

Biomarcadores e Doenças Relacionadas

QBQ2509: Bioquímica Redox

QBQ5893: Processos Redox em Bioquímica

Dr. Danilo B. Medinas

Material de estudo para prova

Halliwel: Capítulo 6

Manuscritos citados



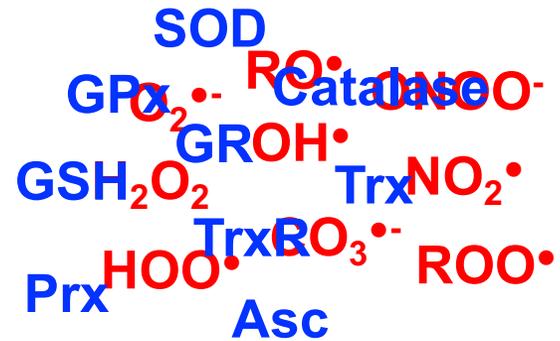
Tópicos e metas da aula

- **Revisar conceito de estresse oxidativo e sua relação com doenças**
 - **Discutir o balanço redox na célula e efeito de causalidade.**
- **Definir biomarcadores.**
 - **Entender critérios para estabelecimento de biomarcadores.**
- **Recapitular de tipos de biomarcadores de estresse oxidativo.**
 - **Revisão dos principais produtos de oxidação de biomoléculas.**
- **Exemplificar doenças relacionadas ao estresse oxidativo.**
 - **Reconhecer evidências experimentais, biomarcadores, que sugerem a participação do estresse oxidativo na etiologia ou progressão de doenças.**

Estresse Oxidativo – Revisão



Estresse Oxidativo – Revisão



Estresse Oxidativo – Revisão

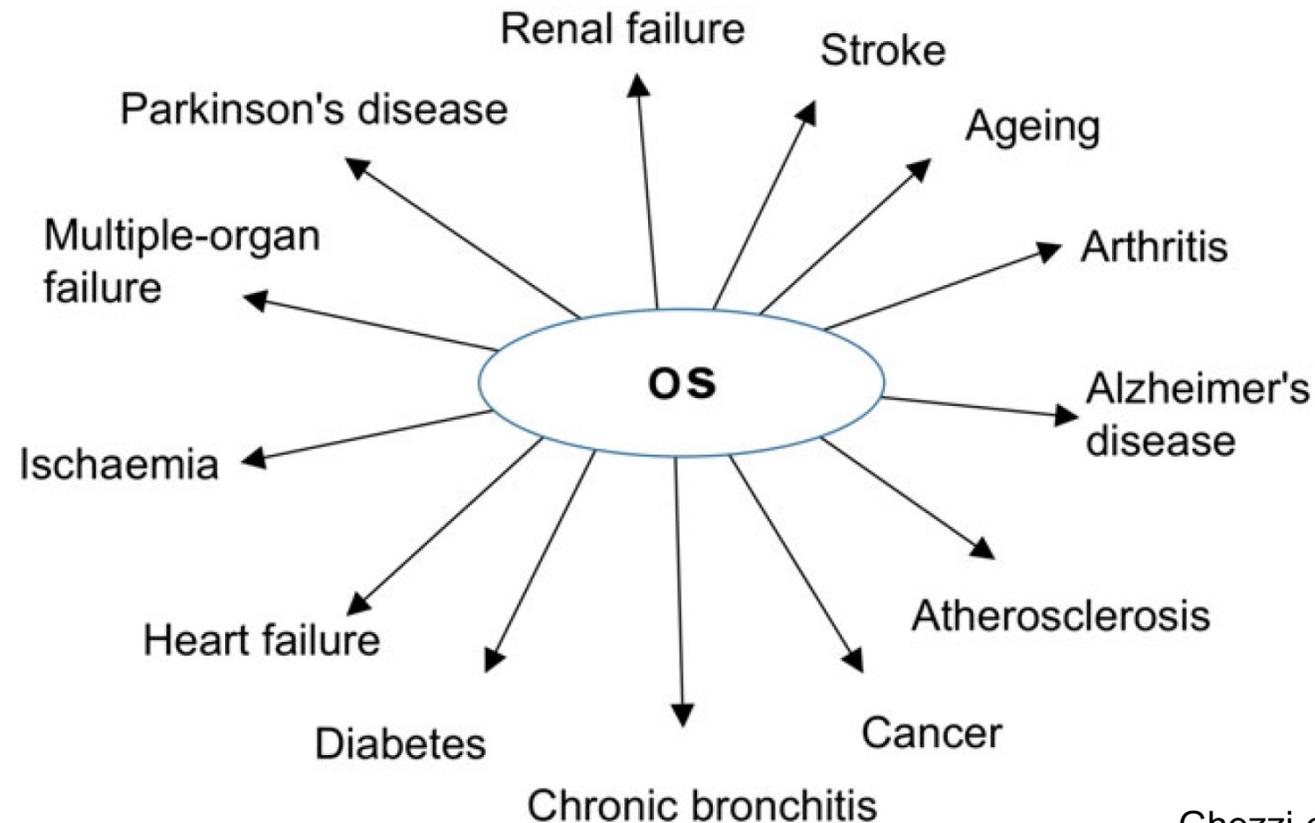
SOD
GPx Catalase
GR Trx
TrxR
Prx Asc
GSH

RO[•] ONOO⁻
O₂^{•-} OH[•] NO₂[•]
H₂O₂ HOO[•] CO₃^{•-}
ROO[•]



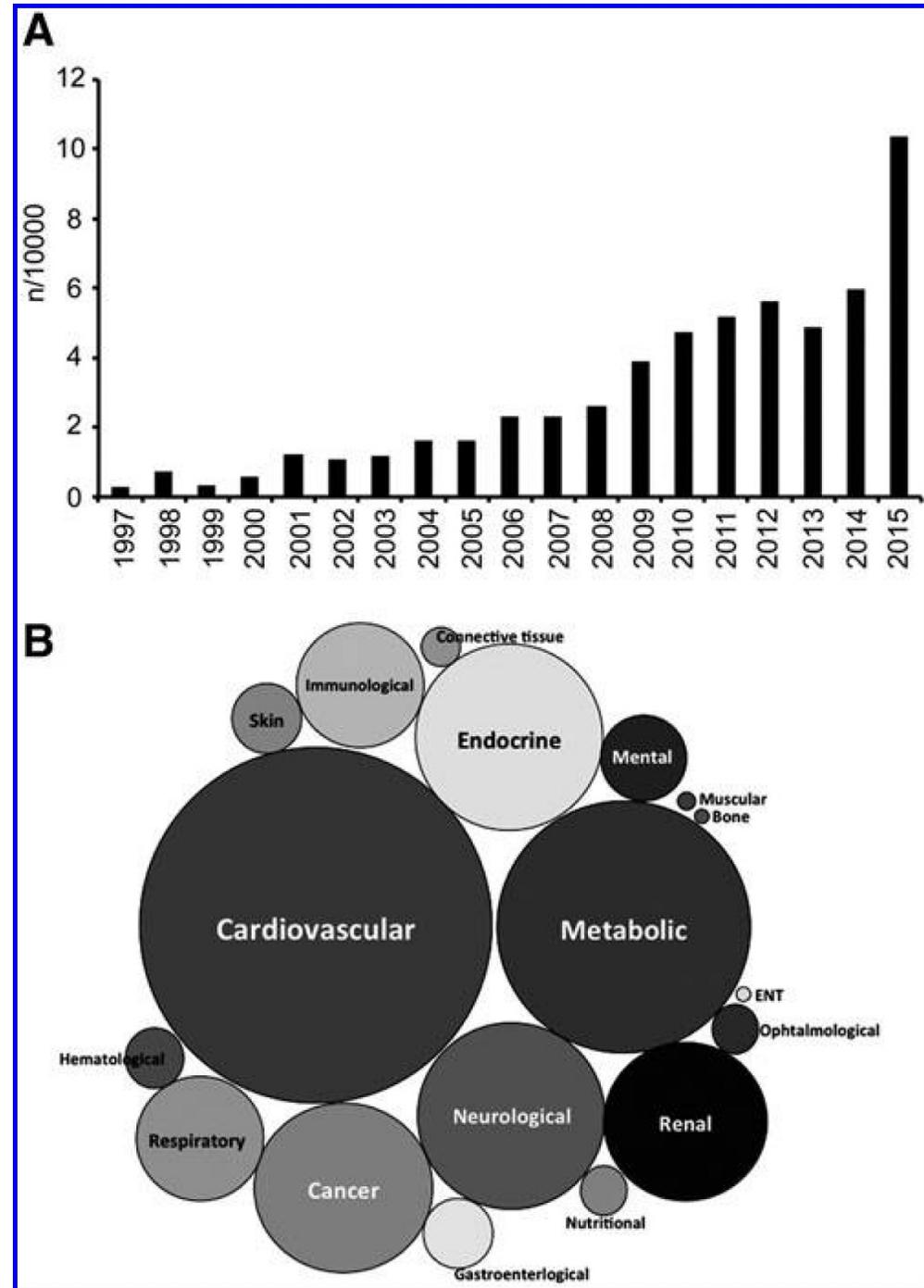
Consequências do Estresse Oxidativo?

-Teoria do estresse oxidativo em doenças: Oxidantes são deletérios e causam danos (modificações químicas) em biomoléculas que alteram sua função e integridade da informação genética, causando diferentes patologias.



Panorama Bibliográfico

Frijhoff *et al*, ARS, 2015



Problemas com a Teoria do Estresse Oxidativo

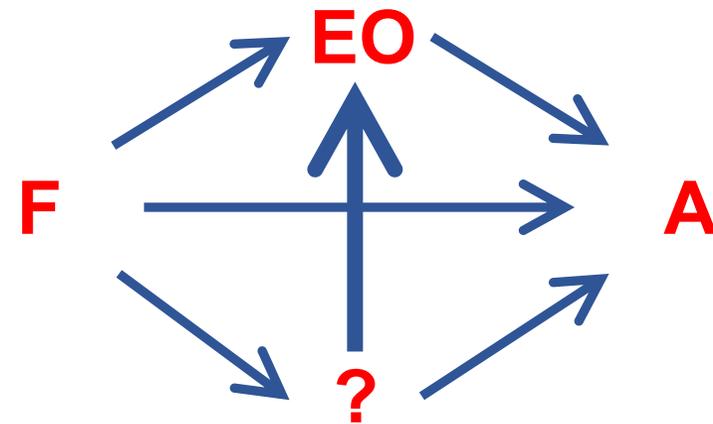
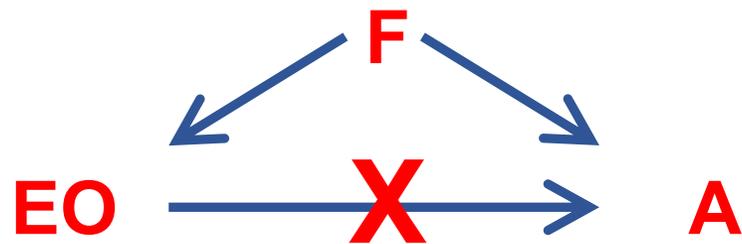
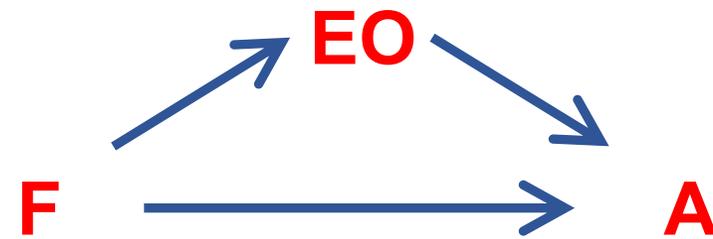


-Nenhuma doença cuja etiologia envolva estresse oxidativo foi provada.

-Terapias antioxidantes não mostraram eficácia em testes clínicos randomizados, apesar de resultados positivos terem sido obtidos em modelos experimentais.

-Teoria popular que remete ao equilíbrio de forças entre o bem e o mal. Grande mercado de suplementos antioxidantes, **não reembolsáveis por planos de saúde.**

Causalidade



Sabendo que oxidantes também exercem efeitos fisiológicos benéficos a saúde, como neutralizar somente os oxidantes deletérios?

O que é um biomarcador?



A OMS definiu um biomarcador como qualquer substância, estrutura ou processo que pode ser mensurado no corpo ou em seus produtos (*sangue, urina, saliva, pele*) e influenciar ou prever a incidência e o resultado de uma doença.

Ainda não temos um biomarcador de estresse oxidativo que cumpra todos os critérios acima (embora seja provável que distúrbios oxidativos ocorram em doenças e mesmo causem algumas delas e que vários dos biomarcadores cumpram os critérios técnicos/analíticos) (nem sempre com custos atuais viáveis para análises clínicas).

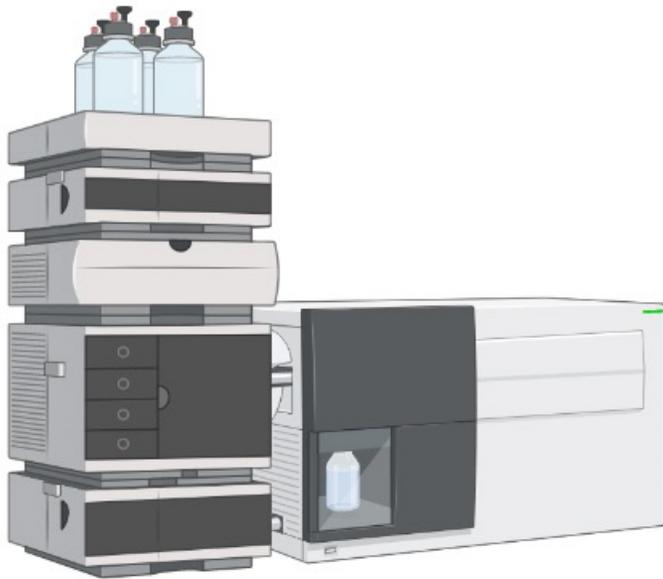
Table 6.1 Criteria for an 'ideal' biomarker of oxidative damage.

-
- A. Fundamental criterion
The biomarker predicts the later development of pathology or overt disease.
- B. Technical criteria
- i. The biomarker should detect a major part, or at least a fixed percentage, of total oxidative damage to the target molecule *in vivo*.
 - ii. It must employ validated measurement technology, preferably simple to use (if achievable).
 - iii. The result of the assay must be accurate, i.e. give the correct answer for the amount of biomarker present.
 - iv. The coefficient of variation between different assays of the same sample should be very small in comparison with the differences between subjects or the effect of experimental manipulations (e.g. antioxidant supplementation) upon a subject, i.e. the precision ('reproducibility') of the assay should be high.
 - v. It must not be confounded by diet or other physiological factors.
 - vi. It should be stable on storage, not being lost, or formed artefactually, in stored samples.
 - vii. For human use, it is preferable if it can be measured in easily obtainable samples, e.g. blood, urine, saliva, skin, or muscle biopsy.
-

Metodologias: Laboratórios de Pesquisa vs Laboratórios Clínicos

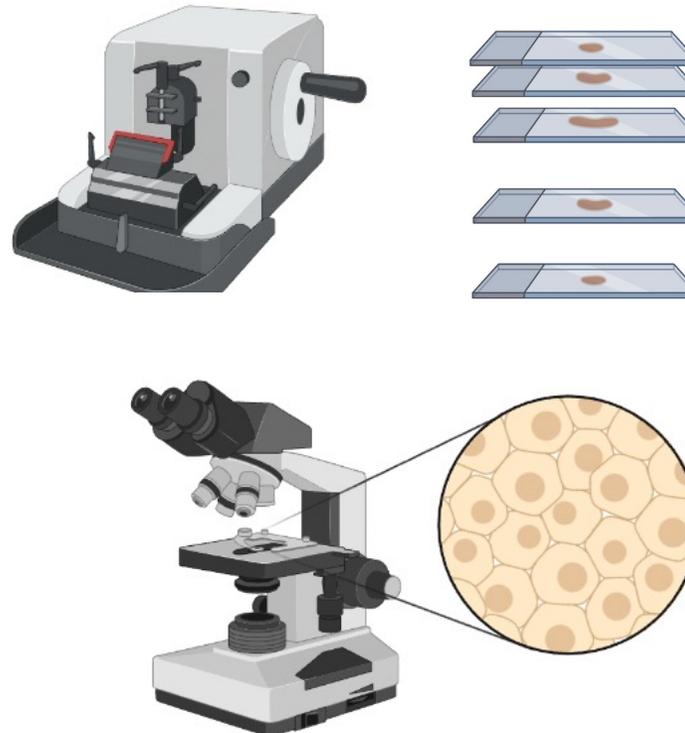
LC-MS/MS

Sensível
Inequívoco
Caro



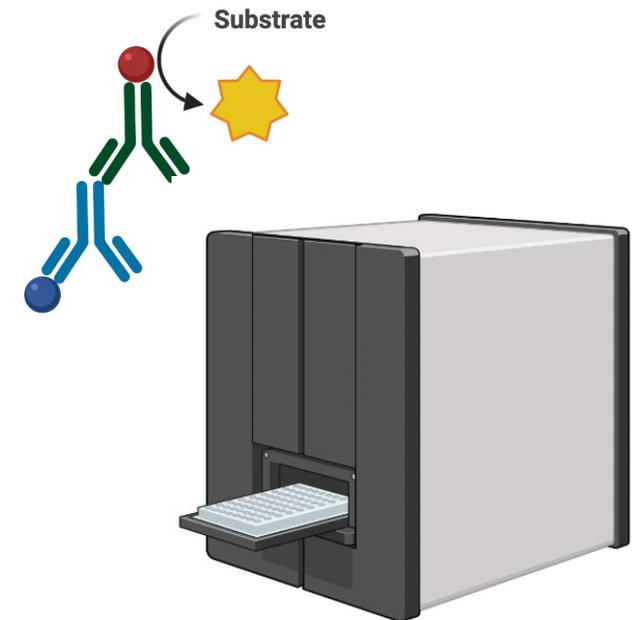
Histopatologia

Sensível
Ruido/Inespecificidade
Consome tempo



ELISA

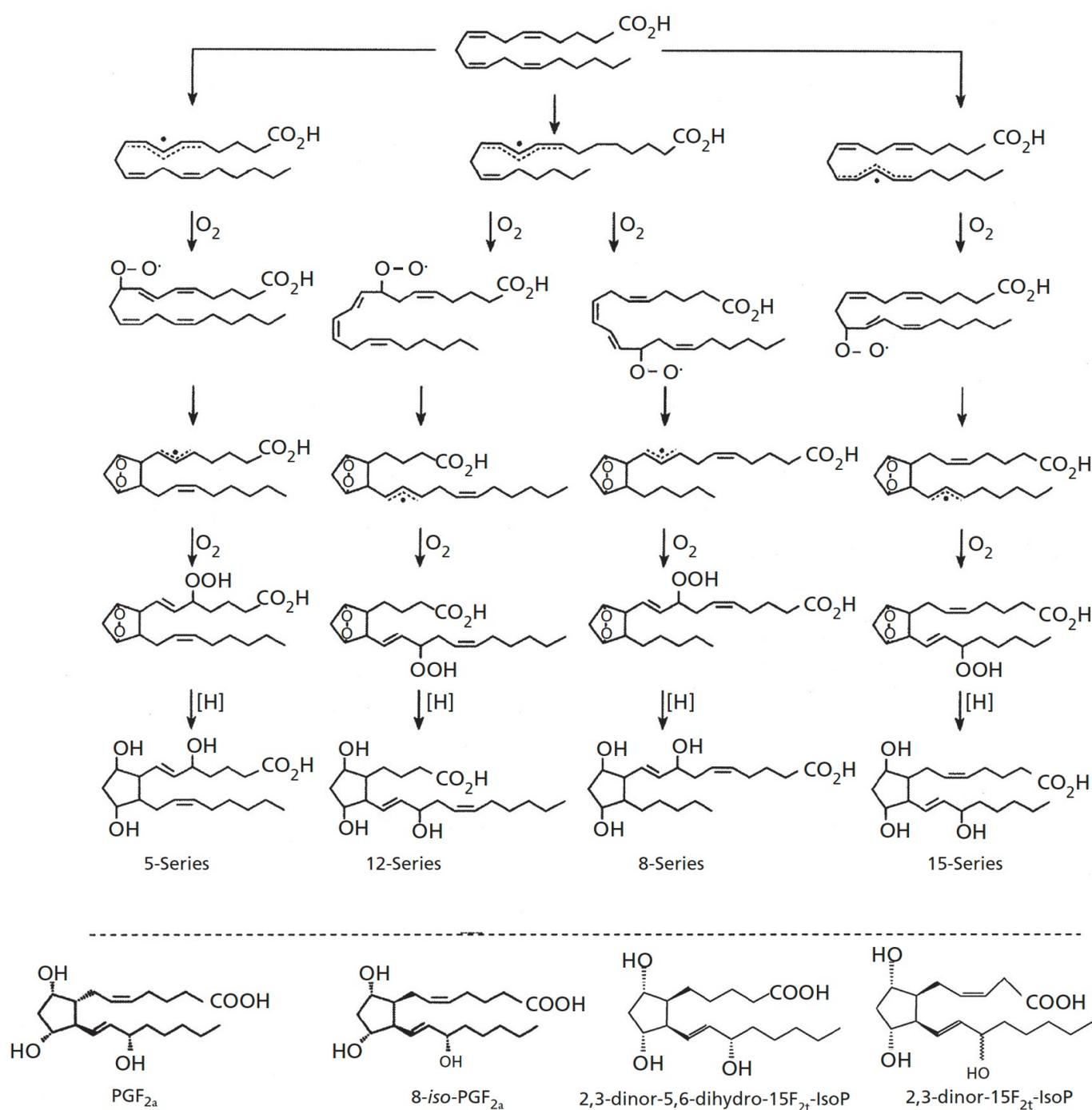
Menos sensível
Ruido/Inespecificidade
Rápido/Acessível



Biomarcadores Padrão Ouro

Isoprostanos: lipoperoxidação do ácido araquidônico

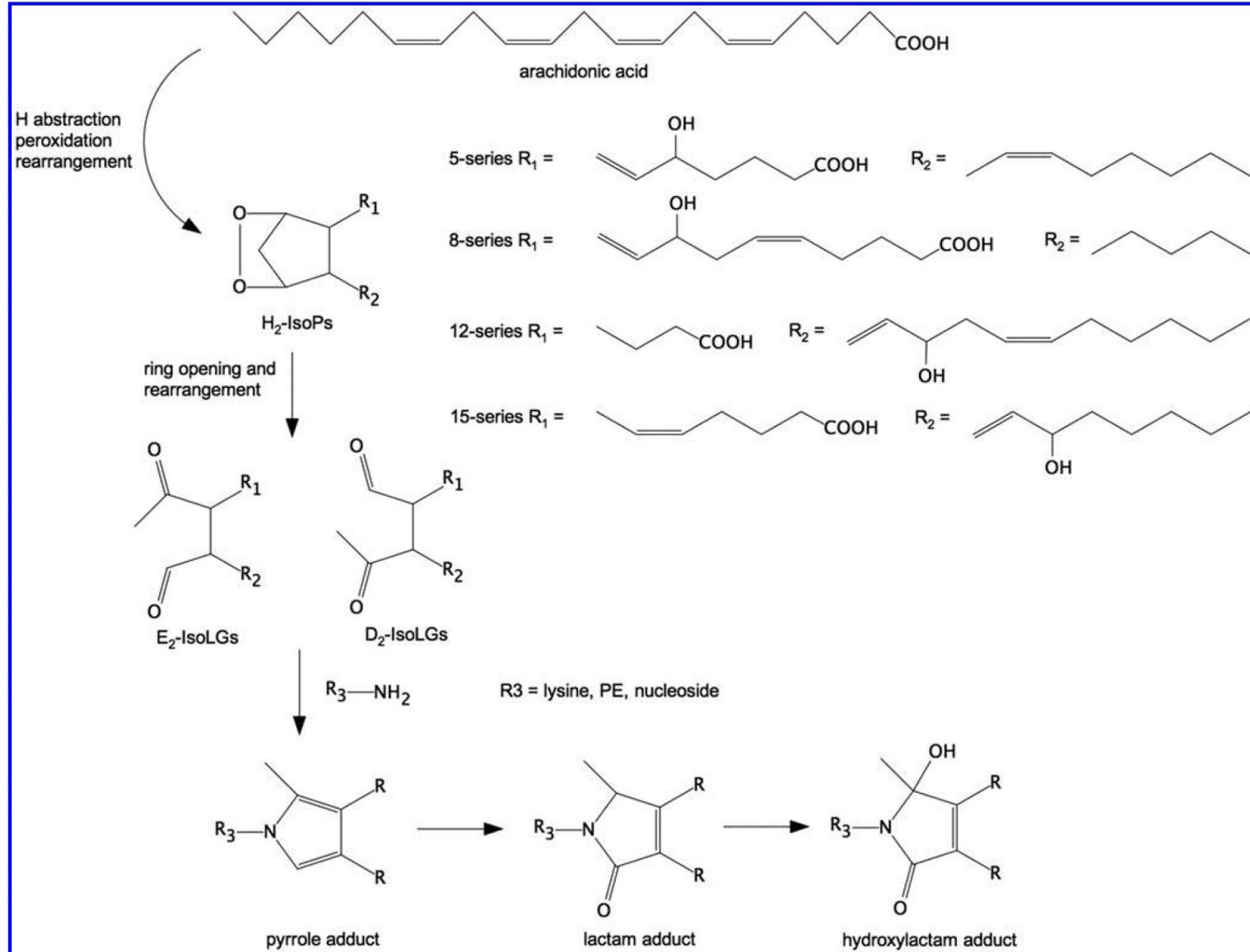
Requer LC-MS/MS



Biomarcadores Padrão Ouro

Isolevuglandinas:
lipoperoxidação do
ácido araquidônico

Requer LC-MS/MS



Alerta

**Não utilizar TBARS (determinação de MDA)
como biomarcadores de lipoperoxidação lipídica**

Biomarcadores Padrão Ouro

3-nitro-tirosina

Histopatologia
ELISA
LC-MS/MS

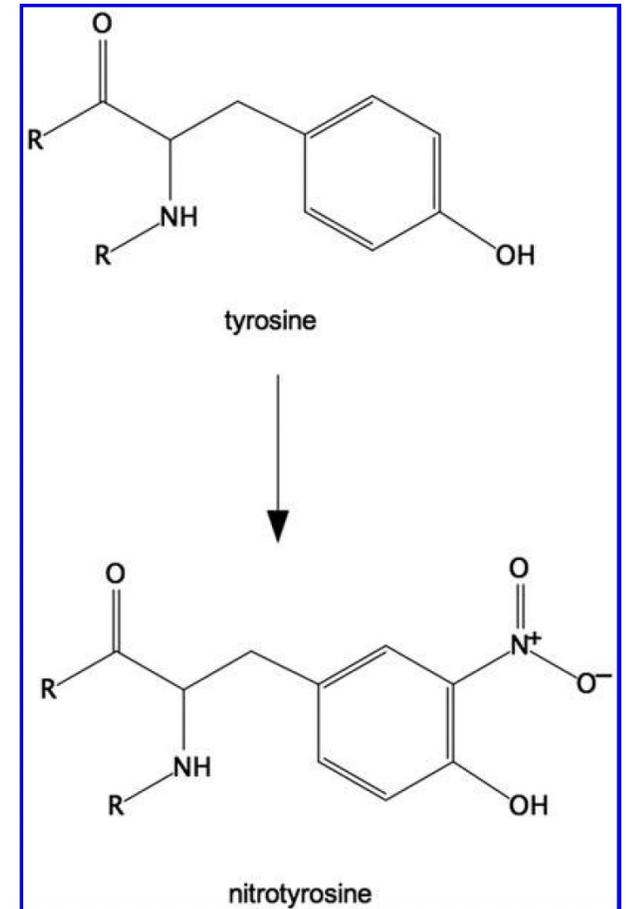
Pathway 1

- a) $O_2^{\cdot-} + \cdot NO \rightarrow ONOO^-$
- b) $ONOO^- + CO_2 \rightarrow \cdot NO_2 + CO_3^{\cdot-}$
- c) $CO_3^{\cdot-} + Tyr \rightarrow Tyr^{\cdot} + HCO_3^-$
- d) $Tyr^{\cdot} + \cdot NO_2 \rightarrow 3\text{-NO}_2\text{-Tyr}$

Pathway 2

- a) $H_2O_2 + MPO \rightarrow \text{Compound I} + H_2O$
- b) $NO_2 + \text{Compound I} \rightarrow \text{Compound II} + \cdot NO_2$
- c) $\text{Compound I} + Tyr \rightarrow \text{Compound II} + Tyr^{\cdot}$
- d) $Tyr^{\cdot} + \cdot NO_2 \rightarrow 3\text{-NO}_2\text{-Tyr}$

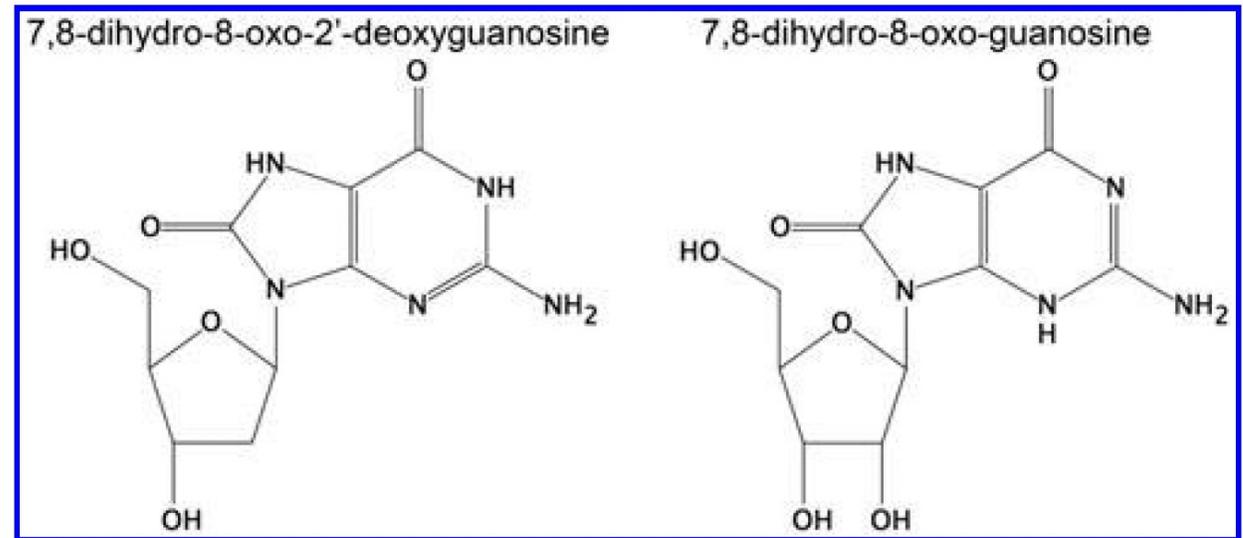
Frijhoff *et al*, ARS, 2015



Biomarcadores Padrão Ouro

8-oxo-2- desoxiguanosina

Histopatologia
ELISA
LC-MS/MS



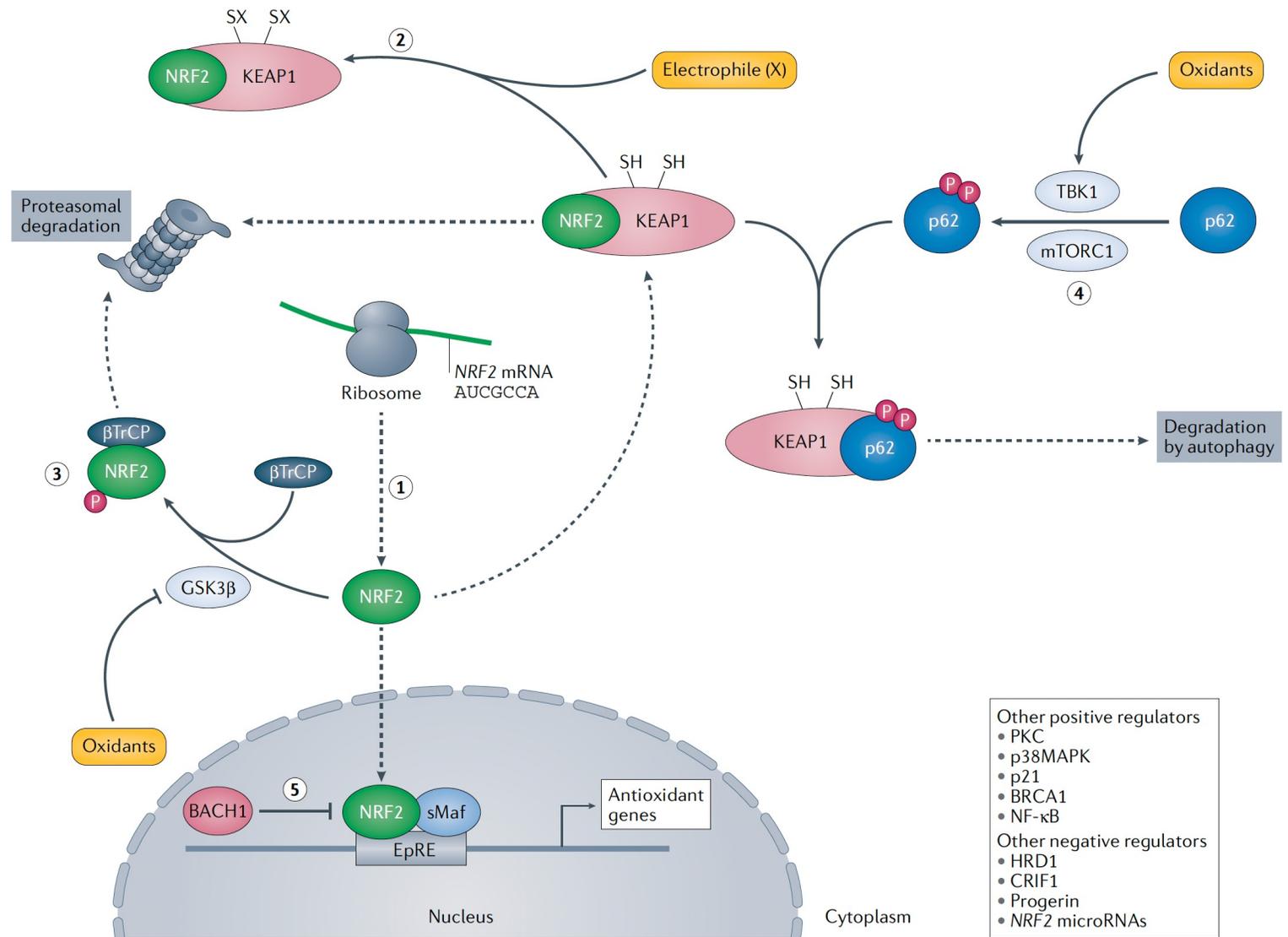
Frijhoff *et al*, ARS, 2015

Podem os níveis de enzimas antioxidantes serem utilizados como biomarcadores de estresse oxidativo?

Situação patológica vs adaptação ao estresse?

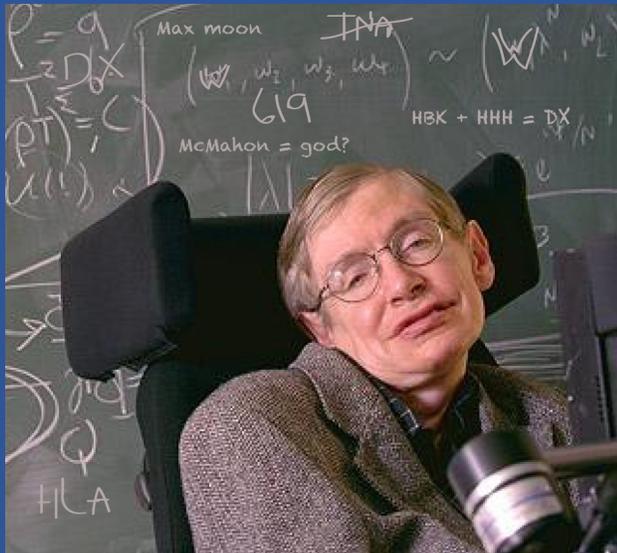
NRF2

Biomarcador para prognóstico do câncer.



Esclerose Lateral Amiotrófica

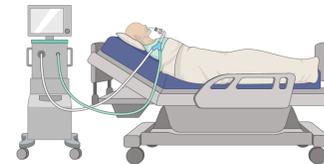
Uma doença oxidante?



A cada 90 min
alguém é diagnosticado
ou alguém falece



55 anos de idade
em média



3 a 5 anos
sobrevivência



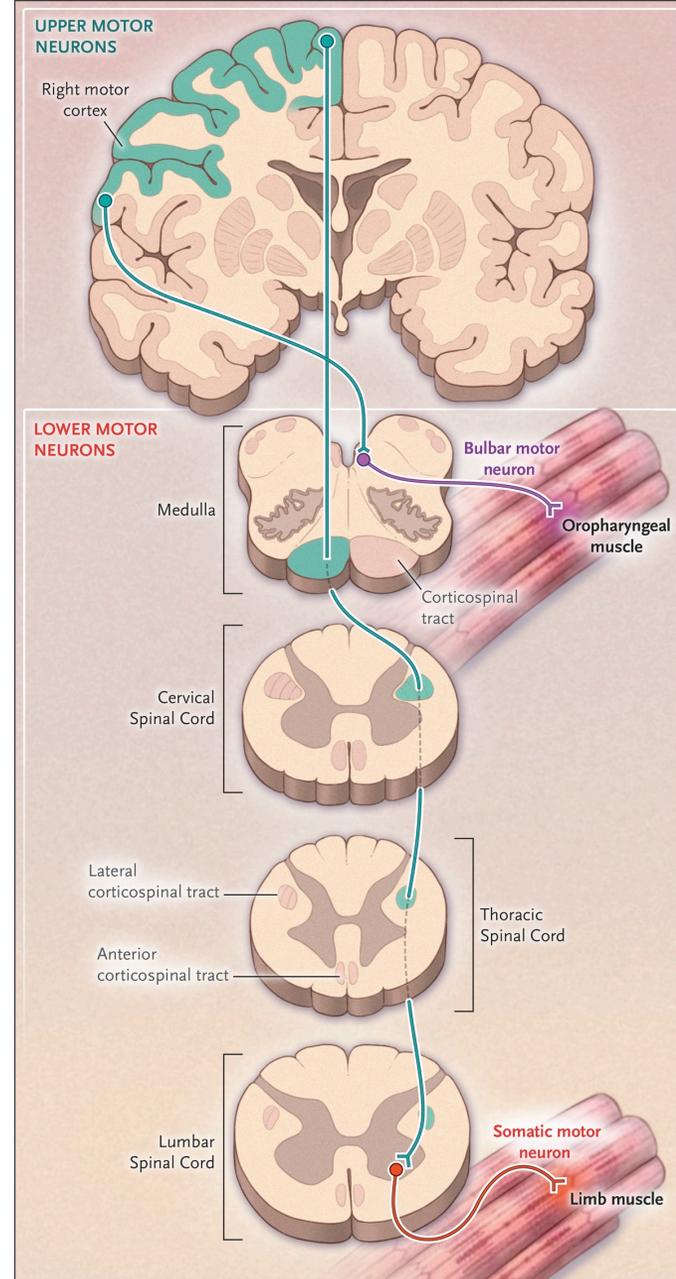
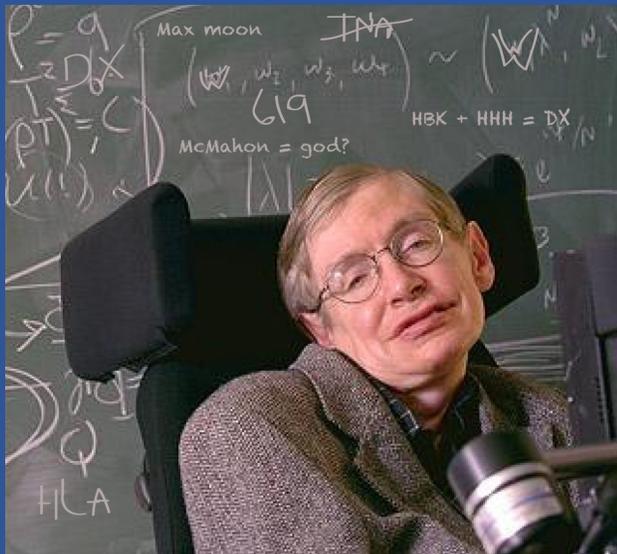
1 em 500 mortes
800.000 personas nos USA



USD\$ 1 bilhão/ano (USA)

Esclerose Lateral Amiotrófica

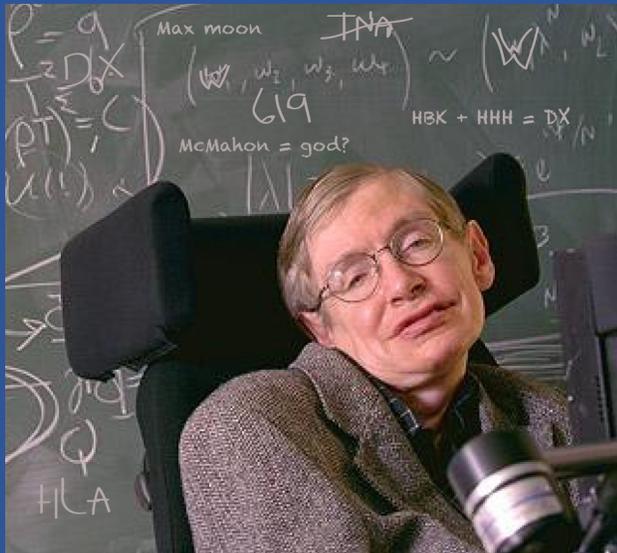
Uma doença oxidante?



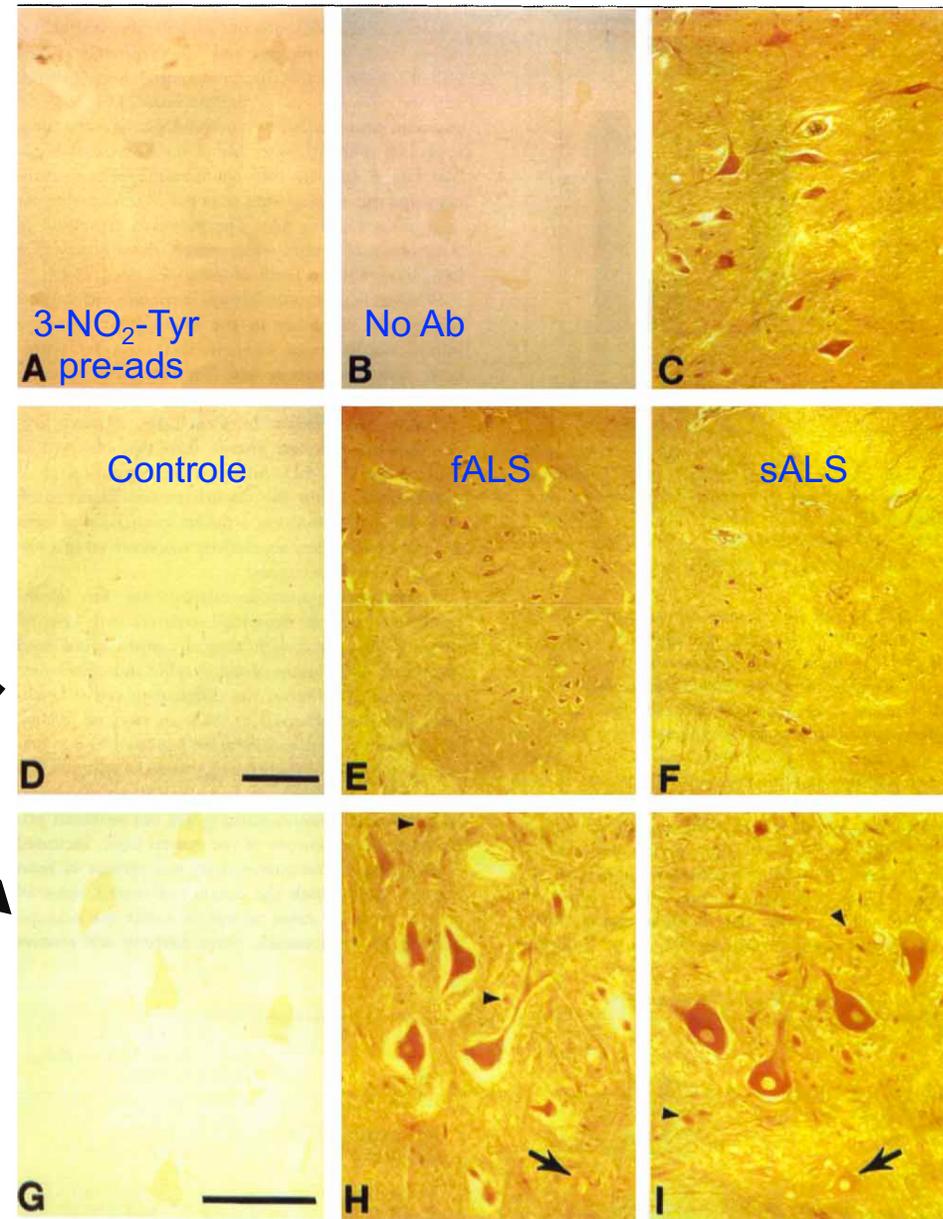
Brown and Al-Chalabi, N Engl J Med, 2017

Esclerose Lateral Amiotrófica

3-NO₂-Tyr como biomarcador

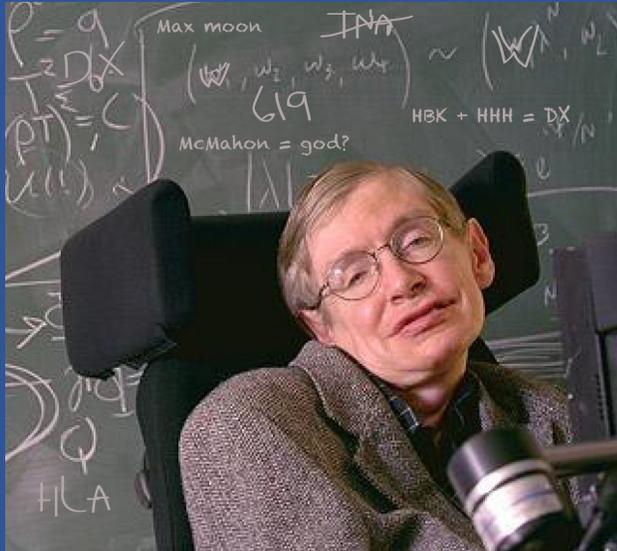


Zoom

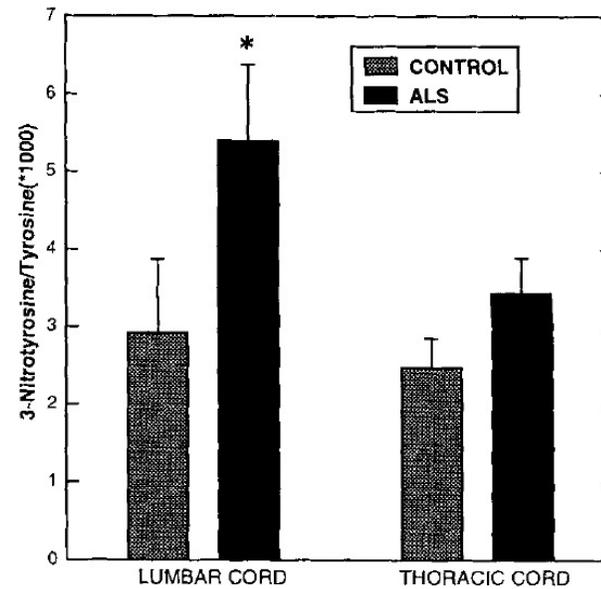


Esclerose Lateral Amiotrófica

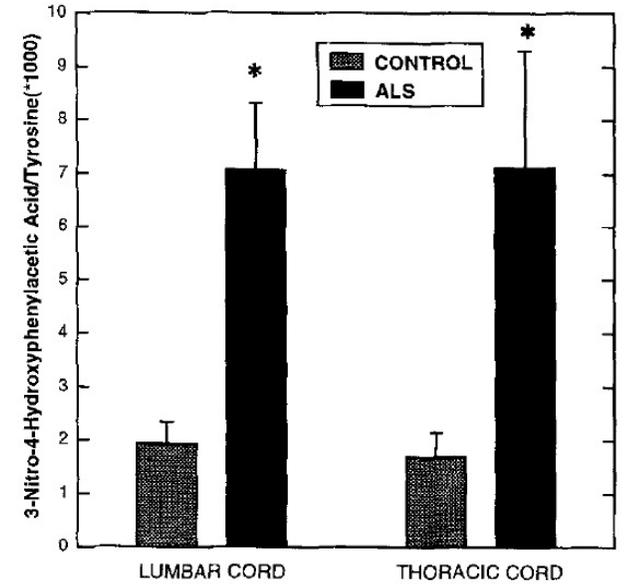
3-NO₂-Tyr como biomarcador



3-NO₂-Tyr

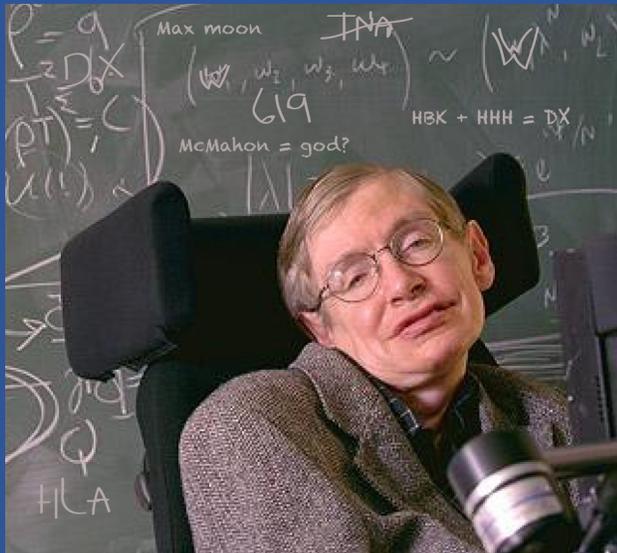


3-NO₂-4-OH-Phenyl Acetic Acid



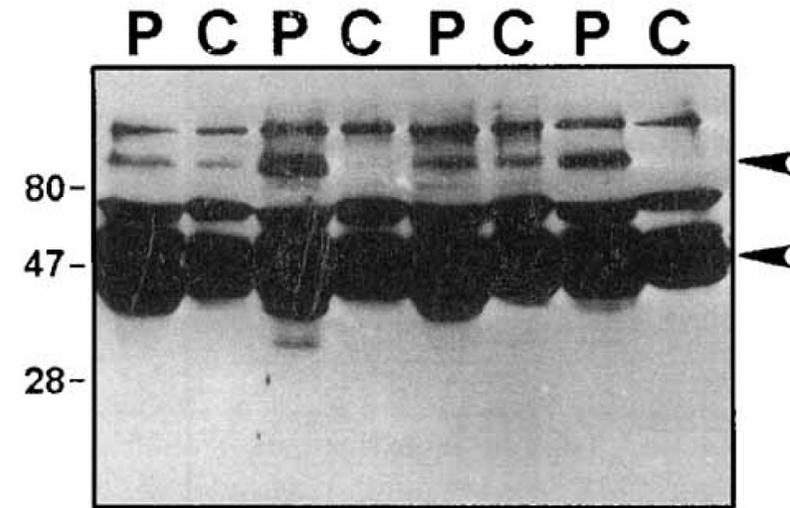
Esclerose Lateral Amiotrófica

4-HNE como biomarcador

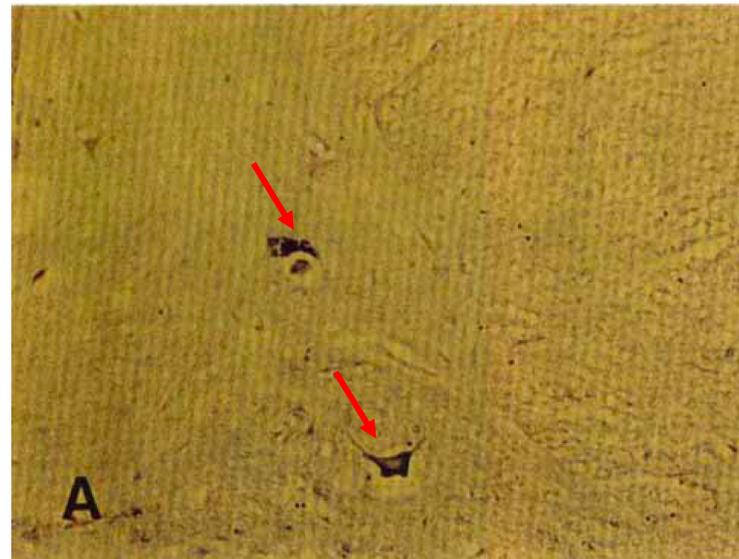


Protein Modification by the Lipid Peroxidation Product 4-Hydroxynonenal in the Spinal Cords of Amyotrophic Lateral Sclerosis Patients

Ward A. Pedersen, PhD,*† Weiming Fu, MD,*
Jeffrey N. Keller, BS,* William R. Markesbery, MD,*‡
Stanley Appel, MD,§ R. Glenn Smith, MD, PhD,§
Edward Kasarskis, MD,‡ and Mark P. Mattson, PhD*†



sALS

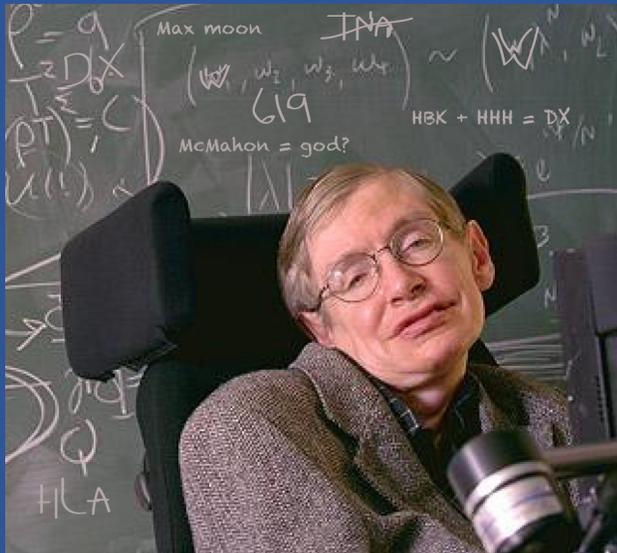


Controle



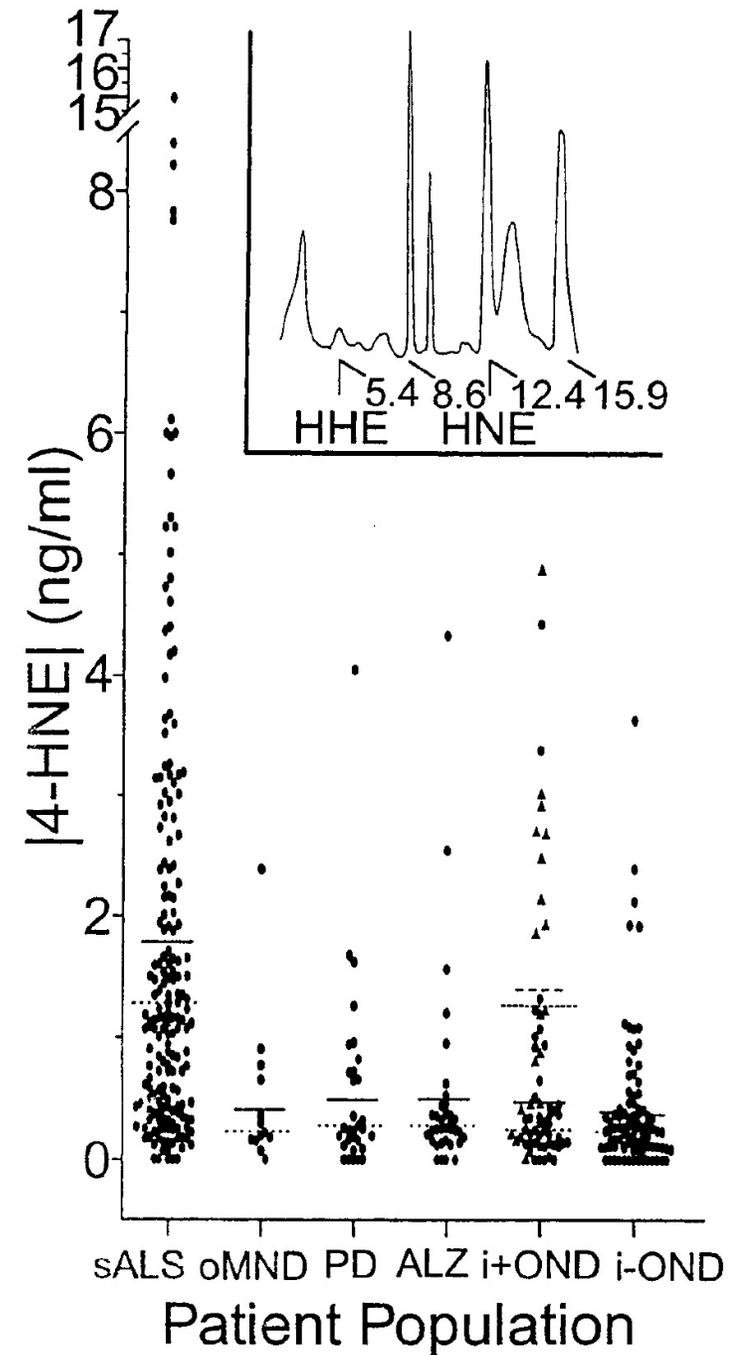
Esclerose Lateral Amiotrófica

4-HNE como biomarcador



Presence of 4-Hydroxynonenal in Cerebrospinal Fluid of Patients with Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis

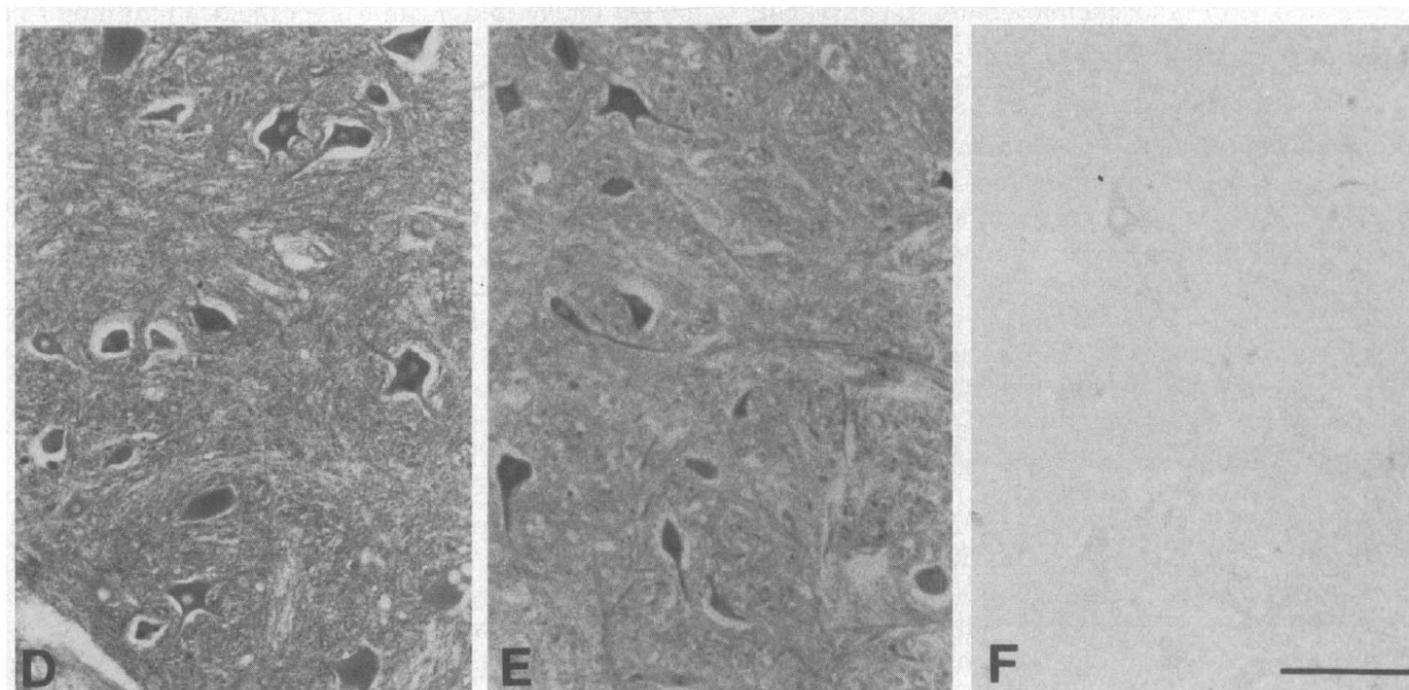
R. Glenn Smith, MD, PhD,* Y. Kay Henry, BS,* Mark P. Mattson, PhD,† and Stanley H. Appel, MD*



Evidence of Increased Oxidative Damage in Both Sporadic and Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis

Robert J. Ferrante, *Susan E. Browne, *Leslie A. Shinobu, *Allen C. Bowling,
*M. Jay Baik, *Usha MacGarvey, Neil W. Kowall, †Robert H. Brown, Jr.,
and *M. Flint Beal

*Geriatric Research Education Clinical Center, VA Medical Center, Bedford, and Neurology and Pathology Departments, Boston University School of Medicine, Boston; and *Neurochemistry Laboratory and †Day Neuromuscular Research Laboratory, Neurology Service, Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, U.S.A.*



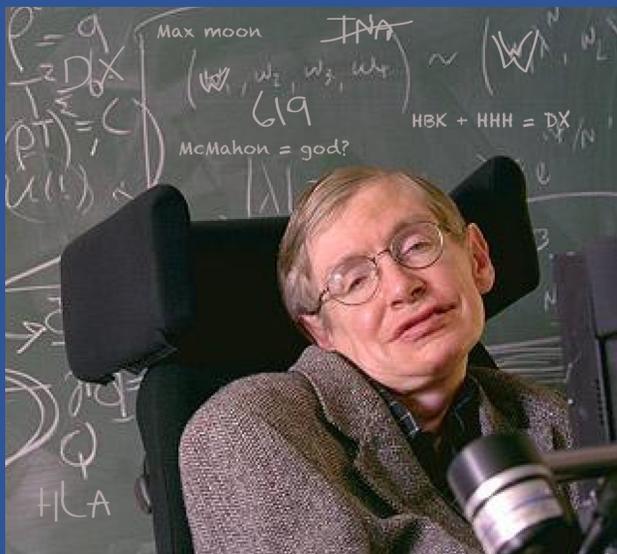
ALS

Isquemia cerebral

Controle

Esclerose Lateral Amiotrófica

8-oxo-2- desoxiguanosina

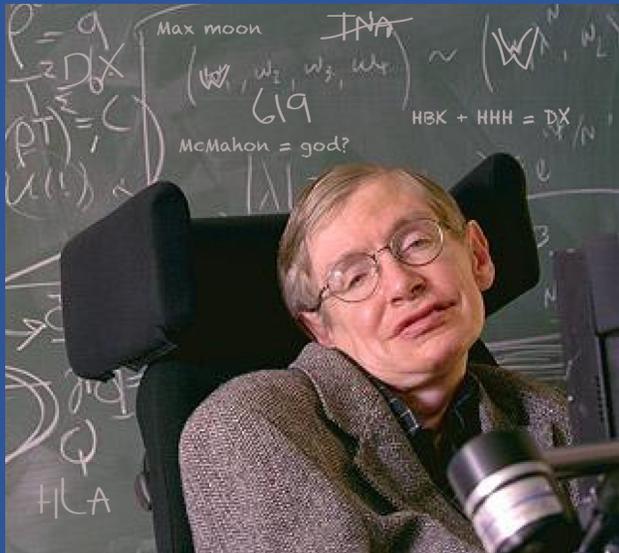


A evidência convence?

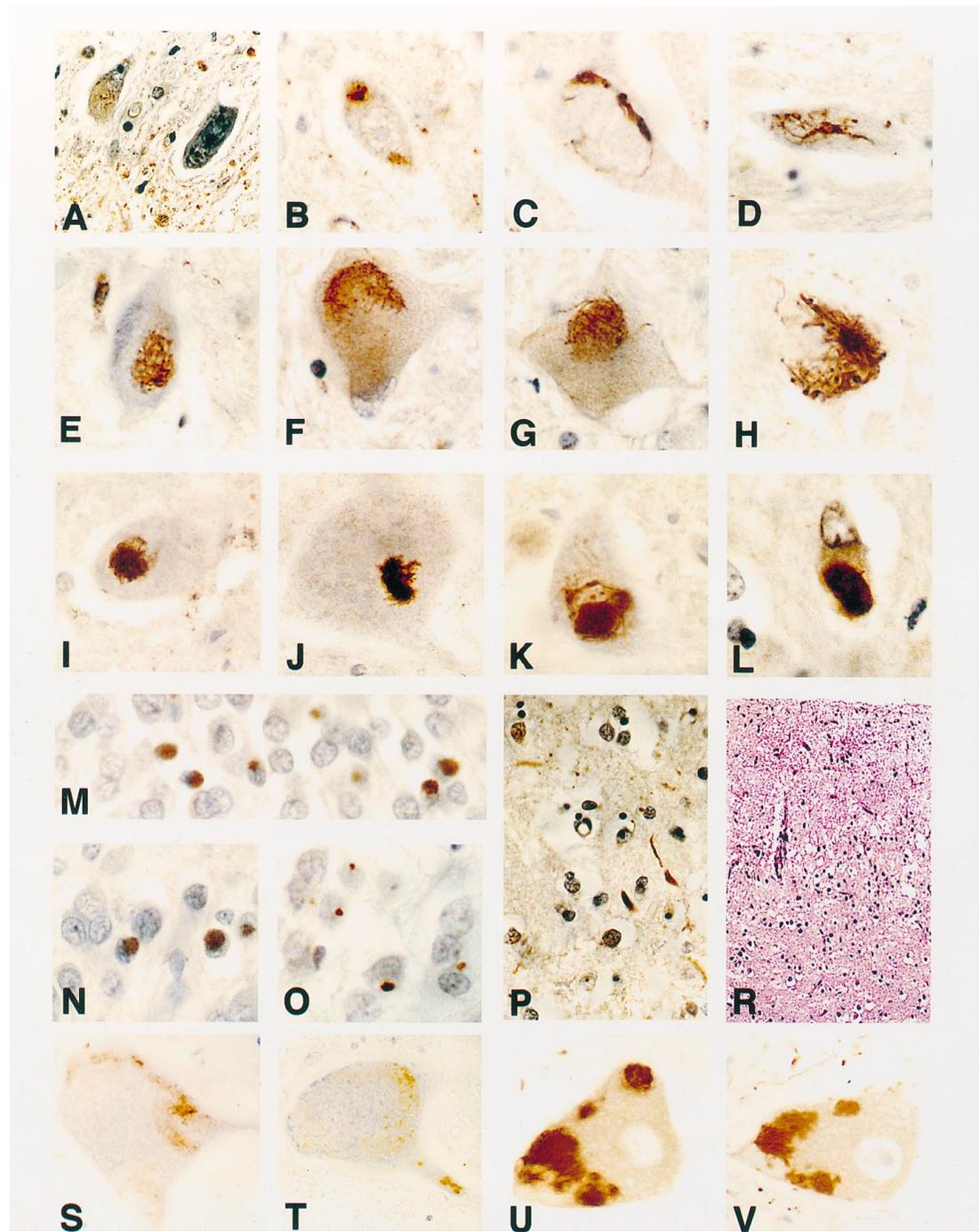
**Importante utilizar vários biomarcadores
nas mesmas amostras**

Esclerose Lateral Amiotrófica

Uma doença conformacional

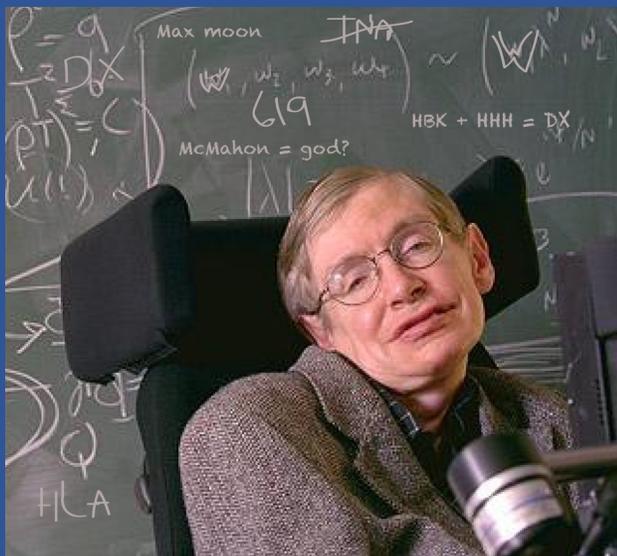


Variedade de agregados Poli-Ub



Esclerose Lateral Amiotrófica

Novas terapias



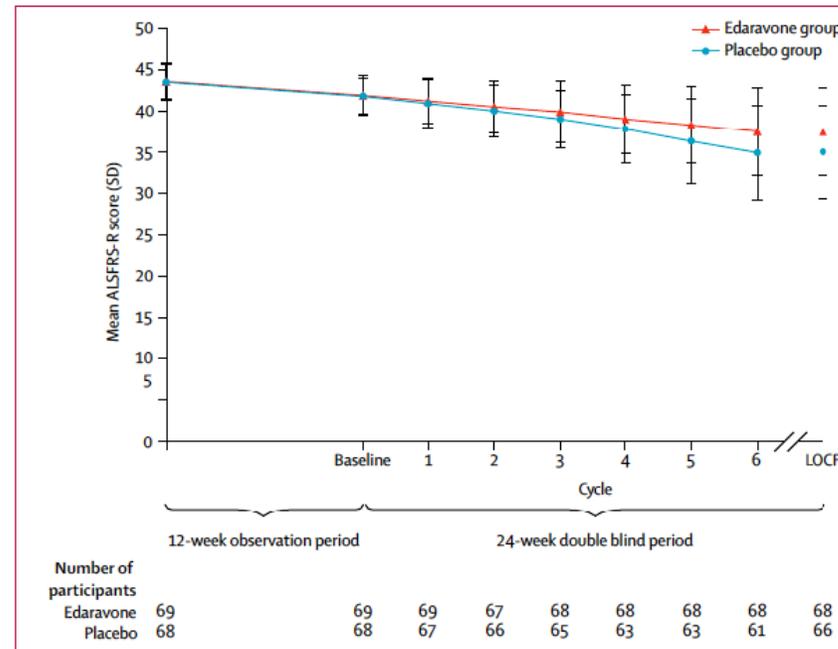
Radicava[®]
(edaravone) *IV infusion*
30mg/100mL

Única terapia
(supostamente) antioxidante
aprovada pela FDA
USD \$100,000/ano

Safety and efficacy of edaravone in well defined patients with amyotrophic lateral sclerosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial



The Writing Group* on behalf of the Edaravone (MCI-186) ALS 19 Study Group†



Recapitulando as metas da aula

- **Estresse oxidativo: espécies oxidantes e biomoléculas alvo**
- **Estresse oxidativo e Doenças: Causa ou Consequência**
- **Biomarcadores e metodologias analíticas**
- **Tipos de biomarcadores de estresse oxidativo: Produtos finais de oxidação, estáveis.**
- **Exemplo da ELA.**

Bibliografía

- **Halliwell and Gutteridge, Free Radicals in Biology and Medicine, 5th Edition, 2015.**
- **Manuscritos citados.**

Questões de Acompanhamento

1. Explique o que é um biomarcador e suas características.
2. Busque e compare vantagens e desvantagens de metodologias analíticas para medir biomarcadores de estresse oxidativo em laboratórios de pesquisa e clínicos.
3. Que estratégia você empregaria para medir a eficiência de um antioxidante em um ensaio clínico?