

## QUANTIFICAÇÃO DE FOSFATOS ORGÂNICOS EM ERITRÓCITOS DE PEIXES POR LC-MS/MS

Kátia Teixeira de CASTRO<sup>1</sup>  
Clécio Fernando KLITZKE<sup>2</sup>  
Adalberto Luis VAL<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Bolsista Iniciação Científica INPA-PIBIC/CNPq;

<sup>2</sup>Colaborador PÓS-DOC/CAPES/INPA;

<sup>3</sup>Orientador CBIO/INPA.

### INTRODUÇÃO

A importância fisiológica dos fosfatos presentes em eritrócitos para a troca de O<sub>2</sub> tem sido reconhecida em trabalhos clássicos (Benesch e Benesch 1967; Chanutin e Curnish 1967), ao descreverem os efeitos de 2,3-DPG em hemoglobina humana. Outros estudos mostraram a distribuição ampla dos fosfatos orgânicos em eritrócitos de vertebrados. A presença de fosfatos orgânicos em eritrócitos de peixes foi confirmada em centenas de espécies de peixes. Além do ATP, originalmente descrito por Rapoport e Guest (1941), diversos outros fosfatos foram identificados. É sabido que os fosfatos orgânicos se ligam à hemoglobina diminuindo sua afinidade com o O<sub>2</sub>. Considerando que o meio aquático apresenta grandes mudanças temporais e espaciais em relação ao O<sub>2</sub> dissolvido, os peixes experimentam alterações na necessidade por oxigênio e devem ajustar os níveis de fosfatos orgânicos intraeritrocitários em decorrência da adaptação a estes ambientes (Weber e Jensen 1988). Val (2000) revisou dados existentes sobre os níveis de fosfatos intraeritrocitários de peixes, com ênfase na ocorrência filogenética, mudanças quantitativas e qualitativas durante a ontogenia, síntese e ajustes nas concentrações de fosfatos, ambiental e fisiologicamente induzidos. Deste modo é de extrema importância conhecer a composição e a quantificação dos fosfatos orgânicos presentes nos eritrócitos das diversas espécies de peixes da Amazônia. Este conhecimento além da importância para os estudos de ecofisiologia, também é importante para estudos ambientais. O laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular (LEEM) possui um cromatógrafo líquido acoplado a um espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo. Este equipamento é ideal para quantificação de analitos orgânicos em diferentes matrizes, sendo o mais indicado para a quantificação dos fosfatos orgânicos. Deste modo o desenvolvimento e validação de uma metodologia analítica para a análise qualitativa e quantitativa de fosfatos eritrocitários de peixe é de extrema importância para o laboratório, tanto no nível de treinamento e capacitação de pessoal para operar e desenvolver metodologias específicas para LC-MS/MS, quanto para a aplicação destas metodologias analíticas em projetos do LEEM.

### MATERIAL E MÉTODOS

Para o desenvolvimento da metodologia e sua validação foram utilizadas amostras de sangue de tambaqui (*Colossoma macropomum*), matrinxã (*Brycon amazonicus*), acará-bandeira (*Mesonauta festivus*), acará-açu (*Astronotus ocellatus*), bodó (*Pterygoplichthys pardalis*) e cascudo (*Ancistrus sp.*). Os peixes foram obtidos de criadores da região de Manaus e em excursão ao lago da Piranha no ponto 4°11'43,3"S/61°53'01,7"W, Manacapuru-Am. Os peixes foram aclimatados em tanques do LEEM. As amostras de sangue foram obtidas por punção caudal dos exemplares previamente anestesiados em banho de gelo. O sangue foi transferido para

tubos de polipropileno de 1,5 mL. A 200 µL de sangue total foram adicionados 200 µL de ácido perclórico 7% (v/v) para ocorrer à lise e a liberação dos fosfatos intraeritrocitários, conforme metodologia descrita por Bartlett (1959). Após agitação em vórtex por 20 segundos as amostras foram centrifugadas a 13.400 rpm durante cinco minutos. Depois foi transferido 200 µL do sobrenadante para outro tubo de propileno contendo 23 µL de solução aquosa de KOH 6M, para neutralização. As amostras foram congeladas a -80 °C até análise. As curvas analíticas para os fosfatos foram construídas em solvente e em matriz fortificada (lisado de eritrócitos sem fosfatos) com concentrações conhecidas de ATP e GTP. As análises foram efetuadas em cromatógrafo líquido Agilent 1200 Series, acoplado ao espectrômetro de massas AB Sciex QTRAP operado com fonte *electrospray* no modo negativo, ESI (-). As análises foram efetuadas no modo MRM, monitorando as transições da razão massa carga ( $m/z$ ) características para os fosfatos eritrocitários (molécula desprotonada  $[M-H]^-$  e o íon produto da perda de fosfato). Após a otimização do método, foi utilizado a coluna cromatográfica Eclipse XDB-C18 (4.6 x 150 mm, 5 µm), com a fase móvel contendo 2 mM de acetato de amônio. Foram avaliadas as figuras de mérito (parâmetros analíticos da validação): curva analítica e linearidade, especificidade/seletividade, limite de detecção e de quantificação, exatidão (recuperação) e precisão (repetitividade e precisão intermediária).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre as fases móveis testadas, a que obteve melhor resultado com intensidade e linearidade no MS foi o acetato de amônio 2 mM com pH 9, conforme mostra a Figura 1. Após um número considerável de análises ocorreu a perda de sinal devido à cristalização dos sais na fonte do MS. Esse fato foi observado por Jiang *et al.* (2012), que também teve aumento da concentração de sais resultando em supressão da intensidade de sinal de MS, devido a precipitação de sais na fonte de íons e no tubo transportador de íons.

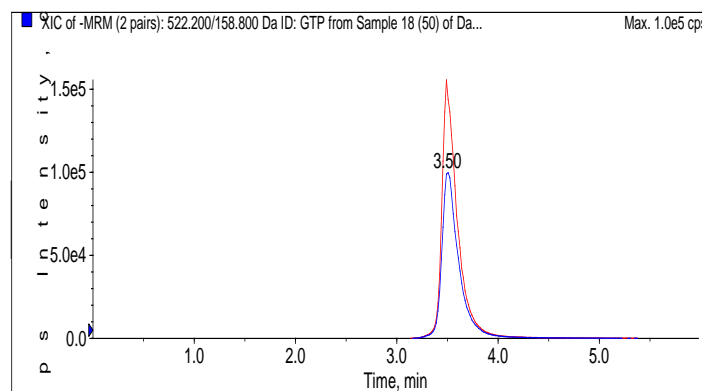


Figura 1. Cromatograma LC-MS/MS de mistura dos compostos padrões ATP e GTP, utilizando acetato de amônio 2 mM como fase móvel com pH 9 ajustado com amônia.

Para otimizar os parâmetros de análise por MS/MS no modo MRM inicialmente analisamos os padrões de ATP e GTP por infusão direta (sem o uso da coluna cromatográfica), utilizando uma bomba de infusão modelo Haward Apparatus 11 plus, com uma seringa de 1 mL, utilizando o fluxo de 10 µL/min. Adquirimos os espectros por análise de *full scan*. Os fosfatos orgânicos podem ser analisados tanto por ESI(+) quanto por ESI(-). Optamos pela análise no modo negativo por conta da presença de adutos de sódio e potássio  $[M+Na]^+$  e  $[M+K]^+$  além da molécula protonada  $[M+H]^+$  no modo positivo. Mesmo com a adição de ácido

fórmico, utilizado normalmente para facilitar a protonação, tem-se a formação destes adutos. Já no modo negativo temos apenas as moléculas desprotonadas  $[M-H]^-$  (Abadi 2003, Maldaner 2010, Wang *et al.* 2014). Após otimizar as condições de *full scan* no modo negativo, foram otimizadas as condições de MRM para as transições escolhidas e otimizadas a temperatura da fonte e gás de nebulização para facilitar a análise acoplada ao LC com a vazão de 125  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Na tabela 1 temos as condições otimizadas para a análise de ATP e GTP por espectrometria de massas utilizando MRM.

Tabela 1. Parâmetros otimizados para a análise de ATP e GTP por MRM.

<b>Fonte de Ion</b>					
Curtina de Gás (CUR)	20				
Gás de Colisão (CAD)	médio				
Voltage do IonSpray (IS)	-4500				
Temperatura °C (TEM)	550				
Fonte de Íons em fase Gasosa 1 (GS1)	40				
Fonte de Íons em fase Gasosa Gas 2 (GS2)	60				
Interface do Aquecedor (IHE)	ligado				
<b>MRM</b>					
Potencial de Entrada (EP)	-10				
Energia de Colisão (CE)	-53				
Potencial de Saída da Célula de Colisão (CXP)	-10				
	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	tempo(ms)	ID	DP (volts)
	522.2	158.8	500	GTP	-73
	506	158.8	500	ATP	-86

Nos testes com os padrões ATP 201,40  $\mu\text{Molar}/\text{mL}$  e GTP 200,70  $\mu\text{Molar}/\text{mL}$ , ambos diluídos em água deionizada, tivemos coeficientes de correlação ( $r^2$ ) para as curvas de padrão do ATP e GTP  $> 0,98$  indicando uma boa correlação entre as concentrações, conforme mostra a Figura 2. A curva de calibração foi preparada com solução padrão de ATP e GTP, em uma concentração inicial de 50  $\mu\text{Mol}/\text{mL}$ , diluída em quatro concentrações diferentes (1, 0,5, 0,25 e 0,125  $\mu\text{Mol}/\text{mL}$ ), para produzir as curvas. Os intervalos da curva foram analisados quanto a sua linearidade, exatidão e precisão compatíveis, sendo todos os pontos analisados em triplicata.

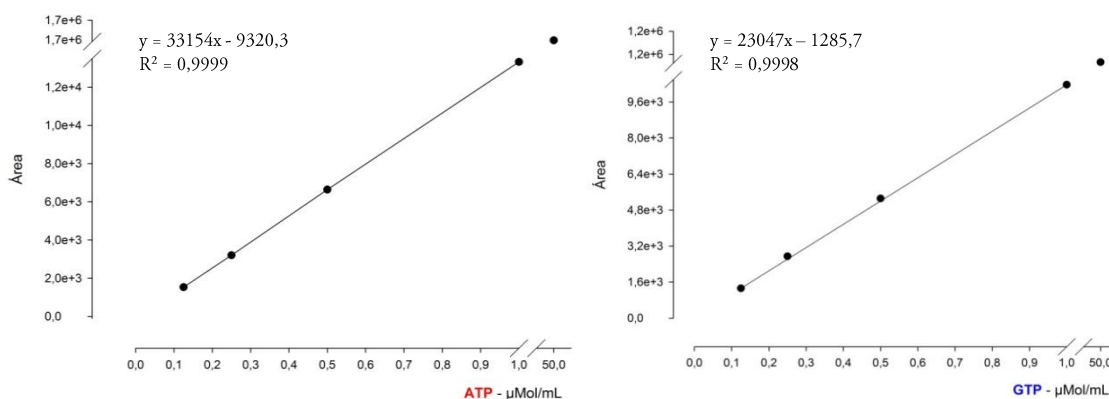


Figura 2. Curvas com padrões de ATP e GTP.

Com obtenção das curvas de calibração do ATP e GTP com coeficientes aceitáveis, conseguimos quantificar os fosfatos eritrocitários em tambaqui, matrinxã, acará-bandeira, acará-açu, bodó e cascudo. Pode-se observar maior concentração do GTP em relação ao ATP nas espécies de peixes analisados. Peixes expostos a ambientes com significativas variações na disponibilidade de oxigênio dissolvido, tais como as espécies de peixes de água doce tropical, possuem elevados níveis de GTP em suas células vermelhas do sangue em comparação com as espécies de peixes marinhos (Val 2000). Estudos sobre os níveis de fosfatos intraeritrocitários de peixes, com ênfase na variação filogenética, mudanças quantitativas e qualitativas durante a ontogenia, síntese, e ajustes nas concentrações de fosfatos de acordo com as condições ambientais e fisiológicas tem sido realizados. Muitos estudos têm descrito os efeitos dos fosfatos orgânicos na afinidade da Hb com o O<sub>2</sub>, e têm demonstrado que a efetividade da modulação ocorre de forma decrescente na seguinte ordem: IPP-GTP-ATP-2,3DPG, apesar das diferenças intrínsecas, das moléculas de hemoglobina (Val e Almeida-Val 1988; Val *et al.* 1995; Val *et al.* 1990; Val 2000).

Tabela 2. Dados das concentrações calculada em triplicata das amostras de fosfatos eritrocitários (ATP e GTP) em espécies de peixes da Amazônia C1 (acará-bandeira), C2 (acará-açu), M1 (matrinxã), T2 (tambaqui), B1 (bodó), B2 (cascudo), e as correlações de (ATP/GTP).

Amostra	ATP [ $\mu\text{LMol.mL}^{-1}$ ]	GTP [ $\mu\text{LMol.mL}^{-1}$ ]	ATP/GTP
C1	0,595	3,433	0,173
C2	0,434	3,232	0,134
M1	0,887	4,862	0,182
T2	0,655	4,092	0,160
B1	1,046	2,092	0,500
B2	0,909	2,306	0,394

Os resultados analíticos acerca dos dois fosfatos eritrocitários (ATP e GTP) em espécies de peixes da Amazônia estão descritos na tabela 3, que mostra as médias da área do pico cromatográfico em triplicata, desvio padrão (DP) e coeficiente de variância (CV) da média. Pode se observar, por meio do método utilizado, sinal significativo dos íons monitorados. Este método tem sido aplicado com sucesso para a determinação de ATP, ADP, AMP, CP e creatina no tecido hepático de ratos (Jiang *et al.* 2012).

Tabela 3. Médias da área do pico cromatográfico, desvio padrão (DP) e coeficiente de variância (CV) da média em triplicata de dois fosfatos eritrocitários (ATP e GTP) em espécies de peixes da Amazônia C1 (acará-bandeira), C2 (acará-açu), M1 (matrinxã), T2 (tambaqui), B1 (bodó), B2 (bodó-cascudo).

ATP				GTP			
Amostras	Média da área	DP	CV (%)	Amostras	Média da área	DP	CV (%)
C1	$7,9181 \times 10^4$	$1,10 \times 10^4$	13,84	C1	$2,0412 \times 10^5$	$3,42 \times 10^4$	16,75
C2	$5,5135 \times 10^4$	$4,91 \times 10^3$	8,91	C2	$1,9209 \times 10^5$	$2,02 \times 10^4$	10,49
M1	$1,2248 \times 10^5$	$9,14 \times 10^3$	7,46	M1	$2,8963 \times 10^5$	$2,19 \times 10^4$	7,58
T2	$8,7992 \times 10^4$	$1,17 \times 10^4$	13,28	T2	$2,4360 \times 10^5$	$2,35 \times 10^4$	9,65
B1	$1,4626 \times 10^5$	$1,30 \times 10^3$	0,89	B1	$1,2391 \times 10^5$	$5,45 \times 10^2$	0,44
B2	$1,2581 \times 10^5$	$3,87 \times 10^3$	3,08	B2	$1,3672 \times 10^5$	$4,90 \times 10^3$	3,58

Os cromatogramas por LC-MS/MS dos fosfatos eritrocitários de peixes demonstram o mesmo tempo de saída dos íons precursores monitorados (ATP e GTP), com maior intensidade do sinal no ATP da amostra B1, sendo a média da área do pico cromatográfico  $1,4626 \times 10^5$ , já a intensidade menor foi do GTP da amostra B1, sendo  $1,2391 \times 10^5$ , diferente das intensidades das demais amostras. Na amostra B2 a intensidade do sinal dos íons precursores de ATP teve a média da área do pico cromatográfico  $1,2581 \times 10^5$ , e do GTP com intensidade  $1,3672 \times 10^5$ , observando uma proximidade dos dois fosfatos analisados.

## CONCLUSÃO

O método de qualificação e quantificação dos fosfatos eritrocitários de peixes por LC-MS/MS apresenta exatidão, precisão e rapidez nas análises de nucleotídeos (ATP e GTP), podendo ser utilizado em estudos do metabolismo energético de peixes, que poderá ser empregado em estudos de bioindicadores de estresse no meio aquático.

## REFERÊNCIAS

- Abadi, R.H.H.B. 2003. Analysis of free nucleotide pools of mouse liver tissue by high-pressure liquid chromatography (HPLC), *Biochem Biophys*, 40: 209–212.
- Bartlett, G.R. 1959. Phosphorus assay in column chromatography. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 234: 466–468.
- Benesch, R.E.; Benesch, R. 1967. The effect of organic phosphates from the human erythrocyte on the allosteric properties of hemoglobin. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 26: 162–167.
- Chanutin, A.; Curnish, R.R. 1967. Effect of organic and inorganic phosphates on the oxygen equilibrium of human erythrocytes. *Arch. Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 121: 96–102.
- Jiang, Y.; Sun, C.; Ding, X.; Yuan, D.; Chen, K.; Gao, B.; Chen, Y.; Sun, A. 2012. Simultaneous determination of adenine nucleotides, creatine phosphate and creatine in rat liver by high performance liquid chromatography–electrospray ionization–tandem mass spectrometry, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 66: 258– 263.
- Maldaner, L.; Collins, C.H.; Jardim, I.C.S.F. 2010. Fases estacionárias modernas para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. *Química Nova*, 33: 1559–1568.
- Rapport, S.; Guest, G.M. 1941. Distribution of acidsoluble phosphorus in the blood cells of various vertebrates. *Journal of Biological Chemistry*, 138: 269–282.
- Val, A.L. 2000. Organic phosphates in the red blood cells of fish. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 125: 417–435.
- Wang J.-m.; Chu, Y.; Li, W.; Wang, X.-y.; Guo, J.-h.; Yan, L.-l.; Ma, X.-h., Ma, Y.-l.; Yin, Q.-h.; Liu, C.-X. 2014. Simultaneous determination of creatine phosphate, creatine and 12 nucleotides in rat heart by LC–MS/MS. *Journal of Chromatography*, 958: 96–101.
- Val, A.L., Lessard, J., Randall, D. 1995. Effects of hypoxia on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): intraerythrocytic phosphates. *Journal of Experimental Biology*, 198: 305–310.
- Val, A.L., Almeida-Val, V.M.F., Affonso, E.G., 1990. Adaptive features of Amazon fishes: hemoglobins, hematology, intraerythrocytic phosphates and whole blood Bohr effect of *Pterygoplichthys multiradiatus* (Siluriformes). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 97: 435–440.
- Val, A.L.; Almeida-Val, V.M.F. 1988. Adaptive features of Amazon fishes. Hemoglobins of *Brycon cf cephalus* and *Brycon cf erythropterum* (Pisces). *Brazilian Journal of Genetics*, 11: 27–39.

Wang J.-m.; Chu, Y.; Li, W.; Wang, X.-y.; Guo, J.-h.; Yan, L.-l.; Ma, X.-h., Ma, Y.-l.; Yin, Q.-h., Liu, C.-x. 2014. Simultaneous determination of creatine phosphate, creatine and 12 nucleotides in rat heart by LC-MS/MS. *Journal of Chromatography*, 958: 96–101.

Weber, R.E.; Jensen, F.B. 1988. Functional adaptations in hemoglobins from ectothermic vertebrates. *Annual Review of Physiology*, 50: 161-179.