PGJ₂, PGJ₂, 5-HETE, 12-HETE, 15-HETE, 20-HETE, (±)11,12-DiHETrE, (±)14,15-DiHETrE, 5-OxoETE, 11,12-EET, 5(S),6(R)-DiHETE, LXA₄ e TXB₂) e o padrão interno (PI) (12-epi-LTB₄-d₄) foram comprados da Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA). Os solventes grau HPLC, hexano, acetato de etila, acetonitrila, metanol e isopropanol, foram obtidos da JT Baker (Center Valley, PA, USA). Tapsigargina, ionomicina, A23187 e fMLP foram comprados da Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA). Ácido acético e etanol, ambos grau analítico, foram comprados da Synth (Diadema, São Paulo, Brazil) e o dimetil sulfóxido (DMSO) da Mallinckrodt Chemicals (Phillipsburg, NJ, USA). Um sistema de água Milli-Q (Millipore, Milford, MA, USA) foi utilizado. Os lipídeos foram purificados por extração em fase sólida (*Solid phase extraction* – SPE) usando um Waters® Extraction Manifold (Milford, MA, USA) e cartuchos Sep-Pak C18 (500 mg sorbent, 2.8 mL) da Thermo Scientific (Bellefonte, PA, USA).

3.3. Soluções-padrão

Foram preparadas soluções-estoque da mistura de eicosanoides a 1,2 µg/mL em metanol, bem como de PI na mesma concentração, que foram armazenadas a -80 °C. A partir da solução-estoque foram preparadas as soluções de trabalho, através de diluição seriada, pela fortificação de 300 µL de plasma branco com 18,75 µL de solução padrão da mistura de eicosanoides na correspondente concentração e pela adição de 8,4 µL da solução de PI a 1,2 µg/mL.

3.4. Quantificação dos eicosanoides em amostras de plasma

3.4.1. Análise por HPLC-MS/MS

As análises de HPLC-MS/MS foram realizadas empregando um sistema Acquity™ UPLC (Waters®) composto por uma bomba quaternária e injetor automático acoplado ao espectrômetro de massas Xevo TQ-S com fonte de ionização ESI equipado com Z-spray ortogonal (Waters®). Para a aquisição e processamento dos dados foi utilizado o software Masslynx 4.1 (Micromass, Manchester, UK). As análises cromatográficas foram realizadas em coluna C18 Ascentis EXPRESS (100 mm x 4,6 mm, 2,7 µm) empregando uma vazão de 0,6 mL/min a 25 °C. A eluição foi feita empregando um sistema de gradiente binário constituído por água:acetonitrila:ácido acético (69,98:30:0,02,v/v/v) (Fase A) e acetonitrila:isopropanol (70:30, v/v) (Fase B) com 0% de B de 0 a 2 minutos, aumentando para 15% de B aos 2 minutos, 20% de B aos 5 minutos, 35% de B aos 8 minutos, 40% de B aos 11 minutos, 100% de B aos 15 minutos permanecendo nesta proporção até 19 minutos. Deste tempo até 30 minutos, o gradiente retornou à proporção inicial para condicionamento da coluna, conforme representado na Tabela 1. A fonte de ionização operou em modo negativo e por MRM.

Tabela 1. Gradiente de eluição dos mediadores lipídicos

Tempo (min)	Fase móvel (%)	
	A	B
0 - 2	100	0
2 - 5	85	15
5 - 8	80	20
8 - 11	65	35
11 - 15	60	40
15 - 19	0	100
19 - 30	100	0

Para otimização das condições de MRM, uma solução padrão de cada eicosanoide a 100 ng/mL diluído em metanol:água:acetato de amônio (71:30:0.1, v/v/v) foram infundidos no MS a 10 µL/min e fragmentados via CID com argônio, a fim de obter o espectro do íon produto de cada analito. Após a seleção das transições de MRM, as energias do cone e de colisão foram padronizadas através da infusão direta dos padrões para obtenção de uma sensibilidade adequada.

3.4.2. Validação do método analítico

A validação do método bioanalítico seguiu as recomendações contidas na resolução RDC nº 27, de 17 de maio de 2012 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), contemplando os parâmetros: recuperação, efeito de matriz, curva de calibração (linearidade), precisão, exatidão e limite inferior de quantificação (LIQ). Os resultados obtidos foram compilados com o auxílio do software Microsoft Excel ® 2007.

3.4.2.1. Recuperação

Para a padronização do protocolo de extração, amostras de plasma ($n = 2$) foram enriquecidas com 10 ng de cada padrão de eicosanoide e de PI, em quintuplicata, e as proteínas foram precipitadas com 1,5 mL de metanol: acetonitrila (1:1, v/v) à 4 °C. O plasma desnaturado foi centrifugado a 600 x g, por cinco minutos, à 4 °C. Após este procedimento, 1,2 mL do sobrenadante foram transferidos para tubos cônicos, tiveram o volume completado para 14 mL com água milli-Q e foram submetidos a três métodos de extração usando a coluna Sep-Pak C18: método 1 (desenvolvido em nosso laboratório), método 2 (ALBA-LOREIRO et al., 2004) e método 3 (MASSEY, NICOLAOU, 2012), conforme descritos na tabela 2.

Tabela 2. Métodos de extração em fase sólida utilizando cartuchos Sep-Pak C18 para purificação de eicosanoides

Etapa	Método 1	Método 2	Método 3
1	2 mL metanol	10 mL etanol	10 mL metanol
	2 mL água/0,1% ácido acético	20 mL água	10 mL água
2	Amostra	Amostra acidificada com HCl 0,1M	Amostra acidificada com HCl 0,1M
3	2 mL água/0,1% ácido acético	10 mL água	5 mL metanol 15%
	-	1 mL etanol 35%	5 mL água
	-	-	2,5 mL hexano
4	2 mL metanol/0,1% ácido acético	2 mL etanol	2 mL acetato de etila

¹ Condicionamento dos cartuchos; ² Eluição da amostra; ³ Remoção de interferentes; ⁴ Eluição dos analitos.

A amostra eluída foi submetida à evaporação do solvente em *speed-vacuum* (Eppendorf, Alemanha) e o resíduo reconstituído em 100 µL de metanol. A recuperação dos mediadores lipídicos de interesse e do PI foi calculada comparando-se os resultados das amostras extraídas com os obtidos com uma solução-padrão dos analitos em metanol (amostras não extraídas), na mesma concentração, de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{Resposta do analito na matriz (amostra processada)} \cdot 100}{\text{Resposta do analito em solução metanólica}} \quad (1)$$

3.4.2.2. Efeito de matriz

O efeito da matriz biológica e eventuais componentes endógenos no plasma na resposta do analito ou PI foram avaliados, em duas concentrações (Controle de Qualidade Alto - CQA e Controle de Qualidade Baixo - CQB), em oito amostras de diferentes plasmas, sendo quatro amostras de plasma normal, duas amostras de plasma lipêmico e outras duas amostras de plasma hemolisado.

Para cada uma delas foi calculado o fator de matriz normalizado por PI (FMN), conforme a fórmula a seguir:

$$FMN = \frac{\text{Resposta do analito em matriz} / \text{Resposta do PI em matriz}}{\text{Resposta do analito em solução} / \text{Resposta do PI em solução}} \quad (2)$$

Para determinação dos FMNs, os diferentes plasmas tiveram suas proteínas desnaturadas e foram submetidos ao método 1 de SPE descrito no item 3.4.2.1. Os plasmas extraídos foram fortificados com solução padrão da mistura de eicosanoides e de PI para obtenção de soluções nas concentrações do CQA e CQB. As áreas obtidas foram comparadas com as áreas de soluções metanólicas dos analitos e de PI nas mesmas concentrações.

O coeficiente de variação (CV, %) dos FMNs relativos a todas as amostras foi calculado.

3.4.2.3. Linearidade

A linearidade foi avaliada através de uma curva de calibração, em triplicata, das amostras de plasma enriquecidas com soluções-padrão de LTB₄, 6-trans-LTB₄, LTD₄, 11-trans-LTD₄, LTE₄, PGD₂, PGE₂, 20-OH-PGE₂, 15-keto-PGE₂, 15-deoxy-

$\Delta^{12,14}$ -PGJ₂, PGJ₂, 5-HETE, 12-HETE, 15-HETE, 20-HETE, ($\pm$)11,12-DHET, ($\pm$)14,15-DHET, 5-OxoETE, 11,12-EET, 5(S),6(R)-DiHETE, LXA₄ e TXB₂, e extraídas pelo método 1 descrito no item 3.4.2.1, de modo a obter concentrações finais de 5,0; 7,5; 15,0; 30,0; 50,0 e 75,0 ng/mL. Para o LTB₄, 5-HETE, 12-HETE e TXB₂ também foi construída uma curva de linearidade contemplando as seguintes concentrações: 75,0; 150,0; 300,0; 450,0; 800,0 e 1000,0 ng/mL.

O gráfico de calibração foi construído plotando-se no eixo das abscissas os valores de concentração plasmática de cada eicosanoide e no eixo das ordenadas a razão entre a área dos picos obtidos para cada mediador e a área do PI. A análise estatística dos dados foi feita através da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, em que a relação área/concentração é expressa pela equação da reta ($y = ax + b$), sendo a o coeficiente angular e b o coeficiente linear da reta. Também foi calculado, a partir dos pontos experimentais, o coeficiente de correlação (r), parâmetro este que estima a linearidade da curva de calibração.

3.4.2.4. Precisão e exatidão

A avaliação da precisão e exatidão intra-dia (no mesmo dia) e inter-dia (em três dias diferentes) foi realizada em três níveis de concentrações plasmáticas: 7,5 ou 15,0 ng/mL, 30,0 ng/mL e 50,0 ng/mL. Para LTB₄, 5-HETE, 12-HETE e TXB₂, outros níveis de concentração também foram determinados: 150,0; 300,0 e 800,0 ng/mL. As amostras correspondentes a essas concentrações foram obtidas pela fortificação de 300 μ L de plasma branco com 18,75 μ L das respectivas soluções-padrão dos eicosanoides e de 8,4 μ L de PI, sendo agitadas em agitador por um minuto e em seguida submetidas ao procedimento de extração pelo método 1, conforme descrito no item 3.4.2.1. As amostras foram avaliadas em quintuplicata e os cálculos de concentrações foram obtidos baseados em uma curva de calibração, em duplicata, realizada todos os dias.

A precisão foi expressa pelo coeficiente de variação (CV,%), que foi calculado pela seguinte equação (x):

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} .100 \quad (3)$$

Onde S representa a estimativa do desvio padrão, e $\bar{x}$ a média dos valores obtidos.

A exatidão foi expressa pelo erro relativo (E, %) e calculada pela equação:

$$E = \frac{\text{concentração real} - \text{concentração teórica}}{\text{concentração teórica}} \cdot 100 \quad (4)$$

3.4.2.5. Limite inferior de quantificação

O limite inferior de quantificação (LIQ) foi considerado o menor ponto da curva de linearidade (5,0 ng/mL) e foi determinado pela fortificação de amostras de plasma branco com solução-padrão de cada eicosanoide, em quintuplicata. O LIQ foi considerado adequado quando os valores de precisão e exatidão, expressos pelo coeficiente e variação (CV, %) e erro relativo (ER, %), respectivamente, estiveram abaixo de 20%.

3.5. Padronização da estimulação do sangue periférico total

A avaliação do perfil de produção de eicosanoides em voluntários humanos foi realizada de acordo com o método proposto por FLAMAND et al. (2002) com algumas modificações. A padronização do melhor estímulo para produção de eicosanoides foi feita através da estimulação *in vitro* do sangue periférico total (1 mL) de indivíduos saudáveis (n = 4) com fMLP, ionomicina, ionóforo de cálcio A23187 ou tapsigargina, sendo o DMSO utilizado como controle negativo. O sangue foi coletado em tubos do tipo vacutainer de 10 mL contendo 143 unidades USP de heparina sódica e posteriormente estimulado por vinte minutos, em banho a 37 °C, sob agitação. Para cada um dos estímulos, foram testadas as concentrações de 10 e 20 µM. Após a estimulação, a reação foi bloqueada em banho de gelo e o sangue estimulado foi centrifugado a 300 x g, por vinte minutos, a 4 °C, para separação do plasma e posterior desnaturação das proteínas com cinco volumes de solução de metanol:acetonitrila (1:1, v/v) a 4 °C contendo 200 ng de 12-epi-LTB₄-d₄ como padrão interno. O plasma desnaturado foi centrifugado a 600 x g, por cinco minutos, à 4 °C. Após este procedimento, 1,2 mL do sobrenadante foram transferidos para tubos cônicos e tiveram o volume completado para 14 mL com água milli-Q para purificação dos eicosanoides pelo método 1 de SPE, conforme descrito no item 3.4.2.1.

A análise quantitativa e qualitativa dos mediadores lipídicos foi feita por MRM empregando a HPLC-MS/MS. A avaliação da biossíntese de eicosanoides nos demais voluntários (n = 19) e nos pacientes com AF (n = 9) foi feita seguindo o mesmo protocolo utilizando apenas o ionóforo A23187 e a tapsigargina, ambos a 20 μ M.

3.6. Contagem de células

Para contagem do número de células total e diferencial presentes no sangue periférico dos voluntários saudáveis, 2 mL do sangue foi coletado em tubos contendo EDTA e analisados no Cell-Dyn®3700 (Abbott, CHI, USA). O número de células totais e o número de plaquetas foram expressos como quantidade de células por microlitro de sangue enquanto as células diferenciais foram representadas como porcentagem de células em relação às células totais. Os dados apresentados referentes aos pacientes com AF foram retirados dos respectivos prontuários do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto.

3.7. Análise estatística

Os dados foram avaliados utilizando o *software* GraphPad Prism 5 (La Jolla, CA, USA). As diferenças entre os grupos e tratamentos do sangue *in vitro* foram avaliadas utilizando o teste ANOVA para comparações simples seguidos de Bonferroni para análise das diferenças entre os grupos. A comparação entre o grupo tratado com HU ou em transfusão sanguínea com o grupo de indivíduos saudáveis foi feita utilizando o teste t de *Student*. A significância estatística foi considerada para valores de $p < 0,05$.

*“O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada.
Caminhando e semeando, no fim terás o que colher.”*

Cora Coralina

4. RESULTADOS

4.1. Quantificação dos eicosanoides em amostras de plasma

4.1.1. Análise dos eicosanoides por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial

A quantificação de eicosanoides foi feita através da análise por HPLC-MS/MS após validação do método analítico desenvolvido por Petta, Moraes e Faccioli (2015), empregando o modo de varredura MRM. Foi feita a avaliação do perfil de eluição dos mediadores e adicionados ao método o 11-*trans*-LTD₄ e o padrão interno 12-epi-LTB₄-d₄. Os cromatogramas obtidos por LC-MS/MS de cada lipídio estão representados na Figura 4 enquanto que as transições de MRM, as voltagens do cone, as energias de colisão, bem como os valores de tempo de retenção estão descritos na Tabela 3.

Figura 4. Cromatogramas obtidos por HPLC-MS/MS para análise dos eicosanoides no modo MRM para 23 transições incluindo o padrão interno

Tabela 3. Parâmetros de Monitoramento de Reação Múltipla (MRM) e tempos de retenção dos eicosanoides

Eicosanoide	Transição de MRM (m/z)	Tempo de retenção (min)	Energia de colisão (eV)	Voltagem do cone (V)
20-OH-PGE ₂	367,1> 286,9	1,1	20,0	30,0
TXB ₂	369,1> 168,7	2,8	16,0	40,0
PGE ₂	351,2> 271,0	3,6	15,0	30,0
PGD ₂	351,2> 271,0	4,0	15,0	30,0
15-keto-PGE ₂	349,3> 113,0	4,2	20,0	25,0
LXA ₄	351,0> 114,9	4,6	20,0	35,0
11-trans-LTD ₄	495,2> 177,0	5,5	20,0	20,0
LTD ₄	495,2> 177,0	6,2	20,0	20,0
LTE ₄	438,1> 333,0	6,4	20,0	20,0
PGJ ₂	333,1> 171,1	6,4	14,0	40,0
6-trans-LTB ₄	335,1> 195,0	8,1	20,0	50,0
12- <i>epi</i> LTB ₄	339,1> 197,0	8,4	20,0	50,0
LTB ₄	335,1> 195,0	8,5	20,0	50,0
14,15-DHETrE	337,1> 206,9	9,8	18,0	40,0
11,12-DHETrE	337,1> 166,6	10,6	20,0	40,0
5, 6-DiHETE	335,2> 114,9	11,5	18,0	40,0
15-deoxi- $\Delta^{12,14}$ -PGJ ₂	315,0> 271,3	11,5	19,0	40,0
20-HETE	319,1> 289,1	11,9	15,0	40,0
15-HETE	319,1> 175,0	13,3	20,0	30,0
12-HETE	319,3> 179,0	13,7	20,0	30,0
5-HETE	319,1> 115,0	14,0	25,0	30,0
5-Oxo-ETE	317,1> 202,9	14,4	20,0	40,0
11(12)-EET	319,2> 166,0	14,5	18,0	40,0

4.1.2. Validação do método analítico

4.1.2.1. Recuperação

A eficiência de extração obtida após submeter os plasmas enriquecidos com uma concentração conhecida de cada eicosanoide e de PI aos três métodos de extração propostos está representada na Figura 5.

O método de extração que apresentou melhor eficiência em extrair os eicosanoides das amostras de plasma foi o desenvolvido em nosso laboratório (método 1). Resumidamente, as etapas deste método consistiram no condicionamento da coluna de extração com 2 mL de metanol e, posteriormente, com 2 mL de água contendo 0,1% de ácido acético. As amostras foram colocadas na coluna e, em seguida, foram adicionados 2 mL de água contendo 0,1% de ácido acético. Para eluição dos eicosanoides de interesse, foram utilizados 2 mL de metanol contendo 0,1% de ácido acético.

O método de extração desenvolvido em nosso laboratório apresentou maior porcentagem de recuperação para quase todos os mediadores lipídicos avaliados, principalmente para os LTs, LXA₄ e HETEs. Embora o terceiro método testado tenha demonstrado eficiência satisfatória para extração de prostanoides e alguns outros mediadores, como o 11,12-DHETrE, 14,15-DHETrE e o 5-oxo-ETE, ele não foi capaz de extrair os eicosanoides LTD₄, 11-trans-LTD₄, LTE₄ e 12-HETE, e recuperou em baixa porcentagem mediadores como os LTB₄, 6-trans-LTB₄ e LXA₄. Dessa forma, o método 1 foi adotado para todas as purificações de amostras de indivíduos saudáveis e com AF durante o presente estudo.

Figura 5. Padronização do método de extração em fase sólida para purificação de eicosanoides

Amostras de plasma humano ($n = 2$) foram fortificadas com 10 ng de cada eicosanoide e purificadas por SPE utilizando o método 1, como descrito no item 3.4.2.1. Todas as amostras foram analisadas por LC-MS/MS no modo MRM mostrado na Tabela 2. As eficiências de extração estão representadas pelas áreas dos picos obtidos nos cromatogramas. Os resultados estão expressos pela média $\pm$ desvio padrão da análise em quintuplicata.

4.1.2.2. Efeito de matriz

O efeito da matriz biológica (plasma) na resposta do analito ou do PI foi avaliado, em duas concentrações de cada eicosanoide, em oito amostras de diferentes plasmas, sendo quatro amostras de plasma normal, duas amostras de plasma lipêmico e outras duas amostras de plasma hemolisado.

O fator de matriz normalizado por PI (FMN) calculado para cada amostra está representado na Tabela 4. O coeficiente de variação (CV, %) dos FMNs relativos a todas as amostras foi inferior a 15%.

Tabela 4. Efeito de matriz (plasma) para quantificação de eicosanóides por HPLC-MS/MS em oito amostras de plasma diferentes (n = 8)

Eicosanoide	Efeito de matriz ^a (%)						
	Normal (n = 4)		Lipêmico (n = 2)		Hemolizado (n = 2)		(n = 8)
	CQB ^b	CQA ^c	CQB ^b	CQA ^c	CQB ^b	CQA ^c	CV ^d (%)
20-OH-PGE ₂	0,99	0,87	0,88	1,01	0,92	1,00	11,77
TXB ₂	1,00	1,03	1,17	0,98	1,04	0,94	6,93
PGE ₂	0,97	0,98	1,03	0,99	0,91	1,08	5,91
PGD ₂	1,03	1,02	0,93	1,04	0,93	1,02	6,26
15-keto-PGE ₂	1,04	0,98	0,95	1,03	1,04	1,02	6,40
LXA ₄	1,03	1,02	0,97	1,00	1,00	1,03	4,98
11-trans-LTD ₄	1,11	0,95	0,92	1,03	0,99	1,06	5,61
LTD ₄	1,02	0,98	0,99	1,02	0,99	0,97	4,54
LTE ₄	1,03	0,99	0,89	0,99	0,87	1,04	9,29
PGJ ₂	1,03	0,98	1,00	1,03	1,04	1,00	3,73
6-trans-LTB ₄	0,99	0,98	1,05	0,99	1,02	0,98	3,95
LTB ₄	0,99	0,99	1,03	1,02	0,95	0,92	6,47
14,15-DHET	1,08	0,99	1,25	0,94	0,96	1,08	11,14
11,12-DHET	0,97	1,00	1,06	1,09	0,99	0,99	5,62
5, 6-DiHETE	0,95	1,02	0,92	1,08	1,07	0,97	7,14
15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ ₂	1,03	0,97	0,99	0,97	0,96	1,05	4,36
20-HETE	1,02	1,04	1,05	0,97	0,98	1,06	4,54
15-HETE	1,39	1,22	1,69	1,24	1,29	1,21	12,14
12-HETE	0,95	1,02	1,02	0,97	> 8,00	0,97	7,16*
5-HETE	> 8,00	0,98	> 8,00	1,02	> 8,00	1,00	7,71*
5-OxoETE	0,94	0,94	0,94	0,94	0,92	0,93	5,15
11(12)-EET	1,01	1,01	1,03	1,12	1,04	0,93	10,56

* Valores superiores a 8,00 foram desconsiderados no cálculo do CV.

^aEfeito de matriz foi expresso pela relação (resposta do analito em plasma/resposta do PI em plasma)/(resposta do analito em solução metanólica/resposta do PI em solução metanólica). ^bCQB: Controle de Qualidade Baixo. ^cCQA: Controle de qualidade alto. ^dCV: Coeficiente de variação.

4.1.2.3. Linearidade

A linearidade foi determinada no intervalo de concentração de 5,0 - 75,0 ng/mL, em triplicata para todos os eicosanoides, plotando-se no eixo das abscissas a concentração plasmática e no eixo das ordenadas a razão entre as áreas de cada mediador e do PI. Para o 5-HETE, 12-HETE, LTB₄ e TXB₂ também foi determinada uma curva de linearidade na faixa de 75,0 - 1000,0 ng/mL.

Conforme preconizado pela ANVISA, para métodos bioanalíticos, os coeficientes de correlação (*r*) devem iguais ou superiores a 0,98. Como indicado na Tabela 5, os coeficientes de correlação obtidos para todos os eicosanoides avaliados foram maiores que 0,99, exceto para o 5-oxo-ETE e 11,12-EET, cujos valores foram maiores que 0,98, e os desvios dos valores nominais não foram superiores a 15% para todos os compostos. Os gráficos de linearidade estão representados nas Figuras 6.1 - 6.3.

Tabela 5. Linearidade e coeficiente de correlação (r) de cada analito

Eicosanoide	Linearidade (ng/mL) (n = 6)	Coeficiente de correlação (r)	Equação de regressão linear ^a
20-OH-PGE ₂	5,0 - 75,0	0,9998	y = 0,2666x + 0,4538
TXB ₂	5,0 - 75,0	0,9993	y = 0,1664x + 0,1140
	75,0 - 1000,0	0,9986	y = 0,2611x - 1,9448
PGE ₂	5,0 - 75,0	0,9985	y = 0,5815x + 1,2907
PGD ₂	5,0 - 75,0	0,9969	y = 0,1614x + 0,4880
15-keto-PGE ₂	5,0 - 75,0	0,9990	y = 0,1186x + 0,0111
LXA ₄	5,0 - 75,0	0,9990	y = 0,0370x + 0,0123
11-trans LTD ₄	5,0 - 75,0	0,9954	y = 0,0477x - 0,2003
LTD ₄	5,0 - 75,0	0,9945	y = 0,0485x - 0,0442
LTE ₄	5,0 - 75,0	0,9998	y = 0,2794x + 0,3108
PGJ ₂	5,0 - 75,0	0,9942	y = 0,2427x + 0,5461
6-trans LTB ₄	5,0 - 75,0	0,9998	y = 0,1886x - 0,5658
LTB ₄	5,0 - 75,0	0,9963	y = 0,1159x + 0,2190
	75,0 - 1000,0	0,9989	y = 0,1578x - 0,6077
14,15-DHET	5,0 - 75,0	0,9987	y = 0,3175x - 0,1381
11,12-DHET	5,0 - 75,0	0,9996	y = 0,5611x + 0,8887
5, 6-DiHETE	5,0 - 75,0	0,9905	y = 0,0774x + 0,0412
15-deoxy-Δ12,14- PGJ ₂	5,0 - 75,0	0,9992	y = 1,0675x + 0,9644
20-HETE	5,0 - 75,0	0,9995	y = 0,0738x - 0,0021
15-HETE	5,0 - 75,0	0,9991	y = 0,0324x + 0,0620
12-HETE	5,0 - 75,0	0,9991	y = 0,0460x + 0,3047
	75,0 - 1000,0	0,9959	y = 0,0437x - 1,5707
5-HETE	5,0 - 75,0	0,9993	y = 0,0305x - 0,0554
	75,0 - 1000,0	0,9946	y = 0,0187x + 0,9178
5-Oxo-EETE	5,0 - 75,0	0,9894	y = 0,0613x - 0,1901
11 (12)-EET	5,0 - 75,0	0,9893	y = 0,0447x - 0,1370

^a Curvas de calibração foram analisadas em triplicata (n = 3) para cada concentração: $y = Ax + B$, onde y corresponde à área do pico do analito, A ao coeficiente angular, B ao intercepto, e x à concentração da amostra mensurada em ng/mL

Figura 6.1. Gráficos de linearidade dos eicosanoides 5-HETE, 5-oxo-EET, 5,6-DiHETE, 11,12-DHET, 11 (12)-EET, 12-HETE e 14,15-DHET

As curvas de calibração foram analisadas em triplicata ($n = 3$) para cada concentração: $y = Ax + B$, onde y corresponde à área do pico do analito, A ao coeficiente angular, B ao intercepto, e x à concentração da amostra mensurada em ng/mL. ^aCorresponde à faixa de linearidade de 5,0 – 75,0 ng/mL.

^bCorresponde à faixa de linearidade de 75,0 – 1000,0 ng/mL.

Figura 6.2. Gráficos de linearidade dos eicosanoides 15-HETE, 20-HETE, LTB₄, 6-trans- LTB₄, LTD₄, 11-trans- LTD₄, LTE₄ e LXA₄

As curvas de calibração foram analisadas em triplicata ($n = 3$) para cada concentração: $y = Ax + B$, onde y corresponde à área do pico do analito, A ao coeficiente angular, B ao intercepto, e x à concentração da amostra mensurada em ng/mL. ^aCorresponde à faixa de linearidade de 5,0 – 75,0 ng/mL.

^bCorresponde à faixa de linearidade de 75,0 – 1000,0 ng/mL.

Figura 6.3. Gráficos de linearidade dos eicosanoides PGD₂, PGE₂, 15-Keto-PGE₂, 20-OH-PGE₂, PGJ₂, 15-deoxi-Δ^{12,14}-PGJ₂ e TXB₂

As curvas de calibração foram analisadas em triplicata (n = 3) para cada concentração: $y = Ax + B$, onde y corresponde à area do pico do analito, A ao coeficiente angular, B ao intercepto, e x à concentração da amostra mensurada em ng/mL. ^aCorresponde à faixa de linearidade de 5,0 – 75,0 ng/mL.

^bCorresponde à faixa de linearidade de 75,0 – 1000,0 ng/mL

4.1.2.4. Precisão e exatidão

A precisão e exatidão interensaio foram avaliadas em três dias diferentes enquanto que a precisão e exatidão intraensaio foram determinadas no mesmo dia. As amostras foram preparadas em quintuplicata, ou seja, a cinco amostras de um plasma branco foi adicionada uma alíquota de uma solução de concentração conhecida da mistura de eicosanoides, contemplando os níveis de concentração alto, médio e baixo da faixa linear do método (cinco réplicas para cada nível de concentração). De acordo com as Tabelas 6.1 - 6.3, os valores de CV (%) obtidos para precisão, bem como os valores de desvio em relação à concentração nominal encontrados para a exatidão, foram inferiores a 15% nos três níveis de concentração, como preconizado pela legislação vigente, a resolução 899 da ANVISA (ANVISA, 2012).

Tabela 6.1. Avaliação da precisão e exatidão intra e inter-dia de amostras de plasma para os metabólitos da via das lipoxigenases

Eicosanoide	Concentração nominal (ng/mL)	Intra-dia (n = 5) ^a			Inter-dia (n = 3) ^b		
		Mensurado (ng/mL)	CV (%) ^c	E (%) ^d	Mensurado (ng/mL)	CV (%) ^c	E (%) ^d
LXA ₄	15,0	16,24	3,60	8,24	16,21	15,15	8,10
	30,0	31,34	9,47	4,47	31,15	11,33	3,83
	50,0	48,42	4,46	-3,15	46,82	11,45	-6,35
6-trans LTB ₄	15,0	14,04	10,27	-6,38	13,70	12,50	-8,70
	30,0	30,07	4,16	2,45	30,40	12,90	1,34
	50,0	48,45	8,75	-3,10	50,29	12,25	0,58
LTB ₄	15,0	17,06	15,14	13,76	15,83	13,82	5,50
	30,0	26,63	5,87	-11,23	27,69	7,92	-7,68
	50,0	47,65	11,71	-4,71	47,30	9,11	-5,40
	150,0	153,73	2,51	2,48	155,09	4,53	4,53
	300,0	313,16	1,71	4,39	314,87	4,38	4,96
	800,0	791,51	2,21	-1,06	799,39	5,07	-0,08
LTD ₄	15,0	16,63	6,15	10,90	14,87	13,07	-0,88
	30,0	27,63	6,78	-7,89	29,70	10,25	-1,02
	50,0	54,98	8,36	9,95	52,21	11,54	4,41
11-trans LTD ₄	15,0	13,78	5,03	-8,08	14,73	14,65	-1,80
	30,0	28,76	13,16	-4,14	29,35	15,11	-2,17
	50,0	55,01	12,69	10,03	54,08	8,35	8,15
LTE ₄	15,0	14,54	5,08	-3,06	15,13	12,70	0,86
	30,0	29,94	2,31	-0,20	30,77	7,67	2,57
	50,0	51,47	5,34	2,94	51,40	4,67	2,80
5-HETE	7,5	7,46	3,90	-0,60	8,22	15,63	9,66
	30,0	29,90	9,23	-0,35	30,25	13,88	0,84
	50,0	48,13	12,50	-3,74	48,18	12,49	-3,64
	150,0	135,72	7,49	-9,52	155,38	13,94	3,59
	300,0	298,09	3,04	-0,64	291,55	3,21	-2,82
	800,0	753,16	4,64	-5,86	741,41	6,88	-7,32

5-Oxo-ETE	7,5	8,57	6,50	14,24	8,21	12,70	9,41
	30,0	27,46	10,64	-8,46	27,61	11,41	-7,97
	50,0	43,52	6,41	-12,96	48,81	15,48	-4,97
12-HETE	15,0	16,18	13,15	7,88	14,30	15,23	-4,64
	30,0	30,88	6,88	2,94	30,14	11,37	0,48
	50,0	48,11	9,54	-3,78	49,67	13,94	-0,66
	150,0	154,84	2,86	3,23	151,36	14,58	0,91
	300,0	286,76	6,48	-4,41	286,08	7,20	-4,64
	800,0	786,30	6,93	-1,71	772,31	5,05	-3,46
15-HETE	7,5	7,68	13,10	2,46	7,77	13,14	3,66
	30,0	32,29	5,82	7,65	30,63	12,26	2,12
	50,0	49,50	4,36	-1,00	51,97	8,69	3,94

^a Número de determinações. ^b Número de dias. ^c CV: Coeficiente de variação (%). ^d E: Erro (%).

Tabela 6.2. Avaliação da precisão e exatidão intra e inter-dia de amostras de plasma para os metabólitos da via das cicloxigenases

Eicosanoide	Concentração nominal (ng/mL)	Intra-dia (n = 5) ^a			Inter-dia (n = 3) ^b		
		Mensurado (ng/mL)	CV (%) ^c	E (%) ^d	Mensurado (ng/mL)	CV (%) ^c	E (%) ^d
PGD ₂	15,0	15,18	15,73	1,19	15,08	14,35	12,22
	30,0	34,41	13,46	14,71	29,62	13,36	-1,25
	50,0	49,26	10,85	-1,47	47,64	12,22	-4,71
PGE ₂	7,5	8,00	8,93	6,65	8,07	9,07	7,53
	30,0	32,65	7,76	8,83	30,25	10,38	0,83
	50,0	48,83	6,77	-2,35	47,80	11,00	-4,40
20-OH-PGE ₂	15,0	15,42	13,20	2,82	15,39	10,24	2,59
	30,0	30,01	10,91	0,04	30,49	11,42	1,63
	50,0	49,27	12,74	-1,15	56,74	9,57	-4,09
PGJ ₂	15,0	15,53	9,89	3,50	16,78	12,69	11,89
	30,0	28,88	6,53	-3,73	29,66	14,38	-1,12
	50,0	44,49	4,23	-11,02	47,24	11,59	-5,52
15-deoxy-Δ ^{12,14} -PGJ ₂	7,5	7,89	12,17	5,22	8,05	11,93	7,31
	30,0	28,66	12,46	-4,46	30,89	12,94	2,98
	50,0	46,93	8,87	-6,14	49,02	7,02	-1,85
15-keto-PGE ₂	15,0	14,66	8,77	-2,26	14,36	11,34	-4,29
	30,0	29,62	10,30	-1,28	29,64	11,45	-1,20
	50,0	48,08	10,60	-3,85	47,18	9,10	-5,63
TXB ₂	7,5	7,64	8,11	1,95	7,93	15,54	5,77
	30,0	31,19	6,93	3,95	33,31	9,18	11,05
	50,0	49,22	9,02	-1,56	48,99	7,42	-2,03
	150,0	143,15	3,07	-4,57	147,86	5,33	-1,42
	300,0	271,32	3,30	-9,56	277,00	14,17	-7,67
	800,0	807,66	1,54	0,96	782,13	4,26	-2,23

^a Número de determinações. ^b Número de dias. ^c CV: Coeficiente de variação (%). ^d E: Erro (%).

Tabela 6.3. Avaliação da precisão e exatidão intra e inter-dia de amostras de plasma para os metabólitos da via do P450

Eicosanoide	Concentração nominal (ng/mL)	Intra-dia (n = 5) ^a			Inter-dia (n = 3) ^b		
		Mensurado (ng/mL)	CV (%) ^c	E (%) ^d	Mensurado (ng/mL)	CV (%) ^c	E (%) ^d
20-HETE	15,0	14,91	6,05	-0,58	15,31	7,81	2,04
	30,0	31,42	3,29	4,73	15,31	5,38	1,47
	50,0	49,41	4,24	-1,18	50,06	7,68	0,11
11 (12)- EET	15,0	16,54	6,62	10,28	15,63	7,09	4,20
	30,0	25,71	10,86	-14,28	25,81	13,44	-13,96
	50,0	43,93	11,69	-12,14	44,96	11,40	-10,10
11,12-DHETrE	15,0	15,11	2,81	0,73	15,86	11,99	5,75
	30,0	28,85	7,61	-3,83	28,81	8,42	-3,96
	50,0	49,27	4,19	-1,45	50,19	3,85	0,39
14,15-DHETrE	7,5	7,96	12,35	6,08	8,25	8,03	9,98
	30,0	26,52	9,77	-11,59	30,25	13,83	0,82
	50,0	49,27	9,70	-1,46	48,25	10,60	3,52
5, 6-DiHETE	7,5	7,80	6,43	3,94	8,96	9,03	14,12
	30,0	30,50	2,35	1,67	28,29	8,83	-5,68
	50,0	42,83	11,82	-14,34	46,90	10,34	-6,20

^a Número de determinações. ^b Número de dias. ^c CV: Coeficiente de variação (%). ^d E: Erro (%).

4.1.2.5. Limite Inferior de Quantificação

O limite inferior de quantificação foi considerado a menor concentração da curva de linearidade (5,0 µg/mL). A Tabela 7 apresenta os valores de precisão e exatidão, representados pelo CV (%) e erro (%), respectivamente, menores que 20%, conforme preconizado pela ANVISA.

Tabela 7. Precisão e exatidão do limite de quantificação

Eicosanoide	Concentração nominal (ng/mL)	Intra-dia (n = 5) ^a			Inter-dia (n = 3) ^b		
		Mensurado (ng/mL)	CV (%) ^c	E (%) ^d	Mensurado (ng/mL)	CV (%) ^c	E (%) ^d
20-OH-PGE ₂	5,0	4,57	17,47	-9,35	5,46	18,76	9,13
TXB ₂	5,0	5,08	7,59	16,92	4,58	13,58	-8,32
PGE ₂	5,0	5,66	13,86	13,17	6,03	11,22	20,52
PGD ₂	5,0	4,88	12,59	-2,32	5,59	18,80	11,79
15-keto-PGE ₂	5,0	5,72	15,46	14,46	5,86	12,73	17,18
LXA ₄	5,0	3,90	6,64	-21,87	3,98	15,51	-20,31
11-trans LTD ₄	5,0	5,28	12,13	5,53	4,79	20,17	-4,52
LTD ₄	5,0	4,05	9,73	-19,02	4,81	21,14	-3,83
LTE ₄	5,0	5,46	13,88	9,25	4,85	13,93	-2,96
PGJ ₂	5,0	5,70	18,43	14,09	4,73	18,36	-5,30
6-trans LTB ₄	5,0	5,45	7,42	9,11	5,55	14,08	11,07
LTB ₄	5,0	5,30	7,66	6,06	5,38	13,50	7,63
14,15-DHETrE	5,0	5,56	11,61	11,30	6,04	8,02	20,80
11,12-DHETrE	5,0	5,47	6,01	9,59	5,04	20,80	8,85
5, 6-DiHETE	5,0	5,23	8,49	4,65	5,98	14,16	19,67
15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ ₂	5,0	5,56	10,46	11,24	4,96	16,59	-0,79
20-HETE	5,0	5,38	10,10	7,56	5,23	12,60	4,68
15-HETE	5,0	4,28	10,04	-14,30	5,12	20,54	2,47
12-HETE	5,0	4,83	15,35	-3,21	4,99	16,14	-0,01
5-HETE	5,0	5,08	10,97	1,65	4,82	19,47	-3,61
5-OxoETE	5,0	5,57	6,67	11,59	5,29	20,49	5,95
11 (12)-EET	5,0	5,66	11,75	13,13	5,63	9,92	12,72

^a Número de determinações. ^b Número de dias. ^c CV: Coeficiente de variação (%). ^d E: Erro (%).

4.2. Padronização do melhor estímulo do sangue periférico total para liberação dos eicosanoides

A padronização do melhor estímulo para produção de eicosanoides foi feita através da estimulação *in vitro* do sangue periférico total de indivíduos saudáveis (n = 4) com fMLP, ionomicina, ionóforo de cálcio A23187 ou tapsigargina, sendo o DMSO utilizado como controle negativo. Para cada um dos estímulos, foram utilizadas as concentrações de 10 e 20 μ M, sendo esta última capaz de liberar concentrações maiores de eicosanoides para todos os estímulos utilizados. Na Figura 7, é possível observar que o A23187 e a tapsigargina induziram a liberação da maioria dos mediadores lipídicos analisados e em maior concentração, sendo considerados os mais potentes indutores da biossíntese de eicosanoides quando comparados com os demais estímulos utilizados neste trabalho. Em contrapartida, o fMLP e a ionomicina não induziram significativamente a produção da maioria dos produtos em estudo. Importante ressaltar que alguns analitos não foram detectados na ausência dos estímulos.

Também é preciso relatar que a Figura 7 corresponde ao perfil de lipídeos produzido por um dos voluntários, mas representa o efeito dos estímulos nos demais indivíduos. Isso significa que embora cada indivíduo possa produzir determinados eicosanoides em variadas concentrações, o A23187 e a tapsigargina foram os melhores estímulos para todas as amostras testadas. Embora a tapsigargina tenha sido mais potente na liberação dos mediadores que o A23187, ambos foram selecionados para estimulação das células dos demais voluntários e pacientes do estudo, uma vez que o mecanismo de ação desses compostos é diferente.

Figura 7. Estímulos para liberação de eicosanoides por leucócitos totais de um voluntário sadio

Concentração de eicosanoides em plasma de um voluntário saudável após estimulação de 1 mL de sangue total com fMLP, ionomicina, A23187 ou tapsigargina (20 μM) por 20 minutos. Os gráficos demonstram a produção de 12 mediadores lipídicos diferentes. Os dados estão expressos pela média $\pm$ desvio padrão e representam a potência dos estímulos testados em quatro indivíduos saudáveis (n = 4). *p < 0,05 quando comparado com DMSO apenas. Esses valores são representativos da estimulação do sangue de quatro indivíduos.

4.3. Análise do lipidoma dos indivíduos saudáveis

4.3. 1. Características gerais dos voluntários saudáveis

Os indivíduos saudáveis consistiram em mulheres ($n = 15$) e homens ($n = 4$) com idade entre 23 e 58 anos. Foram coletados 2 mL de sangue total em tubos contendo EDTA para avaliação do hemograma pelo Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. O hemograma obtido de cada voluntário tinha a proposta de corrigir a produção de eicosanoides pelo número de células de cada indivíduo. Entretanto, após análise estatística, observamos que não havia correlação estatística entre a quantidade de células e os mediadores liberados após estimulação *in vitro* do sangue total. A Tabela 8 mostra que o hemograma desses voluntários apresenta contagens dentro dos limites aceitáveis de referência.

Tabela 8. Hemograma e informações dos voluntários saudáveis

Voluntário	Sexo	Idade (anos)	Peso (Kg)	Altura (m)	IMC (Kg/m ²)	WBC (K/uL)	Linfócitos (%)	Monócitos (%)	Neutrófilos (%)	Eosinófilos (%)	Basófilos (%)	Plaquetas (K/uL)
1	F	29	56	1,56	23,0	5,67	52,6	7,0	37,7	1,6	1,2	222
2	M	23	83	1,78	26,2	6,41	30,8	10,9	54,5	3,1	0,7	209
3	F	28	62	1,68	22,0	7,63	35,2	5,3	56,7	2,4	0,5	270
4	F	30	80	1,74	26,4	7,11	49,4	5,9	49,4	3,2	1,4	196
5	F	29	70	1,77	22,3	6,15	24,1	8,6	64,3	2,2	0,8	145
6	M	45	79	1,68	28,0	5,63	26,8	5,4	66,0	0,8	1,0	205
7	F	27	64	1,58	25,6	6,77	43,8	7,2	45,7	2,4	0,9	264
8	M	25	69	1,67	24,7	10,50	27,2	9,8	57,4	4,2	1,4	303
9	F	26	57	1,60	22,3	5,06	40,8	7,2	48,7	2,5	0,7	223
10	M	27	80	1,87	22,9	8,91	26,7	6,9	61,9	3,7	0,8	168
11	F	29	48	1,56	19,7	5,38	36,0	5,6	54,9	3,3	0,3	138
12	F	58	69	1,62	26,3	4,95	40,4	8,8	46,0	3,6	1,2	248
13	F	29	58	1,63	21,8	5,19	44,5	4,4	48,6	1,5	1,0	205
14	F	28	70	1,62	26,7	5,22	29,8	5,4	62,5	1,3	1,1	221
15	F	33	62	1,65	22,8	4,43	28,0	7,7	58,9	4,1	1,2	157
16	F	29	55	1,65	20,2	6,59	40,5	7,7	49,0	2,1	0,7	220
17	F	32	49	1,56	20,1	11,10	13,8	2,6	82,6	0,3	0,7	227
18	F	24	45	1,57	18,3	3,85	38,0	6,6	54,1	1,0	0,3	168
19	F	32	60	1,71	20,5	5,00	13,2	20,1		66,7 *		243
Média	-	31	64	1,66	23,1	6,39	33,7	7,5	55,5	2,4	0,9	212

WBC = Leucócitos totais (do ingles, *White blood cell*); IMC = Índice de massa corpórea. *Este valor representa a porcentagem de células polimorfonucleares totais deste voluntário e não foi considerado no cálculo da média.

4.3.2. Análise qualitativa e quantitativa de eicosanoides em plasma de indivíduos saudáveis

Após a validação do método analítico e padronização do melhor estímulo do sangue periférico total, avaliamos a capacidade de biossíntese de eicosanoides pelos demais voluntários ($n = 19$) utilizando apenas o ionóforo A23187 e a tapsigargina ($20 \mu\text{M}$), pois estes apresentaram maior potência. Os resultados obtidos estão representados nas Figuras 8.1 - 8.3 e demonstram que os metabólitos da via das LOXs, como os LTs e HETEs, foram produzidos em concentrações mais elevadas após a estimulação do sangue periférico total, embora alguns produtos da via das COXs, como PGD_2 , PGE_2 e TXB_2 , também estejam aumentados. As concentrações médias e desvios padrões obtidos para cada eicosanoide após incubação do sangue com A23187 ou tapsigargina foram, respectivamente: $188,0 \pm 74,9$ e $281,4 \pm 156,0$ ng/mL para o LTB_4 ; $42,8 \pm 47,2$ e $41,8 \pm 36,3$ ng/mL para o 6-trans- LTB_4 ; $8,2 \pm 6,1$ e $9,1 \pm 7,7$ ng/mL para o LTD_4 ; $18,3 \pm 14,7$ e $28,9 \pm 21,3$ ng/mL para o LTE_4 ; $227,3 \pm 290,8$ e $767,0 \pm 1209,1$ ng/mL para o TXB_2 ; $182,2 \pm 93,9$ e $201,8 \pm 118,4$ ng/mL para o 5-HETE; $11,0 \pm 7,4$ e $57,0 \pm 187,8$ ng/mL para o 5-Oxo-ETE; $842,0 \pm 475,5$ e maior que 1000,0 ng/mL para o 12-HETE; $18,1 \pm 18,6$ e $39,3 \pm 18,7$ ng/mL para o 15-HETE; e $8,3 \pm 3,5$ e $11,2 \pm 4,9$ ng/mL para o 5,6-DiHETE. Alguns eicosanoides, tais como 11-trans- LTD_4 , 15-keto- PGE_2 , PGJ_2 , 11,12-DHET e 14,15-DHET foram produzidos em quantidades menores que o LIQ por todos os voluntários, após ambos os estímulos. Com relação aos mediadores 20-OH- PGE_2 , 15-deoxi- $\Delta^{12,14}$ - PGJ_2 e 11(12)-EET, observamos que apenas o sangue de alguns voluntários apresentaram produção significativa dos mesmos. Por fim, embora as PGD_2 e PGE_2 tenham sido produzidas por células estimuladas com tapsigargina, apresentando concentração média e coeficiente de correlação de $12,3 \pm 26,3$ e $31,0 \pm 59,0$ ng/mL, respectivamente, a estimulação com A23187 induziu produção menor que o LIQ.

Figura 8.1. Concentração dos eicosanoides LTB₄, 6-trans-LTB₄, LTD₄, 11-trans-LTD₄ e LTE₄ em plasma de indivíduos saudáveis após estimulação *in vitro* O volume de 1 mL de sangue periférico total (n = 19) foi estimulado com A23187 ou tapsigargina (20 µM, por 20 minutos) e os eicosanoides foram quantificados por HPLC-MS/MS após extração por SPE. Amostras não estimuladas (Dimetil sulfóxido, DMSO) foram utilizadas como controle negativo de produção; **p* < 0,05 quando comparado com DMSO apenas.

Figura 8.2. Concentração dos eicosanoides PGD₂, PGE₂, 20-OH-PGE₂ e TXB₂ em plasma de indivíduos saudáveis após estimulação *in vitro*

O volume de 1 mL de sangue periférico total (n = 19) foi estimulado com A23187 ou tapsigargina (20 µM, por 20 minutos) e os eicosanoides foram quantificados por HPLC-MS/MS após extração por SPE. Amostras não estimuladas (Dimetil sulfóxido, DMSO) foram utilizadas como controle negativo de produção; **p* < 0,05 quando comparado com DMSO apenas.

Figura 8.3. Concentração dos eicosanoides 5-oxo-ETE, 5-HETE, 11 (12)-EET, 12-HETE, 15-HETE e 5,6-DiHETE em plasma de indivíduos saudáveis após estimulação *in vitro*

O volume de 1 mL de sangue periférico total ($n = 19$) foi estimulado com A23187 ou tapsigargina ($20 \mu\text{M}$, por 20 minutos) e os eicosanoides foram quantificados por HPLC-MS/MS após extração por SPE. Amostras não estimuladas (Dimetil sulfóxido, DMSO) foram utilizadas como controle negativo de produção; $*p < 0,05$ quando comparado com DMSO apenas.

4.4. Determinação do lipidoma dos pacientes com anemia falciforme

4.4.1. Hemograma e informações clínicas dos pacientes

A fim de demonstrar que o nosso método é apropriado para determinação do perfil de mediadores lipídicos em leucócitos do sangue total, obtivemos células de pacientes com anemia falciforme, em tratamento com HU (n = 5) ou transfusão sanguínea crônica (n = 4). Esses pacientes apresentaram idade entre 11 e 36 anos, sendo 5 mulheres e 4 homens. Os dados obtidos nos prontuários dos pacientes do sistema do Hospital das Clínicas referentes aos exames realizados no mesmo dia da nossa coleta estão representados na Tabela 9. A contagem de células totais e diferenciais demonstra que não há diferenças relevantes quando comparados com os saudáveis. Entretanto, ressaltamos que o número de pacientes com AF recrutados foi pequeno para que possamos inferir conclusões sobre esses dados.

Tabela 9. Hemograma e informações dos pacientes com AF em tratamento com HU ou com transfusão crônica de hemácias

Parâmetro	Transfusão	HU
Masculino/Feminino	2/2	2/3
Idade (anos)	20,7 (19 e 26; 11; 27)	26,6 (28;11;36)
Hemácias ($10^6/\mu\text{L}$)	2,8 (2,62 e 2,63; 2,61; 3,12)	2,5 (2,6; 2,0;2,8)
Hematócrito (%)	25,5 (25; 25; 27)	29,6 (29; 24; 35)
Hemoglobina (g/dL)	8,5 (8,1 e 8,8; 7,9; 9)	9,9 (9,6; 8,2;12)
Volume corpuscular médio (fl)	92,7 (94 e 95; 87; 95)	115,0 (115; 106; 123)
Hemoglobina corpuscular média (pg)	30,9 (30,2 e 31; 28,8; 33,5)	38,6 (39;35;42)
WBC ($10^6/\mu\text{L}$)	11,0 (11,3 e 12,2; 8,1; 12,6)	8,4 (8; 6; 13)
Monócitos (%)	6,8 (6,4 e 8,2; 3,6; 8,8)	6,1 (5,1; 4,9; 9,9)
Linfócitos (%)	30,7 (33,7 e 36,2; 15,8; 37)	29,2 (22,1; 18,8; 45,3)
Neutrófilos (%)	57,8 (52,1 e 57,3; 52,1; 78,4)	63,4 (70,4; 47,4; 75,4)
Eosinófilos (%)	4,5 (4,4 e 2,8; 2,0;10,8)	1,0 (0,8; 0,5; 1,5)
Basófilos (%)	0,3 (0,2; 0,1; 0,7)	0,3 (0,2; 0,1; 0,4)
Plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$)	575,0 (525 e 558; 524; 693)	307,0 (259; 230; 402)
Dose de HU (mg/kg/dia)	-	26,4 (26; 22; 32)

AF, Anemia Falciforme; HU, Hidroxiuréia; WBC, (do inglês, White Blood Cells) Glóbulos brancos totais. Os dados apresentados (exceto Masculino/Feminino) correspondem à média (mediana, mínimo, máximo).

4.4.2. Análise qualitativa e quantitativa de eicosanoides em plasma de sangue total (estimulado *in vitro*) de pacientes com anemia falciforme

Os resultados que comparam a produção de eicosanoides por células de indivíduos saudáveis com aquelas de pacientes com AF em tratamento com HU ou transfusão sanguínea crônica estão representados nas Figuras 9.1 - 9.3. Os dados mostram que, quando comparados com os indivíduos saudáveis, os pacientes tratados com HU produzem menores concentrações de LTB₄, 5-HETE e 5,6-DiHETE após estimulação das células com ambos estímulos, enquanto que os pacientes em tratamento com transfusão sanguínea crônica apresentaram aumento de 5,6-DiHETE e LTE₄. Também foi observado aumento na concentração de PGE₂ em amostras dos pacientes com AF em tratamento com HU, após o estímulo com A23187 e também nas não estimuladas (DMSO).

Os pacientes tratados com HU também apresentaram menor produção de 12-HETE e TXB₂ após estimulação com taspigargina, sendo o mesmo fenômeno observado naqueles submetidos à transfusão e estimulados com A23187.

Por fim, houve diferenças significativas nas concentrações de 5-HETE, 5,6-DiHETE, e LTE₄ entre os grupos tratados (HU e transfusão) após estimulação com ambos compostos. Para o LTB₄ e PGE₂, apenas a taspigargina ou A23187, respectivamente, apresentaram diferenças na indução da produção de eicosanoides entre os grupos de tratamento.

Figura 9.1. Comparação das concentrações dos eicosanoides 5-HETE, 12-HETE e 5,6-DiHETE em plasma de indivíduos saudáveis e em pacientes com anemia falciforme em tratamento com hidroxiureia ou transfusão sanguínea crônica após estimulação do sangue periférico total *in vitro*

A concentração de eicosanoides em plasma de indivíduos saudáveis e pacientes com AF em tratamento com HU ou transfusão sanguínea crônica após estimulação *in vitro* do sangue periférico total com A23187 (B, E e H) ou tapsigargina (C, F e I). Amostras não estimuladas (dimetil sulfóxido; DMSO) foram utilizadas para comparação (A, D e G); * $p < 0,05$ comparado com o DMSO.

Figura 9.2. Comparação das concentrações dos eicosanoides LTB₄ e LTE₄ em plasma de indivíduos saudáveis e em pacientes com anemia falciforme em tratamento com hidroxiureia ou transfusão sanguínea crônica após estimulação do sangue periférico total *in vitro*

A concentração de eicosanoides em plasma de indivíduos saudáveis e pacientes com AF em tratamento com HU ou transfusão sanguínea crônica após estimulação *in vitro* do sangue periférico total com A23187 (B e E) ou tapsigargina (C e F). Amostras não estimuladas (dimetil sulfóxido; DMSO) foram utilizadas para comparação (A e D); * $p < 0,05$ comparado com o DMSO.

Figura 9.3. Comparação das concentrações dos eicosanoides TXB₂ e PGE₂ em plasma de indivíduos saudáveis e em pacientes com anemia falciforme em tratamento com hidroxiureia ou transfusão sanguínea crônica após estimulação do sangue periférico total *in vitro*

A concentração de eicosanoides em plasma de indivíduos saudáveis e pacientes com AF em tratamento com HU ou transfusão sanguínea crônica após estimulação *in vitro* do sangue periférico total com A23187 (B e E) ou tapsigargina (C e F). Amostras não estimuladas (dimetil sulfóxido; DMSO) foram utilizadas para comparação (A e D); * $p < 0,05$ comparado com o DMSO.

*“A lei da mente é implacável.
O que você pensa, você cria;
O que você sente, você atrai;
O que você acredita, torna-se realidade”
Buda*

5. DISCUSSÃO

5.1. Validação do método

Validação de um método analítico é o processo pelo qual é estabelecido, por estudos laboratoriais, que as características de desempenho do método estão de acordo com as exigências para a aplicação analítica desejada (RIBANI et al., 2004). Os parâmetros de recuperação, efeito de matriz, linearidade, limite inferior de quantificação, precisão e exatidão foram validados neste trabalho de acordo com os valores preconizados pela ANVISA, sendo nosso método considerado adequado para determinação de eicosanoides em amostras de plasma.

5.1.1. Recuperação

O preparo de amostra, também conhecido como tratamento da amostra, *clean-up* ou extração, é parte integral do método bioanalítico. A matriz biológica, como sangue, plasma, urina, entre outros, apresenta uma natureza bioquímica complexa por compreender inúmeros compostos (KOLE et al., 2011). O pré-tratamento de amostras biológicas é requerido nas análises quali e quantitativas a fim de eliminar interferentes (compostos endógenos ou outros compostos administrados concomitantemente com os analitos) e aumentar a detectabilidade e seletividade analítica (KRISHNAN, IBRAHAM, 1994). Dessa forma, o preparo da amostra visa ao isolamento seletivo do soluto de interesse da matriz e a minimização ou eliminação dos componentes da matriz na amostra processada (KOLE et al., 2011). Um método de extração ideal deve ser rápido, simples, de custos reduzidos, e promover recuperações altas e reprodutíveis sem degradar o analito de interesse. Além disso, o método de extração não deve gerar grandes quantidades de resíduos químicos (Van HOUT et al., 2003).

Neste trabalho, os eicosanoides foram extraídos do plasma por SPE após precipitação de proteínas com solvente orgânico (ACN: MeOH, 1:1, v/v, 4 °C). Na SPE são empregados colunas ou cartuchos de plástico que geralmente apresentam um sorvente à base de sílica modificada. Segundo este procedimento, a coluna deve ser previamente condicionada, ou seja, ativada. A seguir, a amostra é aplicada e a coluna é lavada para eliminar as impurezas retidas durante a aplicação. Após a lavagem, o analito é eluído com o solvente adequado (POOLE et al., 2000).

A recuperação corresponde à medida da eficiência do procedimento de extração de um método analítico e é obtida comparando-se os resultados de amostras branco (plasma) acrescidas de padrão e submetidas ao processo de

extração, com os resultados analíticos de soluções-padrão não extraídas, as quais representam 100 % de recuperação (ANVISA, 2012).

Neste trabalho, propusemos três métodos de purificação dos mediadores lipídicos em amostras de plasma humano. Conforme demonstrado na Figura 5, o método 1 apresentou maior eficiência de extração dos analitos quando comparado com os outros métodos aplicados. Uma combinação de fatores pode ter contribuído para a melhor eficiência do método 1, tais como a adição de 0,1% de ácido acético nas etapas de ativação e de lavagem do cartucho de SPE, que levou a uma maior retenção dos eicosanoides na coluna de extração, uma vez que, por serem ácidos carboxílicos, se mantiveram na forma não-iônica (apolar). Outro fator pode estar relacionado com a força de eluição do MeOH contendo ácido acético a 0,1%, que foi um solvente eficiente para solubilizar os ácidos e removê-los do cartucho.

Embora o 5- oxo-ETE, a PGE_2 , a 15-keto- PGE_2 , a 20-OH- PGE_2 e o 11,12-DHETre foram extraídos com melhor eficiência pelo método 3 de purificação, essa diferença na eficiência de recuperação para esses analitos, em comparação com o método 1, não foi significativa. Martins e Pontarolo (2013) testaram 10 métodos de extração para PDE_2 e PGE_2 por SPE e demonstraram que esses compostos foram extraídos com eficiência de aproximadamente 54 e 60, respectivamente, quando o acetato de etila foi utilizado como solvente de eluição, o que foi justificado pela baixa polaridade do solvente utilizado. Os valores obtidos por esses autores para ambos os eicosanoides foram bem próximos dos que apresentamos no presente trabalho (Figura 5) quando aplicado o método de extração 3, em que o acetato de etila também é utilizado na etapa de eluição. Entretanto, como método 3 não foi eficiente na recuperação de vários LTs, compostos de grande interesse na avaliação de doenças, esse método não foi considerado satisfatório.

Portanto, por ser eficiente, reproduzível, rápido e utilizar pouco solvente, o método escolhido para tratamento de todas as amostras foi o método 1.

5.1.2. Efeito de matriz

Efeito de matriz é um estudo de seletividade que permite avaliar possíveis interferências causadas pelas substâncias que compõem a matriz amostral, gerando fenômenos de diminuição ou ampliação da resposta instrumental. Embora o mecanismo exato do efeito de matriz seja desconhecido, alguns autores relatam que

esse efeito se deve à competição entre o analito e a coeluição de um componente da matriz não monitorado.

Neste trabalho, avaliamos o efeito de matriz pelo método pós-extração, em que as respostas obtidas para as amostras cujos analitos de interesse foram adicionados pós-extração são comparadas com as respectivas soluções metanólicas (não extraídas), sob as mesmas condições. A relação entre a resposta da amostra pós-extração e a resposta da solução preparada em solvente determina o grau do efeito de matriz.

O valor FMN, calculado para cada amostra conforme descrito no item 3.4.2.2., quando igual a 1, significa que nenhum efeito de matriz é observado; menor que 1 sugere supressão de ionização, enquanto que maior que 1 pode indicar aumento na ionização.

Nossos resultados demonstraram que não há nenhum efeito de matriz significativo, com exceção do 5-HETE e do 12-HETE, cujas amostras de CQB de plasma normal e de CQB hemolizado, respectivamente, apresentaram FMN superior a 800, indicando que a matriz interferiu aumentando a ionização desses compostos. Considerando que esses mediadores são encontrados em concentrações elevadas nas amostras analisadas e que o efeito de matriz foi observado nas amostras menos concentradas, não houve interferência em nossas análises.

5.1.3. Precisão e exatidão

A precisão representa o grau de repetibilidade entre análises individuais, quando o procedimento é aplicado diversas vezes em uma amostra homogênea, sob as mesmas condições de ensaio. O termo precisão descreve a distribuição de resultados individuais ao redor de suas médias, sendo expressa como porcentagem do coeficiente de variação (% CV) ou como o desvio padrão relativo das replicatas (ANVISA, 2012).

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados e um valor aceito como referência (ANVISA, 2012). É expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente.

A precisão e exatidão interensaio foram avaliadas em três dias consecutivos, enquanto que a precisão e exatidão intraensaio foram avaliadas no mesmo dia. Para os dois parâmetros, as amostras foram preparadas em quintuplicata, contemplando os

níveis de concentração alto, médio e baixo da faixa de linearidade do método. Como pode ser visto nas Tabelas 5.1 - 5.3, os valores de CV (%) obtidos nos ensaios de precisão, bem como os valores de desvio em relação à concentração nominal encontrados para exatidão, foram inferiores a 15 % nos três níveis de concentração, conforme preconizado pela legislação vigente, a resolução 27 da ANVISA (ANVISA, 2012), indicando que nosso método é preciso e exato.

5.1.4. Linearidade e limite inferior de quantificação

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito de interesse, dentro de uma determinada faixa de aplicação. (RIBANI et al., 2004).

Conforme preconizado pela ANVISA, para métodos bioanalíticos, os valores apresentados na Tabela 4 são aceitáveis para linearidade, uma vez que os coeficientes de correlação são iguais ou superiores a 0,98 e os desvios dos valores nominais não são superiores a 15%.

O limite de quantificação corresponde à menor concentração quantificável do analito em uma amostra com precisão e exatidão iguais ou superiores a 20% (ANVISA, 2012). De acordo com os resultados apresentados na Tabela 5, o limite de quantificação para todos os analitos foi considerado a menor concentração da curva de linearidade (5,0 ng/mL) e apresenta valores de precisão e exatidão aceitáveis. Esse limite de quantificação é adequado para aplicação do método, uma vez que nas alterações fisiopatológicas a concentração plasmática média esperada para os analitos após estimulação do sangue periférico total é superior a este valor.

5.2. Estimulação do sangue periférico total

A determinação da melhor condição de estimulação do sangue periférico total para produção de eicosanoides foi feita testando quatro estímulos, em duas concentrações, sendo o A231897 e a tapsigargina selecionados por serem os indutores mais potentes e por apresentarem mecanismos de ação distintos. Enquanto os iononóforos como o A23187 promovem um aumento prolongado das concentrações intracelulares de Ca^{2+} , induzindo a translocação massiva da 5-LO e cPLA₂ do citosol para a membrana nuclear, a tapsigargina atua pela inibição da Ca^{2+} ATPase, promovendo acúmulo de Ca^{2+} intracelular (FLAMAND et al., 2000). A habilidade dos dois compostos em induzirem a liberação de eicosanoides corroboram

com dados da literatura. Malcolm e Fitzpatrick (1992) observaram que a taspigargina induz a produção de TXB_2 em plaquetas humanas de modo dose-dependente. Balter et al. (1988) avaliaram a síntese de eicosanoides por macrófagos alveolares de indivíduos asmáticos e notaram que, após a estimulação celular com 10 μM de A23187, as concentrações de LTB_4 , LTC_4 , TXB_2 , PGD_2 e PGE_2 foram maiores quando comparadas com as amostras não estimuladas. Surette et al. (1994) quantificaram, em amostras de plasma, metabólitos do ácido araquidônico como LTB_4 , 5-HETE, 20-OH- LTB_4 , 20-carboxy- LTB_4 e 12-HETE, produzidos por leucócitos e plaquetas após estimulação *in vitro* com A23187. Também Lin et al. (2013) demonstraram que a concentração de LTB_4 em plasma humano é maior após estimulação com A23187 quando comparada com amostras não estimuladas. Além disso, demonstramos que alguns analitos não foram detectados na ausência do estímulo, confirmando a importância do uso dos agentes farmacológicos adequados como ferramenta para o estudo da capacidade das células em produzir eicosanoides.

5.3. Análise qualitativa e quantitativa de eicosanoides em plasma de indivíduos saudáveis e dos pacientes com anemia falciforme

Os eicosanoides são produzidos em diversas patologias. Nosso grupo de pesquisa tem contribuído para o entendimento do papel dos LTs e PGs nos mecanismos de defesa do hospedeiro em várias infecções como tuberculose, histoplasmoses, parasitoses, Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), Vírus Linfotrópico - T Tipo I Humano (HTLV-1) e sepse (SOARES et al., 2013; TRINDADE et al., 2012; SECATTO et al., 2012; CARLOS et al., 2011; BUZALAF et al., 2011; MACHADO et al., 2010; SORGI et al., 2009; MEDEIROS et al., 2008; PERES et al., 2007; MACHADO et al., 2005; MEDEIROS et al., 2004; MEDEIROS et al., 1999). Em quatro destes artigos demonstramos que alguns desses eicosanoides são produzidos por células de humanos (SORGI et al., 2009; TRINDADE et al., 2012; SOARES et al., 2013; STARLING et al., 2015). Naquele publicado por Sorgi et al. (2009), a produção de LTB_4 e PGE_2 foi quantificada e comparada em células de indivíduos normais e de pacientes infectados pelo HIV após estímulo com β -glucana. No publicado por Trindade et al. (2012), foi demonstrado que os produtos originados da 5-LO estão aumentados em plasma de pacientes infectados pelo HTLV-1 quando comparado com amostras de indivíduos não-infectados. Além disso, foi relatado que o CysLT pode ser

utilizado como biomarcador nesta infecção. Ainda se tratando de pacientes com HTLV-1, Starling et al. (2015) estratificaram os pacientes em diferentes estágios clínicos da doença e relataram que o LTB₄ e CysLT constituem o painel de biomarcadores sugerido para seguimento e diagnóstico da referida patologia. Por fim, naquele publicado por Soraes et al. (2013), foi observado que o LTB₄ aumenta a fagocitose e *killing* da bactéria *Streptococcus pyogenes* não opsonizada por macrófagos primários humanos do sistema reprodutor feminino. Apesar da importância dos mediadores lipídicos em diversas patologias e do emprego crescente da LC-MS/MS em estudos biológicos, não existe nenhum trabalho na literatura que busca estabelecer o perfil de produção desses mediadores em indivíduos saudáveis.

Nesse contexto, nosso trabalho mostrou que dependendo do indivíduo e da doença, as células estimuladas de pacientes podem produzir um perfil diferente de eicosanoides, qualitativa e quantitativamente, quando comparadas com as dos indivíduos saudáveis.

A Figura 10 compara o perfil lipídico dos indivíduos saudáveis com o de pacientes com AF em tratamento com HU ou transfusão sanguínea, mostrando que o A23187 e a tapsigargina induzem um perfil de eicosanoides semelhante. Nos indivíduos saudáveis, LTB₄, 5-HETE, 12-HETE e TXB₂ são os mediadores lipídicos liberados em maior concentração após estimulação. Também é possível observar que indivíduos saudáveis e pacientes com AF em ambos os tratamentos apresentam diferenças no perfil de eicosanoides após estimulação com A23187 ou tapsigargina, bem como nas amostras não estimuladas.

Figura 10. Comparação do perfil de produção de eicosanoides após a estimulação do sangue periférico total *in vitro* em indivíduos saudáveis e pacientes com AF em tratamento

Concentrações médias de eicosanoides produzidos por leucócitos totais de voluntários saudáveis e pacientes com anemia falciforme em tratamento com HU ou transfusão sanguínea crônica após estimulação do sangue periférico total *in vitro* com A23187 (B, E e H) ou tapsigargina (C, F e I). Amostras de sangue não estimulado (Dimetil sulfóxido; DMSO) foram utilizadas para comparação (A, D e G).

Os dados mostram que, após a estimulação das células com ambos estímulos, os pacientes com AF tratados com HU produzem menores concentrações de LTB₄, 5-HETE e 5,6-DiHETE quando comparados com indivíduos saudáveis. Esses resultados são extremamente interessantes uma vez que o LTB₄ induz adesão leucocitária ao endotélio (LIN et al., 2013; LINDSTROM et al., 1990) e aumenta a expressão de moléculas de adesão em leucócitos (PALMBLAD & LERNER, 1992). A baixa produção desse mediador nesses pacientes tratados pode contribuir para a diminuição da expressão de moléculas de adesão bem como para o comprometimento da capacidade de adesão das células falciformes observada

nesses indivíduos (SILVA-PINTO et al., 2013). Por outro lado, pacientes tratados com transfusão sanguínea crônica apresentaram aumento na produção de 5,6-DiHETE e LTE₄, quando comparados com indivíduos saudáveis após estimulação com A23187 e taspigargina. Field et al. (2009) relataram aumento na concentração de LTE₄ na urina de pacientes com AF durante as crises de dor, e sugeriram o uso de terapia antileucotrieno para tratamento dos eventos vaso-oclusivos na AF.

Com relação à PGE₂, observamos aumento significativo nas concentrações plasmáticas após estimulação com A23187 e em amostras não estimuladas de pacientes em tratamento com HU. Embora na literatura existam dois trabalhos demonstrando o aumento desse mediador em pacientes com AF e sugerindo que a PGE₂ participa da patogênese da AF (ZAGO, SILVA-PINTO, 2007; GRAIDO-GONZALEZ et al., 2015), são necessárias mais investigações para determinar a importância desse resultado.

Os pacientes com AF também demonstraram diminuição na produção de 12-HETE e TXB₂ após estimulação com taspigargina e A23187, para os pacientes em tratamento com HU e transfusão, respectivamente. Embora o significado desses achados requeira maiores investigações, Setty et al. (1995) relataram que o 12-HETE estimula a adesão de eritrócitos falciformes ao endotélio e que sua concentração está aumentada no plasma e na urina de crianças com AF.

Além disso, observamos que, após estimulação com ambos os compostos, há diferenças significativas na produção de 5-HETE, 5,6-DiHETE e LTE₄ entre os grupos de pacientes tratados (HU ou transfusão). Para o LTB₄ e PGE₂, diferenças foram notadas apenas após estimulação com taspigargina ou A23187, respectivamente. Embora o número de pacientes por grupo seja pequeno, esses resultados indicam que dependendo do seguimento terapêutico adotado há diferenças no perfil de eicosanoides produzido.

Portanto, nosso método é uma ferramenta promissora para avaliar diferenças na produção de mediadores lipídicos, permitindo compreender o papel desses compostos em diferentes doenças.

*‘Tudo o que é seu encontrará uma
maneira de chegar até você’*

Chico Xavier

6. CONCLUSÕES

A estimulação do sangue periférico total é uma etapa essencial para a análise do lipidoma em plasma humano, pois permite avaliar o potencial de produção de eicosanoides de cada indivíduo. Neste trabalho, demonstramos a importância de selecionar uma ferramenta farmacológica apropriada e sua concentração ideal para avaliar a produção de mediadores lipídicos, uma vez que não foi possível identificar e quantificar todos os eicosanoides em estudo quando as amostras não foram estimuladas. Para isso, aperfeiçoamos um método de liberação de eicosanoides em sangue periférico total testando quatro estímulos em duas concentrações e observamos que o A23187 e a tapsigargina foram os estímulos mais potentes para produção e ou/liberação dos mediadores, principalmente dos produtos da 5-LO.

O procedimento de preparo da amostra foi baseado na extração em fase sólida, onde comparamos três métodos de purificação dos eicosanoides, e demonstramos que o método desenvolvido em nosso laboratório apresentou recuperação satisfatória para os analitos de interesse em plasma, principalmente para os LTs, HETEs e LXA₄. O método proposto para identificação e quantificação simultânea de 22 eicosanoides em plasma humano por HPLC-MS/MS foi validado com sucesso, uma vez que os parâmetros de desempenho analítico, linearidade, precisão, exatidão, recuperação, limite de quantificação e efeito de matriz, cumpriram os requisitos preconizados pela legislação vigente para métodos bioanalíticos, a Resolução 899 da ANVISA (2012).

Além disso, o método foi aplicado na determinação do lipidoma em plasma de indivíduos saudáveis após estimulação do sangue periférico total. Nesse contexto, observamos que, em geral, os indivíduos apresentaram um perfil de produção de eicosanoides semelhante, embora tenham sido observadas algumas diferenças significativas na concentração de mediadores.

Para demonstrar que nosso método poderia ser aplicado na avaliação da produção de mediadores lipídicos em diferentes modelos de doenças, quantificamos os eicosanoides em estudo em pacientes com AF em tratamento com HU ou transfusão sanguínea crônica após estimulação *in vitro* dos leucócitos totais e observamos diferenças no perfil lipídico produzido quando comparado com indivíduos saudáveis. Dessa forma, acreditamos que nosso método é uma importante estratégia para determinação do perfil de mediadores lipídicos em diversos grupos de pessoas (ou pacientes) e assim ajudar elucidar o papel dos eicosanoides na saúde e em diversas patologias.

*“Cada sonho que você deixa para trás, é
um pedaço do seu futuro que deixa
de existir.”*

Steve Jobs

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R. J.; BRAMBILLA, D. Discontinuing prophylactic transfusions used to prevent stroke in sickle cell disease. **N Engl J Med**, v. 353 (26), p. 2769-2778, 2005.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). Resolução – RDC n.º 27, de 17 de maio de 2012 – Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. Diário oficial da União, 22 de maio de 2012.

ALBA-LOUREIRO, T.C.; MARTINS, E.F.; MIYASAKA, C.K.; LOPES, L.R.; LANDGRAF, R.G.; JANCAR, S.; CURI, R.; SANNOMIYA, P. Evidence that arachidonic acid derived from neutrophils and prostaglandin E₂ are associated with the induction of acute lung inflammation by lipopolysaccharide of *Escherichia coli*. **Inflamm Res**, v. 53 (12), p.658–663, 2004.

ARONOFF, D.M.; CANETTI, C.; PETERS-GOLDEN, M. Prostaglandin E₂ inhibits alveolar macrophage phagocytosis through an E-prostanoid 2 receptor mediated increase in intracellular cyclic AMP. **J Immunol.**, v. 173(1), p. 559-565, 2004.

BALAZY, M. Eicosanomics: targeted lipidomics of eicosanoids in biological systems. **Prostaglandins Other Lipid Mediat.**, v. 73(3-4), p. 173-180, 2004.

BALTER, M.S.; ESCHENBACHER, W.L.; PETERS-GOLDEN, M. Arachidonic acid metabolism in cultured alveolar macrophages from normal, atopic, and asthmatic subjects. **Am Rev Respir Dis.**, v. 138 (5), p. 1134-1142, 1988.

BELLER, T.C.; FRIEND, D.S.; MAEKAWA, A.; LAM, B.K.; AUSTEN, K.F.; KANAOKA, Y. Cysteinyl leukotriene 1 receptor controls the severity of chronic pulmonary inflammation and fibrosis. **Proc Natl Acad Sci.**, v. 101 (9), p. 3047-52, 2004.

BORGEAT, P.; SAMUELSSON, B. Arachidonic acid metabolism in polymorphonuclear leukocytes: effects of ionophore A23187. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v. 76 (5), p. 2148-2152, 1979.

BOYCE, J.A. Mast cells and eicosanoid mediators: a system of reciprocal paracrine and autocrine regulation. **Immunol Rev.**, v. 217: p. 168-185, 2007.

BUNN, H.F. Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. **N Engl J Med.**, v. 337(11), p. 762-769, 1997.

BUZALAF, C.P.; PAULA, L.; FRANTZ, F.G.; SOARES, E.M.; MEDEIROS, A.I.; PETERS-GOLDEN, M.; SILVA, C.L.; FACCIOLI, L. H. Control of experimental pulmonary tuberculosis depends more on immunostimulatory leukotrienes than on the absence of immunosuppressive prostaglandins. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.**, v.85(2), p.75-81, 2011.

CARLOS, D.; MACHADO, E.R.; De PAULA, L. ; SÁ-NUNES, A.; SORGI, C.A.; JAMUR, M.C.; OLIVER, C.; LIMA, W.T.; FACCIOLI, L.H. Evidence for eosinophil recruitment, leukotriene B₄ production and mast cell hyperplasia following *Toxocara canis* infection in rats. **Braz J Med Biol Res.**, v. 44(4), p. 319-326, 2011.

CARTRON, J.P.; ELION, J. Erythroid adhesion molecules in sickle cell disease: effect of hydroxyurea. **Transf Clin Biol**, v. 15(1-2), p. 39-50, 2008.

CHIARADIA, M.C.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Quím. Nova**, v.31 (3), p. 623-636, 2008.

CZAPSKI, G.A.; CZUBOWICZ, K.; STROSZNAJDER, J.B.; STROSZNAJDER, R.P. The lipoxygenases: their regulation and implication in Alzheimer's disease. **Neurochem Res.**, *in press*, 2015.

DALLI, J.; SERHAN, C.N. Specific lipid mediator signatures of human phagocytes microparticles stimulate macrophage efferocytosis and pro-resolving mediators. **Blood.**, v.120(15), p.e60-72, 2012

DAVI, G.; CHIARELLI, F.; SANTILLI, F.; POMILIO, M.; VIGNERI, S.; FALCO, A.; BASILI, S.; CIABATTONI, G.; PATRONO, C. Enhanced lipid peroxidation and platelet activation in the early phase of type 1 diabetes mellitus: role of interleukin-6 and disease duration. **Circulation**, v. 107 (25), p.3199-3203, 2003.

DRAZEN, J.M.; O'BRIEN, J.; SPARROW, D.; WEISS, S.T.; MARTINS, M.A.; ISRAEL, E.; FANTA, C.H. Recovery of leukotriene E₄ from the urine of patients with airway obstruction. **Am Rev Respir Dis.**, v.146 (1), p. 104-108, 1992.

DUBOIS, R.N.; ABRAMSON, S.B.; CROFFORD, L.; GUPTA, R.A.; SIMON, L.S.; VAN DE PUTTE, L.B.; LIPSKY, P.E. Cyclooxygenase in biology and disease. **FASEB J.**, v. 12(12), p. 1063-1073, 1998.

FACCIOLI, L.H.; NOURSHARGH, S.; MOQBEL, R.; WILLIAMS, F.M.; SEHMI, R.; KAY, A.B.; WILLIAMS, T.J. The accumulation of ¹¹¹In-eosinophils induced by inflammation mediators, *in vivo*. **Immunology**, v. 73 (2), p. 222-7, 1991.

FIELD, J.J.; STRUNK, R.C.; KNIGHT-PERRY, J.E.; BLINDER, M.A.; TOWNSEND, R.R., DeBAUN, R. Urinary cystenil leukotriene E₄ significantly increases during pain in children and adults with sickle cell disease. **Am J Hematol.**, v. 84 (4), p. 231-233, 2009.

FIGUEIREDO, M.J., SOARES, D.M.; MARTINS, J.M.; MACHADO, R. R.; SORGI, C.A.; MELO, M.C.; MALVAR, D.C.; SOUZA, G.E. Febrile response induced by cecal ligation and puncture (CLP) in rats: involvement of prostaglandin E₂ and cytokines. **Med Microbiol Immunol.**, v. 201(2), p.219-229, 2012.

FLAMAND, N.; BOUDREAU, S.; PICARD, S.; AUSTIN, M.; SURETTE, M.E.; PLANTE, H.; KRUMP, E.; VALLÉE, M.J.; GILBERT, C.; NACCACHE, P.; LAVIOLETTE, M.; BORGEAT, P. Adenosine, a potent natural suppressor of arachidonic acid release and leukotriene biosynthesis in human neutrophils. **Am J Respir Crit Care Med.**, v. 161, p. S88-94, 2000.

FLAMAND, N.; SURETTE, M.E.; BOURGOIN, S.; Cyclic AMP-mediated inhibition of 5-lipoxygenase translocation and leukotriene biosynthesis in human neutrophils. **Mol Pharmacol**, v.62 (2), p. 250-256, 2002.

FLAMAND, N.; PICARD, S.; LEMIEUX, L.; POULIOT, M.; BOURGOIN, S.G.; BORGEAT, P. Effects of pyrrophenone, an inhibitor of group IVA phospholipase A₂, on eicosanoid and PAF biosynthesis in human neutrophils. **Br J Pharmacol.**, v.149 (4), p. 385-392, 2006.

FRENETTE, P.S.; ATWEH, G.F. Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise. **J Clin Invest**, v. 117(4), p. 850-858, 2007.

FUNK, C.D. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. **Science**, v. 294 (5548), p. 1871-1875, 2001.

GIOVANUCCI, E.; RIMM, E.B.; STAMPFER, M.J.; COLDITZ, G.A.; ASCHERIO, A.; WILLET, W.C. Aspirin use and the risk for colorectal cancer and adenoma in male health professionals. **Ann Intern Med.**, v.121 (4): p. 241-246, 1994.

GRAIDO-GONZALEZ, E.; JAMES, C.D.; BERGREEN, E.W.; ORGAN, G.; TELFER, M.; McMILLEN, M.A. Plasma endothelin-1, cytokine, and prostaglandin E2 levels in sickle cell disease and acute vaso-occlusive sickle crises, **Blood**, v. 92 (7), p. 2551-2555, 2015.

GRAUW, J.C.; van de LEST, C.H.A.; van WEEREN, P.G. A targeted lipidomics approach to the study of eicosanoid release in synovial joints. **Arthritis Res Ther.**, v.13 (4), p.R123, 2011.

HAEGGSTROM, J.Z.; FUNK, C.D. Lipoxygenase and leukotriene pathways: biochemistry, biology, and roles in disease. **Chem Rev.**, v.111(10), p. 5866-98, 2011.

HAN, X.; GROSS, R.W. Shotgun lipidomics: electrospray ionization mass spectrometric analysis and quantitation of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples. **Mass Spectr Rev.**, v. 24(3), p.367- 412, 2005.

HARKEWICZ, R.; DENNIS, E.A. Applications of Mass Spectrometry to Lipids and membranes. **Annu Rev Biochem.**, v. 80, p.301–25, 2011.

HATA, A.N.; BREYER, R.M. Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation. **Pharmacol Ther.**, v. 103(2), p. 147-66, 2004.

HENNING, R.; OSMAN, T.; ESPOSITO, I.; GIESE, N.; RAO, S.M.; DING, X.Z.; TONG, W.G.; BUCHLE, M.W.; YOKOMIZO, T.; FRIESS, H.; ADRIAN, T.E. BLT2 is expressed in PanINs, IPMNs, pancreatic cancer and stimulates tumour cell proliferation. **Br J Cancer.**, v. 99(7), p. 1064-1073, 2008.

HERDERICH, M.; RICHLING, E.; ROSCHER, R.; SCHNEIDER, C., SCHAWAB, W., HUMPF, H. U.; SCHEIER, P. Application of atmospheric pressure ionization HPLC-MS-MS for the analysis of natural products. **Chromatographia**, v. 45(1), p.127-132, 1997.

HIGASHI, N.; MITA, H.; ONO, E.; FUKUTOMI, Y.; YAMAGUCHI, H.; KAJIWARA, K.; TANIMOTO, H.; SEKIYA, K.; AKIYAMA, K.; TANIGUCHI, M. Profile of eicosanoid generation in aspirin-intolerant asthma and anaphylaxis assessed by new biomarkers. **J Allergy Clin Immunol.**, v.125 (5), p. 1084-1091, 2010.

HOFFMAN, T.; LIZZIO, E.F.; SUISSA, J.; ROTROSEN, D.; SULLIVAN, J.A.; MANDELL, G.L.; BONVINI, E. Dual stimulation of phospholipase activity in human monocytes. Role of calcium-dependent and calcium-independent pathways in arachidonic acid release and eicosanoids formation. **J Immunol.**, v. 140(11), p. 3912–3918, 1988.

IL'YASOVA, D.; MORROW, J.D.; IVANOVA, A.; WAGENKNECHT, L.E. Epidemiological marker for oxidant status: comparison of the ELISA and the gas chromatography/mass spectrometry assay for urine 2,3-dinor-5,6-dihydro-15-F2t-isoprostane. **Ann Epidemiol.**, v. 14(10), p. 793–797, 2004.

IMIG, J.D. Epoxyeicosatrienoic Acids, Hypertension, and Kidney Injury. **Hypertension**, v. 65(3), p. 476-482, 2015.

ISSAN, Y.; HOCHHAUSER, E.; GUO, A.; GOTLINGER, K.H.; ROMOWSKI, R.; LESHEM-LEV, D.; LEV, E.; SNIR, E.; THOMPSON, C.I.; ABRAHAM, N.G.; LANIADO-SHWARTZMAN, M. Elevated level of pro-inflammatory eicosanoids and EPC dysfunction in diabetic patients with cardiac ischemia. **Prostaglandins Other Lipid Mediat.**, v. 100-101, p. 15-21, 2013.

IVANOVA, P.T.; MILNE, S.B.; MYERS, D.S.; BROWN, H.A. Lipidomics: a mass spectrometry based systems level analysis of cellular lipids. **Curr Opin Chem Biol.**, v. 13(5-6), p. 526-531, 2009.

JENNINGS, J.E.; RAMKUMAR, T.; MAO, J.; BOYD, J.; CASTRO, M.; FIELD, J.J.; STRUNK, R.C.; DeBAUN, M.R. Elevated urinary leukotriene E₄ levels are associated with hospitalization for pain in children with sickle cell disease. **Am J Hematol.**, v. 83(8), p. 640-643, 2008.

JOHNSON, F.L.; LOOK, A.T.; GOCKERMAN, J.; RUGGIERO, M.R.; DALLA-POZZA, L.; BILLINGS, F.T. Bone-marrow transplantation in a patient with sickle cell anemia. **N Engl J Med.**, v. 311(12), p. 780-783, 1984.

KADIISKA, M. B. ; GLADEN, B. C.; BAIRD, D. D. ; GERMOLEC, D.; GRAHAM, L. B.; Parker, C. E.; et al. Biomarkers of oxidative stress study II: are oxidation products of lipids, proteins, and DNA markers of CCl₄ poisoning? **Free Radic Biol Med.**, v. 38(6), p. 698- 710, 2005.

KANAOKA, Y.; BOYCE, J.A. Cysteinyl leukotrienes and their receptors: cellular distribution and function in immune and inflammatory responses. **J Immunol.**, v.173(3), p.1503-1510, 2004.

KHALIL, B.M.; HOU, W.; ZHOU, H.; ELISMA, F.; SWAYNE, L.A.; BLANCHARD, A.P.; YAO, Z.; BENNETT, S.A.L.; FIGEYS, D. Lipidomics era: accomplishments and challenges. **Mass Spectrom Rev**, v. 29(6), p. 877-929, 2010.

KOLE, P. L.; VENKATESH, G.; KOTTECHA, J.; SHESHALA, R. Recent advances in sample preparation techniques for effective bioanalytical methods. **Biomed chromatogr.**, v. 25(1-2), p. 199-217, 2011

KRISHNA, T.R.; IBRAHAM, I. Solid-phase extraction technique for the analysis of biological samples. **J Pharm Biomed Anal.**, v. 12(3), p. 287–294, 1994

LANARO, C.; FRANCO-PENTEADO, C.F.; ALBUQUERQUE, D.M.; SAAD, S.T.O.; CONRAN, N.; COSTA, F.F. Altered levels of cytokines and inflammatory mediators in plasma and leukocytes of sickle cell anemia patients and effects of hydroxyurea therapy. **J Leukoc Biol.**, v. 85(2), p. 235-242, 2009.

LEWIS, R.A.; AUSTEN, K.F. The Biologically Active Leukotrienes: Biosynthesis, Metabolism, Receptors, Functions, and Pharmacology. **J Clin Invest.**, v. 73(4), p. 889-897, 1984.

LIN, W.; HUANG, M.Q.; XUE, X.; BERTELSEN, K.; CHEN, G.; ZHAO, H.; FOURIE, A.; JONG, J.; WENG, N. A highly sensitive and selective method for determination of leukotriene B₄ (LTB₄) in ex vivo simulated human plasma by ultra fast liquid chromatography-tandem

mass spectrometry. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.**, v. 925, p. 54-62, 2013.

LINDSTROM, P.; LERNER, R.; PALMBLAD, J.; PATARROYO, M. Rapid adhesive responses of endothelial cells and neutrophils induced by leukotriene B₄ are mediated by leucocytic adhesion protein CD18. **Scand J Immunol.**, v. 31(6), 737-744, 1990.

LONE, A.M.; TASKEN, K. Proinflammatory and immunoregulatory roles of eicosanoids in T cells. **Front Immunol.**, v. 4: p. 130, 2013.

LUNDSTROM, S.L.; GRONNEBERGS, R.; GRUNEWALD, J.; van HAGE, M.; HAMMOCK, B.D.; EKLUND, A.; WHEELLOCK, A.M.; WHEELLOCK, C.E. Allergic Asthmatics Show Divergent Lipid Mediator Profiles from Healthy Controls Both at Baseline and following Birch Pollen Provocation. **Plos One.**, 7(3): e33780, 2012.

MACHADO, E. R.; UETA, M.T.; LOURENÇO, E.V.; ANIBAL, F. F.; SORGI, C. A.; SOARES, E. G.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; MEDEIROS, A. I.; FACCIOLI, L. H. Leukotrienes play a role in the control of parasite burden in murine Strongyloidiasis. **J Immunol.**, v. 175(6), p. 3892-3899, 2005.

MACHADO, F.S.; ALIBERTI, J. Impact of lipoxin-mediated regulation on immune response to infectious disease. **Immunol Res.**, v. 35(3): p.209-18, 2006.

MACHADO, E.R.; CARLOS, D.; LOURENÇO, E.V.; SOUZA, G. E. P.; SORGI, C.A.; SILVA, E.V.G.; UETA, M.T.; RAMOS, S.G.; ARONOFF, D.M.; FACCIOLI, L.H. Cyclooxygenase-derived mediators regulate the immunological control of *Strongyloides venezuelensis* infection. **FEMS Immuno Med Microbiol.**, v. 59, p. 18-32, 2010.

MACHADO, E.R.; CARLOS, D.; SORGI, C.A.; RAMOS, S.G. ; SOUZA, D.I.; SOARES, E.G.; COSTACRUZ, J.M.; UETA, M.T; ARONOFF, D.M.; FACCIOLI, L.H. Dexamethasone Effects in the *Strongyloides venezuelensis* Infection in a Murine Model. **Am J Trop Med Hyg**, v. 84(6), p. 957-966, 2011.

MAGNUSSON, C.; MEZHYBOVSKA, M.; LORINC, E.; FERNEBRO, C.; NILBERT, M.; SJOLANDER, A. Low expression of CysLT₁R and high expression of CysLT₂R mediate good prognosis in colorectal cancer. **Eur J Cancer.**, v. 46(4), p. 826-835, 2010.

MAIER, K.G.; ROMAN, R.J. Cytochrome P450 metabolites of arachidonic acid in the control of renal function. **Curr Opin Nephrol Hypertens.**, v. 10(1), p. 81-87, 2001.

MALCOLM, K.C.; FITZPATRICK, F.A. Indirect action of thapsigargin on human platelets: activation of eicosanoids biosynthesis and cellular signaling pathways. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 260(3), p. 1244-1249, 1992.

MAEWAKA, A.; XING, W.; AUSTEN, K.F. Functional recognition of a distinct receptor preferential for leukotriene E₄ in mice lacking the cysteinyl leukotriene 1 and 2 receptors. **Proc Nat Acad Sci U.S.A.**, v. 105(43), p. 16695-16700, 2008.

MARTINS, C.A.F.; PONTAROLO, R. Desenvolvimento e validação de um método por CLAE-EM/EM para determinação de PGE₂ e PGD₂ em meio de cultivo celular e avaliação da

recuperação das prostaglandinas utilizando diferentes condições na extração em fase sólida. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.**, v. 34(2), p.183-189, 2013.

MASSEY, A.K.; NICOLAOU, A. Lipidomics of oxidized polyunsaturated fatty acids. **Free Radic Biol Med.**, v. 59, p.45-55, 2012.

MEDEIROS, A.; PERES-BUZALAF, C.; FORTINO VERDAN, F.; SEREZANI, C.H. Prostaglandin E₂ and the suppression of phagocyte innate immune responses in different organs. **Mediators Inflamm.**, v. 2012, p. 327568, 2012.

MEDEIROS, A.I.; SA-NUNES, A.; TURATO, W.M.; SECATTO, A.; FRANTZ, F.G.; SORGI, C.A.; SEREZANI, C.H.; DEEPE, G.; FACCIOLI, L.H. Leukotrienes Are Potent Adjuvant during Fungal Infection: Effects on Memory T Cells. **J Immunol.**, v.181(12), p.8544-8551, 2008.

MEDEIROS, A.I.; MALHEIRO, A.; JOSÉ, P.J.; CONROY, D.M.; WILLIAMS, T.J.; FACCIOLI, L.H. Differential release of MIP-1alpha and eotaxin during infection of mice by *Histoplasma capsulatum* or inoculation of Beta-glucan.. **Inflamm Res**, v.53 (8), p.351-354, 2004.

MEDEIROS, A.I.; SILVA, C.L.; MAFFEI, C.M.L.; FACCIOLI, L. H. Leukotrienes are involved in leukocytes recruitment induced by live *Histoplasma capsulatum* or by the B-glucan present in their cell wall. **Br J Pharmacol.**, v.128(7), p.1529-1537, 1999.

MESAROS, C.; LEEB, S.H.; BLAIR, I.A. Targeted quantitative analysis of eicosanoid lipids in biological samples using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.**, v.877(26), p.2736–2745, 2009.

NICOLETE, R.; SECATTO, A.; Pereira, P.A.T.; SOARES, E.G.; FACCIOLI, L.H. Leukotriene B(4)-loaded microspheres as a new approach to enhance antimicrobial responses in *Histoplasma capsulatum*-infected mice. **Int J Antimicrob Agents.**, v. 34(4), p. 365-369, 2009.

NICOLETE, R.; KD LIMA; JÚNIOR, J. M.; JOSÉ, P J; SANZ, M. J.; FACCIOLI, L. H. Prostaglandin E(2)-loaded microspheres as strategy to inhibit phagocytosis and modulate inflammatory mediators release. **Eur J Pharm Biophar.**, v. 70(3), p. 784-790, 2008.

NEEDLEMAN, P.; ISAKSON, P.C. The discovery and function of COX-2. **J Rheumatol.**, v. 49, p. 6-8 1997.

QUEHENBERGER, O.; ARMANDO, A. M.; BROWN, A.H.; MILNE, S.B.; MYERS, D.S.; MERRILL, A.H.; BANDYOPADHYAY, S.; JONES, K.N.; KELLY, S.; SHANER, R.L.; SULLARDS, C.M.; WANG, E.; MURPHY, R.C.; BARKLEY, R.M.; LEIKER, T.J.; RAETZ, C.R.; GUAN, Z.; LAIRD, G.M.; SIX, D.A.; RUSSELL, D.W.; MCDONALD, J.G.; SUBRAMANIAM, S.; FAHY, E.; DENNIS, E. A. Lipidomics reveals a remarkable diversity of lipids in human plasma. **J Lipid Res.**, v. 51(11), p. 3299-3305, 2010.

PALMBLAD, J.E.W.; LERNER, R. Leukotriene B₄-induced hyper adhesiveness of endothelial cells for neutrophils: relation to CD54. **Clin Exp Immunol.**, v. 90(2), p. 300-304, 1992.

PANIGRAHY, D.; GREENE, E.; POZZI, A.; WANG, D.W.; ZELDIN, D.C. EET signaling in cancer. **Cancer Metastasis Rev.**, v. 30(3-4), p. 525–540, 2011.

- PANIGRAHY, D.; KAIPANEN, A.; GREENE, E.R.; HUANG, S. Cytochrome P450-derived eicosanoids: the neglected pathway in cancer. **Cancer Metastasis Rev.**, v. 29(4), p. 723–735, 2010.
- PERES, C.M.; PAULA, L.; MEDEIROS, A.I.; SORGI, C.A.; SOARES, E.G.; CARLOS, D.; PETERS-GOLDEN, M.; SILVA, C.L.; FACCIOLO, L.H. Inhibition of leukotriene biosynthesis abrogates the host control of *Mycobacterium tuberculosis*. **Microbes and Infect.**, v. 9(4), p.483-489, 2007.
- PETERS-GOLDEN, M.; CANETTI, C.; MANCUSO, P.; COFFEY, M.J. Leukotrienes: Underappreciated Mediators of Innate Immune Responses. **J Immunol.**, v. 174(2), p. 589-594, 2005.
- PLATT, O.S.; ORKIN, S.H.; DOVER, G.; BEARDSLEY, G.P.; MILLER, B.; NATHAN, D.G. Hydroxyurea enhances fetal hemoglobin production in sickle cell anemia. **J Clin Invest.**, v. 74(2), p. 652-656, 1984.
- POOLE, C. F.; GUNATILEKA, A. D.; SETHURAMAN, R. Contributions of theory to method development in solid-phase extraction. **J Chromatogr A.**, v. 885(1-2), p.17-39, 2000.
- POLOSO, N.J.; URQUHART, P; NICOLAOU, A.; WANG, J.; WOODWARD, D.F. PGE₂ differentially regulates monocyte-derived dendritic cell cytokine responses depending on receptor usage (EP2/EP4). **Mol Immunol.**, v.54(3-4), p. 284-295, 2013.
- PRATICO, D.; LEE, V.M.Y.; TROJANOWSKI, J. Q.; ROKACH, J.; FITZGERALD, G. A.; Increased F2-isoprostanes in Alzheimer's disease: evidence for enhanced lipid peroxidation *in vivo*. **FASEB J.**, v. 12(15), p. 1777-1783, 1998.
- REES, D.C.; WILLIAMS, T.N.; GLADWIN, M.T. Sickle cell disease. **Lancet.**, v.376 (9757), p. 2018-2031, 2010.
- REES, D.C.; GIBSON, J.S. Biomarkers in sickle cell disease. **Br J Haematol.**, v. 156(4), p.433-45, 2012.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quím. Nova**, v.27(5), p.771-780, 2004.
- RICCIONI, G.; BACK, M.; CAPRA, V. Leukotrienes and Atherosclerosis, **Curr Drug Targets.**, v. 11(7), p. 882-887, 2010.
- RICIOTTI, E.; FITZGERALD, G.A. Prostaglandins and inflammation. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v. 31(5), p. 986-1000, 2011.
- SACERDOTI, D.; GATTA, A; MCGIFF, J.C. Role of cytochrome P450-dependent arachidonic acid metabolites in liver physiology and pathophysiology. **Prostaglandins Other Lipid Mediat.**, v. 72(1-2), p. 51-71, 2003.
- SALIM, T.; SAND-DEJMEK, J.; SJOLANDER, A. The inflammatory mediator leukotriene D₄ induces subcellular β -catenin translocation and migration of colon cancer cells. **Exp Cell Res.**, v. 321(2), p.255–266, 2014.

- SANTOS, D.F.; BITENCOURT, C.S.; GELFUSO, G.M.; PEREIRA, P.A.T.; de SOUZA, P.R.M.; SORGI, C. A.; NICOLETE, R.; FACCIOLI, L. H. Biodegradable microspheres containing leukotriene B₄ and cell-free antigens from *Histoplasma capsulatum* activate murine bone marrow-derived macrophages. **Eur J Pharm Sci.**, v. 44(5), p. 580-588, 2011.
- SCHWARTZMAN, M.L.; ISEROVICH, P.; GOTLINGER, K.; BELLNER, L.; DUNN, M.W.; SARTORE, M.; PERTILE, M.G.; LEONARDI, A.; SATHE, S.; BEATON, A.; TRIEU, L.; SACK, R. Profile of lipid and protein autacoids in diabetic vitreous correlates with the progression of diabetic retinopathy. **Diabetes**, v.59(7), p. 1780-1788, 2010.
- SECATTO, A.; RODRIGUES, L. C.; SEREZANI, C. H.; RAMOS, S. G.; BARUFFI, M. D.; FACCIOLI, L. H.; MEDEIROS, A. I. 5-Lipoxygenase Deficiency Impairs Innate and Adaptive Immune Responses during Fungal Infection. **Plos One.**, 7(3): 1-9, 2012.
- SEREZANI, C.H.; CHUNG, J.; BALLINGER, M.N.; MOORE, B.B.; ARONOFF, D.M.; PETERS-GOLDEN, M. Prostaglandin E₂ suppresses bacterial killing in alveolar macrophages by inhibiting NADPH oxidase. **Am J Respir Cell Mol Biol.**, v. 37(5), p. 562-70, 2007.
- SERHAN, C.N.; HAMBERG, M.; SAMUELSSON, B. Lipoxins: Novel series of biologically active compounds formed from arachidonic acid in human leukocytes. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v.81(17), p. 5335-5339, 1984.
- SERHAN, C.N.; CHIANG, N. Lipid derived mediators in endogenous antiinflammation and resolution: lipoxins and aspirin-triggered 15-epi-lipoxins. **Scientific World Journal.**, v. 2, p. 169-204, 2002.
- SETTY, B.N.Y.; DAMPIER, C.D.; STUART, M.J. Arachidonic acid metabolites are involved in mediating red blood cell adherence to endothelium. **J Lab Clin Med.**, v.125(5), p. 608-617, 1995.
- SHINDE, D.D.; KIM, K.B.; OH, K.S.; ABDALLA, N.; LIU, K.H.; BAE, S.K.; SHON, J.H.; KIM, H.S.; KIM, D.H.; SHIN, J.G. LC-MS/MS for the simultaneous analysis of arachidonic acid and 32 related metabolites in human plasma: Basal plasma concentrations and aspirin-induced changes of eicosanoids. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.**, v. 911, p.113-121, 2012.
- SILVA-PINTO, A.C.; ANGULO, I.L.; BRUNETTA, D.M.; NEVES, F.I.R.; BASSI, S.C.; De SANTIS, G.C.; COVAS, D.T. Clinical and hematological effects of hydroxyurea therapy in sickle cell patients: a single-center experience in Brazil. **Sao Paulo Med J.**, v. 131(4), p. 238-243, 2013.
- SMITH, W.L.; DEWITT, D.L.; GARAVITO, R.M. Cyclooxygenases: Structural, cellular, and molecular biology. **Annu Rev Biochem.**, v. 69, p. 145-82, 2000.
- SOARES, E. M.; MASON, K.L.; ROGERS, L. M.; SEREZANI, C.H.; FACCIOLI, L.H.; ARONOFF, D.M. Leukotriene B₄ enhances Innate Immune defense against the puerperal sepsis agent *Streptococcus pyogenes*. **J Immunol.**, v.190(4), p. 1-10, 2013.
- SONG, J.; LIU, X.; WUC, J.; MEEHAN, M.J.; BLEVITT, J.M.; DORRESTEIN, P.C.; MILLA, M.E. A highly efficient, high-throughput lipidomics platform for the quantitative detection of eicosanoids in human whole blood. **Anal Biochem.**, v. 433(2), p. 181-188, 2013.

SORGI, C.A.; SECATTO, A.; FONTANARI, C.; TURATO, W.M.; BELANGER, C.; MEDEIROS, A.I.; KASHIMA, S.; MARLEAU, S.; COVAS, D.T.; BOZZA, P.T.; FACCIOLI, L.H. *Histoplasma capsulatum* cell wall β -glucan induces lipid body formation through CD18, TLR2, and dectin-1 receptors: correlation with leukotriene B₄ generation and role in HIV-1 infection. **J Immunol.**, v. 182(7), p. 4025-4035, 2009.

SPECTOR, A.A.; NORRIS, A.W. Action of epoxyeicosatrienoic acids on cellular function. **Am J Physiol Cell Physiol.**, v. 292(3), p. C996-C1012, 2007.

STARLING, A.L.B.; COELHO-DOS-REIS, J.G.A.; PERUHYPE-MAGALHÃES, V.; PASCOAL-XAVIER, M.A.; GONÇALVES, D.U.; BÉLA, S.R.; LAMBERTUCCI, J.R.; LABANCA, L.; PEREIRA, S.R.S.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; RIBAS, J.G.; TRINDADE, B.C.; FACCIOLI, L.H.; CARNEIRO-PROIETTI, A.B.F.; MARTINS-FILHO, A.O. Immunological signature of the different clinical stages of the HTLV-1- associated disease morbidity. **Biomarkers**, v. 20(6-7), p. 502-512, 2015.

STEWART, W.F.; KAWAS, C.; CORRADA, M.; METTER, E.J. Risk of Alzheimer's disease and duration of NSAID use. **Neurology**, v. 48(3), p. 626-32, 1997.

SURETTE, M.E.; ODEIMAT, A.; PALMANTIER, R.; MARLEAU, S.; POUBELLE, P.E.; BORGEAT, P. Reverse-phase high performance liquid chromatography analysis of arachidonic acid metabolites in plasma after stimulation of whole blood *ex vivo*. **Anal Biochem.**, v. 216(2), p. 392-400, 1994.

TALPAIN, E.; ARMSTRONG, R.A.; COLEMAN, R.A.; VARDEY, C.J. Characterization of the PGE receptor subtype mediating inhibition of superoxide production in human neutrophils. **Br J Pharmacol.**, v. 114(7), p. 1459-1465, 1995.

TANAKA, N.; YAMAGUCHI, H.; FURUGEN, A.; OGURA, J.; KOBAYASHY, M.; YAMANDA, T.; MANO, N.; ISEKI, K. Quantification of intracellular and extracellular eicosapentaenoic acid-derived 3-series prostanoids by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.**, v. 91(3), p. 61-71, 2014.

THUN, M.J.; NAMBOODIRI, M.M.; CALLE, E.E.; FLANDERS, W.D.; HEATH, C.W. Jr. Aspirin use and risk of fatal cancer. **Cancer res.**, v. 53(6), p. 1322-1327, 1993.

TRINDADE, B.C.; SORGI, C.A.; NICOLETE, L.D.F.; MALTA, T.M.; PINTO, M.T.; TAKAYANAGUI, O.M.; COVAS, D.T.; FILHO, O.A.M.; KASHIMA, S.; FACCIOLI, L.H. Leukotrienes are upregulated and associated with Human T-Lymphotropic Virus Type I (HTLV-1)- associated neuroinflammatory disease. **Plos One**, v.7 (12), p. e51873, 2012.

VANDYKE, T.E.; SERHAN, C.N. Resolution of inflammation: a new paradigm for the pathogenesis of periodontal diseases. **J den res.**, v. 82(2), p. 82-90, 2003.

VANE, J.R.; BAKHLE, Y.S. Cyclooxygenases 1 and 2. **Annu Rev Pharmacol Toxicol.**, v.38, p. 97-120, 1998.

VAN HOUT, M.W.J.; NIEDERLANDER, H.A.G.; ZEEUW, R.A.; de JONG, G.J. New developments in integrated sample preparation for bioanalysis. In: SMITH, R.M. **Handbook of analytical separations**, v.4, p. 1-3, 2003.

VICHINSKY, E.P.; LUBAN, N.L.; WRIGHT, E.; OLIVIERI, N.; DRISCOLL, C.; PEGELOW, C.H.; ADAMS, R.J. Prospective RBC phenotype matching in a stroke-prevention trial in sickle cell anemia: a multicenter transfusion trial. **Transfusion**, v. **41**, p.1086–1092.

VIRTUE, S; MASOODI, M.; de WEIJER, B.A.; van EJK,M.; MOK, C.Y.; EIDEN, M.; DALE, M.; PIRRACO, A.; SERLIE, M.J.; GRIFFIN, J.L.; VIDAL-PUIG, A. Prostaglandin profiling reveals a role for haematopoietic prostaglandin D synthase in adipose tissue macrophage polarisation in mice and humans. **Int J Obes.**, v. 39(7), p. 1151-1160, 2015.

VOLTARELLI, J. C.; MALMEGRIM, K.C.R.; DIAMOND, H.R.; OLIVEIRA, A.A.; RODRIGUES, M.C.; FERREIRA, E. Imunologia do Transplante de Células-Tronco Hematopoéticas. In: **Manual Brasileiro de Transplante de Medula Óssea**, 2009.

WANG J. Analysis of macrolide antibiotics, using liquid chromatography-mass spectrometry in food, biological and environmental matrices. **Mass Spectrom Rev.**, v. 28, p. 50-92, 2009.

WERZ, O.; STEINHILBER, D. Therapeutic options for 5-lipoxygenase inhibitors. **Pharmacol ther.**, v. 112(3), p. 701-18, 2006.

WOOD, J.C.; TYSZKA, J.M.; CARSON, S.; NELSON, M.D.; COATES, T.D. Myocardial iron loading in transfusion-dependent thalassemia and sickle cell disease. **Blood.**, v. 103 (5), p. 1934-1936, 2004.

WYMAN, M. P.; SCHNEITER, R. Lipid signalling in disease. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, v. 9, p.162-176, 2008.

YOKOMISO, T.; KATO, K.; TERAOKA, K.; IZUMI, T.; SHIMIZU, T. A second leukotriene B₄ receptor, BLT2. A new therapeutic target in inflammation and immunological disorders. **J Exp Med.**, v. 92(3), p. 421-32, 2000.

ZAGO, M.A.; SILVA-PINTO, A.C. The pathophysiology of sickle cell disease: from the genetic mutation to multiorgan dysfunction. **Rev Bras Hematol Hemoter.**, v. 29 (3), p. 207-214, 2007.

ZARINI, S.; GIJÓN, M.A.; MURPHY, R.C. Effect of arachidonic acid reacylation on leukotriene biosynthesis in human neutrophils stimulated with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine. **J Biol Chem.**, v. 281 (15), p. 10134-10142, 2006.

Anexo A – Aproveção do comitê de ética

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Of. CEP/FCFRP nº. 013/2013
kms

Ribeirão Preto, 4 de abril de 2013.

À Senhora
Profª. Drª. Lúcia Helena Faccioli
Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas
FCFRP/USP

Prezada Senhora,

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP/USP aprovou, em sua 114ª reunião ordinária realizada em 04.04.2013, o projeto de pesquisa intitulado "USO DA ULTRA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS PARA ANÁLISE DE LIPIDOMA DE EICOSANÓIDES EM PLASMA DE INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS", apresentado por Vossa Senhoria a este Comitê, Protocolo CEP/FCFRP nº. 304.

Informamos que conforme Carta Circular 003/2011 da CONEP (Comissão Nacional de Ética em Pesquisa), o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso e também o pesquisador responsável deverão rubricar todas as páginas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE, apondo sua assinatura na última página do referido Termo. Ainda, de acordo com a Resolução 196/96, item IV.2, letra d, "o TCLE deverá ser elaborado em duas vias, sendo uma retida pelo sujeito da pesquisa ou por seu representante legal e uma arquivada pelo pesquisador".

Em atendimento à Resolução 196/96, lembramos que deverá ser encaminhado ao CEP o relatório final da pesquisa em formulário próprio deste Comitê, bem como comunicada qualquer alteração, intercorrência ou interrupção do mesmo, tais como eventos adversos e eventuais modificações no protocolo ou nos membros da equipe.

Atenciosamente,

PROFª. DRª. MARIA REGINA TORQUETI
Coordenadora do CEP/FCFRP

Anexo B – Termo de consentimento

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - Campus Universitário Monte Alegre

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

NOME DA PESQUISA: ***“USO DA ULTRA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS PARA ANÁLISE DO LIPIDOMA DE EICOSANÓIDES EM PLASMA DE INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS”***

PESQUISADORES RESPONSÁVEIS:

Alyne Fávero Galvão e Lúcia Helena Faccioli.

Gostaríamos de convidá-lo a participar desta pesquisa que será desenvolvida pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo (FCFRP-USP), em parceria com a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP) e a Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP-USP), com o objetivo de padronizar um teste para conhecer melhor a produção de lipídeos envolvidos em processos inflamatórios em indivíduos saudáveis.

A sua participação é **voluntária**. Para participar, é necessário ler atentamente este documento e ouvir nossas explicações em caso de dúvidas. Se estiver interessado em participar, solicitaremos que assine este documento.

O que é lipidoma?

O lipidoma consiste na identificação e quantificação de lipídeos (gordura) em um organismo sendo utilizado para avaliar a presença de vários tipos de lipídeos, como os lipídeos da inflamação (eicosanóides).

Porque esta pesquisa está sendo feita?

Pretendemos padronizar um teste para identificar e quantificar o maior número possível de lipídeos envolvidos em processos inflamatórios no sangue de indivíduos saudáveis. Com isso, nosso método poderá ser utilizado como referência em futuros estudos para avaliação da alteração da produção desses lipídeos em diversas doenças.

Para a realização desta pesquisa, precisamos da coleta de sangue de pessoas saudáveis. A pessoa que participar desta pesquisa deverá doar no máximo 20 mL de sangue (que corresponde a aproximadamente uma colher e meia de sopa). Esta quantidade de sangue retirada não será prejudicial à saúde. O risco é de formar manchas roxas (hematomas) no local, mas a coleta de sangue será realizada no braço, com seringas e agulhas descartáveis por um profissional capacitado e é semelhante à picada de um exame de sangue.

Não haverá nenhuma despesa e nenhum ganho em dinheiro. Afirmamos que os dados obtidos serão guardados de maneira sigilosa e que os nomes dos participantes não serão divulgados em nenhum momento, e os mesmos serão informados dos resultados finais da pesquisa, caso desejarem. Além disso, o médico Dr. Valdes Roberto Bollela, do Hospital das Clínicas da FMRP-USP (HCFMRP-USP), ficará responsável pela avaliação dos hemogramas e pela orientação e encaminhamento a um serviço de saúde, em caso de o resultado do hemograma apresentar alguma alteração. Esta pesquisa não trará benefício para você, mas seus resultados poderão ajudar em pesquisas futuras. Você pode desistir a qualquer momento. Para desistir, você deverá entrar em contato com a pesquisadora Alyne Fávero Galvão ou com o Comitê de Ética pelos telefones abaixo. Ao concordar em participar, você deverá assinar este termo em duas vias, uma para você e outra para os pesquisadores.

Será feita apenas uma doação de sangue para a pesquisa e não haverá armazenamento do material colhido, o mesmo será descartado ao final da pesquisa.

Qualquer dúvida sobre esta pesquisa, entrar em contato com Alyne Fávero Galvão pelo telefone (16) 3602 – 4189 ou (16) 9214-7379. Telefone para contato do Comitê de Ética em Pesquisa (16) 3602 – 4213, e-mail do Comitê de Ética em Pesquisa: cep@fcrp.usp.br

Eu, _____

RG nº: _____, autorizo a retirada de 20 mL do meu sangue da veia do braço para a realização desta pesquisa. Fui informado (a) sobre o procedimento e que o volume retirado não causará dano a minha saúde. Fui informado (a) também que a finalidade dessa pesquisa é desenvolver um teste para medida da produção de mediadores da inflamação em indivíduos saudáveis que possa ser utilizado como referência em pesquisas futuras para avaliação destes compostos em diversas doenças.

Ribeirão Preto, ____ de _____ de 20__.

Alyne Fávero Galvão
CPF: 364.396.508-74

Profa. Dra. Lúcia Helena Faccioli
CPF: 821.926.268-00

Sujeito da pesquisa