

Nutrologia: Análise e Avaliação da Composição e Cinética de Nutrientes em Diversos Compartimentos e Tecidos do Organismo Humano

Analysis and Evaluation of Nutrient Composition and Kinetics in Various Compartments and Tissues of Human Body

¹ Eugênio Cersósimo

² Márcia Varella Morandi Junqueira-Franco

² José Eduardo Dutra de Oliveira

¹ PhD, Centro Ciências da Saúde da Universidade do Texas, San Antonio, TX, USA

² PhD, Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, Brasil

Conflitos de interesse: Os autores declaram que não há conflitos de interesse

RESUMO

Nutrologia é uma especialidade médica reconhecida no Brasil pela Associação Médica Brasileira e pelas Autoridades da Saúde Brasileira, que estuda as funções dos nutrientes da alimentação na saúde, nas doenças e na prevenção de doenças. A Nutrologia na prática médica clínica estuda também o relevante papel dos nutrientes no diagnóstico clínico, funcional, bioquímico e no tratamento farmacológico, alimentar (dietético) de pacientes e na prevenção das doenças nutricionais (nutropatias). Obesidade, aterosclerose, dislipidemias, diabetes tipo 2, hipertensão, certos tipos de câncer, dislipidemias, deficiências de minerais e vitaminas são alguns exemplos de doenças que envolvem primária ou secundariamente distúrbios na ingestão ou metabolismo de nutrientes. Durante o curso dessas doenças ocorrem distúrbios nutricionais característicos, específicos relacionados à ingestão e ao metabolismo de nutrientes e que podem afetar vários ou partes específicas de nosso organismo e devem necessariamente envolver para a sua avaliação médica clínica, diagnóstico e tratamento. Não é possível na clínica, em medicina, em nutrologia fazer o tratamento de doenças sem o diagnóstico clínico, funcional e bioquímico.

Uma avaliação nutrológica completa e especializada, além da história médica clínica nutricional, incluem dados específicos sobre a alimentação familiar, atual e pregressa do paciente desde o nascimento, exame médico pertinente com ênfase na função e fisiopatologia de nutrientes, na transição da saúde para a doença. Ela requer uma série de exames funcionais, bioquímicos, nutrogenéticos/nutrogenômicos, histológicos e fisiológicos dos nutrientes nos diversos compartimentos do corpo humano. Nesta análise que deve sempre ser personalizada, procura-se integrar os processos de ingestão, absorção e metabolismo dos macro e micro-nutrientes, assim como a utilização, o armazenamento e a eliminação dos vários produtos e metabolismo nutricional em cada paciente. Também é fundamental estabelecer-se as propriedades estruturais e funcionais dos nutrientes com ênfase na relação destes com as funções básicas dos órgãos e tecidos do organismo. Este tipo de conhecimento integrado facilita então investigações mais específicas e precisas de repercussões fisiopatológicas que acompanham os distúrbios dos nutrientes e modificam processos biológicos essenciais à vida. O resultado final

desta investigação clínica nutrológica permite uma atualização e um desenvolvimento de programas mais eficazes na prevenção e tratamento clínico de nutropatias, individuais e comunitárias, que estão diretamente ou indiretamente ligadas a distúrbios dos processos orgânicos de nutrientes.

ABSTRACT

Nutrology is recognized medical specialty in Brazil by the Brazilian Medical Association and the Brazilian Health Authorities, which studies the nutrients functions / food on health, illness and disease prevention. The Nutrology clinical studies in medical practice also the important role of nutrients in clinical diagnosis, functional, biochemical and pharmacological treatment, food (dietary) of patients and prevention of nutritional diseases. Obesity, atherosclerosis, dyslipidemia, type 2 diabetes, hypertension, certain cancers, dyslipidemia, deficiencies of minerals and vitamins are some examples of diseases involving disorders in primary or secondary intake or metabolism of nutrients. During the course of these diseases occur characteristic nutritional disorders, specifically related to the intake and metabolism of nutrients. They can affect several or specific parts of our body and must necessarily involve a medical evaluation for clinical diagnosis and treatment the physician nutrition specialist, who is a specialist in the study of nutrients in health and disease. It is not possible in the clinic, in medicine, nutrology to treat diseases without clinical, biochemical and functional.

The nutrologic analysis complete and specialized medical history beyond clinical nutrition, including specific data on family diet, the patient's current and past since birth, relevant medical examination with emphasis on function and pathophysiology of nutrients in the transition from health to disease. It requires a series of functional tests, bioquímicos, nutrogenéticos / nutrogenômicos, histological and physiological effects of nutrients in different compartments of the human body. This analysis should always be seeks to integrate the processes of ingestion, absorption and metabolism of macro and micro-nutrients, as well as the utilization, storage and elimination of various products and nutritional metabolism in each patient. Also it is essential to establish the structural and functional properties of nutrients with emphasis on their relationship with the basic functions of the organs and tissues of the body. This type of integrated knowledge facilitates investigations then more specific and accurate physiological repercussions accompanying disorders of nutrients and modify biological processes essential to life. The end result of this nutritional clinical research allows an upgrade and development of more effective prevention and treatment of nutritional diseases, individual and community, which are directly or indirectly linked to disturbances of the processes of organic nutrients.

INTRODUÇÃO

Nutrologia é uma especialidade médica reconhecida no Brasil pela Associação Médica Brasileira e pelas Autoridades da Saúde Brasileira, que estuda as funções dos nutrientes/da alimentação na saúde, nas doenças e na prevenção de doenças. A Nutrologia na prática médica clínica estuda também o relevante papel dos nutrientes no diagnóstico clínico, funcional, bioquímico e no tratamento farmacológico, alimentar (dietético) de pacientes e na prevenção das doenças nutricionais (nutropatias). Obesidade, aterosclerose, dislipidemias, diabetes tipo 2, hipertensão, certos tipos de câncer, dislipidemias, deficiências de minerais e vitaminas são alguns exemplos de doenças que envolvem primária ou secundariamente distúrbios na ingestão ou metabolismo de nutrientes. Durante o curso dessas doenças ocorrem distúrbios nutricionais característicos, específicos relacionados à ingestão e ao metabolismo de nutrientes. Eles

podem afetar vários ou partes específicas de nosso organismo e devem necessariamente envolver para a sua avaliação médica clínica, diagnóstico e tratamento o médico nutrólogo¹.

Uma avaliação nutrológica especializada, além da história médica clínica nutricional, incluem dados específicos sobre a alimentação familiar, atual e pregressa do paciente desde o nascimento, de exame médico pertinente com ênfase na função e fisiopatologia de nutrientes, na transição da saúde para a doença. Ela requer uma série de exames funcionais, bioquímicos, nutrogenéticos/nutri-genômicos, histológicos e fisiológicos dos nutrientes nos diversos compartimentos do corpo humano. Nesta análise que deve sempre ser personalizada, procura-se integrar os processos de ingestão, absorção e metabolismo dos macro e micro-nutrientes, assim como a utilização, o armazenamento e a eliminação dos vários produtos e metabolismo nutricional em

cada paciente. Também é fundamental estabelecer as propriedades estruturais e funcionais dos nutrientes com ênfase na relação destes com as funções básicas dos órgãos e tecidos do organismo. Este tipo de conhecimento integrado facilita então investigações mais específicas e precisas de repercussões fisiopatológicas que acompanham os distúrbios dos nutrientes e modificam processos biológicos essenciais à vida. O resultado final desta investigação clínica nutrológica permite uma atualização e um desenvolvimento de programas mais eficazes na prevenção e tratamento clínico de nutropatias, individuais e comunitárias, que estão diretamente ou indiretamente ligadas à distúrbios dos processos orgânicos de nutrientes¹.

Com base nestas premissas, apresentamos a seguir uma abordagem parcial de avaliações, equipamentos e instrumentos de laboratório que podem auxiliar e complementar uma avaliação nutrológica em condições especificadas abaixo e dentro do conceito de um “Centro de Excelência e Referência em Nutrologia” envolvendo quatro áreas de grande avanço:

- 1) Composição Corporal avaliada por I) DEXA SCAN, II) Ressonância Magnética Nuclear e III) Tomografia Computorizada;
- 2) Cinética de Nutrientes e Fisiologia Moleculares I) Cromatografia Gasosa e Espectrometria de Massa (GC/MS) e Cromatografia Líquida (LC), II) Tecnologia XF para estudo da função mitocondrial;
- 3) Nutrigenômica;
- 4) Histomorfometria.

1) COMPOSIÇÃO CORPORAL

A análise da composição corporal é parte fundamental de uma avaliação nutrológica adequada em cada indivíduo. A quantificação da massa proteica e da adiposidade total do organismo, assim como a distribuição de gordura nos compartimentos do tecido celular subcutâneo e visceral deve ser feita com exatidão e precisão. Uma vez registrado o exato valor de cada componente do organismo e sua distribuição, estas medidas podem ser reproduzidas para se estabelecer uma evolução longitudinal e contínua das mudanças dos nutrientes na composição orgânica em cada indivíduo. É também necessário estabelecer o grau de infiltração de gorduras em órgãos como o fígado, pâncreas, rins e nos músculos cardíaco e esquelético, e em condições

especiais deve ser avaliada a presença de gordura no sistema vascular e no sistema nervoso central. Esta informação é extremamente útil nas decisões terapêuticas e na implementação de medidas de prevenção com manipulação de nutrientes, bem como no acompanhamento de enfermidades associadas aos distúrbios metabólicos. O exame completo também define a densidade ossea, que reflete a constituição da matriz e o conteúdo de sais minerais, principalmente de cálcio do esqueleto humano, de forma global e localizada. Assim, por exemplo a densidade óssea da coluna vertebral lombar, do colo do fêmur e do rádio distal, entre outros, servem como importantes indicadores da saúde óssea². Estes estudos também fornecem informação sobre o nível de hidratação do organismo e estabelecem as proporções de cada componente nos compartimentos orgânicos:

A medida da Composição Corporal pode ser feita com equipamentos que usam:

A) “Dual-Energy X-Ray Absorptiometry” (DEXA SCAN). São convenientes e de relativo baixo custo e manutenção, mas emitem uma pequena radiação durante o teste³.

B) Medição por Ressonância Magnética (MRI): é mais exata e precisa e o exame não emite radiação, mas opera em campo magnético intenso. Tem alto custo de manutenção e requer técnicos com treinamento especializado⁴:

C) Medida por Espectroscopia Ressonância Nuclear Magnética NM: Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear, mais conhecida como Espectroscopia NMR ou ainda espectroscopia de RMN. É uma técnica de pesquisa que explora as propriedades magnéticas de certos núcleos atômicos para determinar propriedades físicas ou químicas de átomos ou moléculas nos quais eles estão contidos. Baseia-se no fenômeno da ressonância magnética nuclear e podem prover informações detalhadas sobre a estrutura, dinâmica, estado de reação e ambiente químico das moléculas. A Espectroscopia NMR Ressonância Nuclear Magnética é mais frequentemente usada por Químicos e Bioquímicos para investigar as propriedades de moléculas orgânicas, embora seja aplicável para qualquer núcleo que possua spin. Isto é válido de compostos pequenos analisados com próton ou carbono unidimensional a grandes proteínas ou ácidos nucleicos usando técnicas de análise em 3 ou 4 dimensões. O impacto da Espectroscopia NMR nas ciências naturais tem

sido substancial, e pode ser aplicado em uma larga variedade de amostras em solução e estado sólido⁵.

D) Medida por tomografia computadorizada: Vários modelos de instrumentos de tomografia computadorizada se encontram a disposição no mercado⁶.

2) CINÉTICA DE NUTRIENTES (FISIOLOGIA MOLECULAR)

O conhecimento da cinética dos nutrientes e de derivados moleculares é de fundamental relevância no que diz respeito a fisiologia molecular e fisiopatologia das nutropatias. Uma vez estabelecidas e quantificadas as vias metabólicas predominantes de absorção, utilização, armazenamento e excreção dos diversos nutrientes pode-se elaborar intervenções clínicas e nutricionais mais específicas. Estas teriam como objetivo primordial a normalização (ou recuperação parcial) do fluxo dos nutrientes e derivados intermediários, que podem auxiliar na restauração das relações interorgânicas de nutrientes e promover uma composição corporal mais adequada ao estado funcional de cada indivíduo⁷. Estes estudos dinâmicos incluem análises detalhadas de moléculas no sangue circulante, nos tecidos (por exemplo, tecido adiposo e muscular esquelético) e também, no espaço intracelular citoplasmático e subcelular, como por exemplo, nas mitocôndrias. Tem-se utilizado variadas metodologias para a investigação da fisiologia de nutrientes e cinéticas moleculares no ser humano, quer na saúde como na doença. A grande maioria destes estudos clínicos é invasiva, requerendo infusões intravenosas prolongadas, uso de marcadores isotópicos não radioativos e biópsia tissular transcutânea. A aplicação atual da espectrometria de massa na medicina clínica, é um evento cada vez mais frequente, principalmente quando o homem é o objeto do experimento. Desta maneira, os diferentes aspectos do metabolismo intermediário são possíveis de serem estudados. Os isótopos estáveis são considerados inócuos ao ser humano, assim é possível utilizá-los em mulheres grávidas e crianças. Por outro lado, com o aumento da disponibilidade dos isótopos estáveis e laboratórios que trabalham com a técnica de espectrometria de massa, o seu uso também está se difundindo em nosso meio. A espectrometria de massa permite estudar, por exemplo, a capacidade de síntese de proteína, metabolismo aminoacídico, diagnosticar defeitos de absorção de gordura,

cinética de vitaminas e sugerir o diagnóstico da *Helicobacter pylori*.^{7,8}

2.1) ESPECTROMETRIA DE MASSA

A Espectrometria de Massa, tem sido o método analítico mais aplicado à quantificação de enriquecimento isotópico em amostras biológicas obtidas durante os estudos com isótopos estáveis. As razões pela qual isto acontece são aparentes. A Espectrometria de Massa é o mais rápido, mais sensível, mais específico e mais preciso método analítico praticável pela comunidade biomédica. Teoricamente, desde que a Espectrometria de Massa têm a função de determinar a massa, e como todos os substratos bioquímicos têm massa, este método é potencialmente útil a todos pesquisadores que estudam o metabolismo e suas desordens. A Espectrometria de Massa geralmente é combinada com outras técnicas, tais como cromatografia gasosa, ionização térmica, bombardeamento de átomos e mais recentemente a técnica de plasma indutivo acoplada à Espectrometria de Massa⁹.

2.1.1) IRMS - Espectrometria de Massa por Determinação da Razão Isotópica

O espectrômetro de massa é conhecido pelo fato de obter medidas precisas em concentração isotópica muito baixa. Assim, por exemplo, quantidades de 0,001 MPE (enriquecimento isotópico em mol por cento, além da abundância natural) podem ser determinadas em amostras gasosas, cuja concentração de CO₂ ou de N₂ varia entre micromoles e nanomoles^{7,10}.

A principal limitação desta técnica vem do fato de que a flexibilidade da medida é limitada à utilização de gases puros. Sistemas complexos de separação das amostras são necessários para extrair um determinado gás de mistura complexa. Em amostras de ar expirado, por exemplo, o CO₂ deve ser separado do N₂ e O₂ por crioprecipitação, ou ainda, um substrato não gasoso deve ser convertido em CO₂, como a purificação de glicose, seguida de sua combustão em CO₂¹⁰.

2.1.2) GC-MS - Cromatografia Gasosa Acoplada ao Espectrômetro de Massa

É a técnica mais utilizada para identificação de metabólitos anormais em diagnósticos de desordens metabólicas, desde recém nascidos até indivíduos adultos. Esta técnica permite medir níveis de enriquecimento isotópicos maiores que 0,2 MPE,

habitualmente variando de 1 e 5 MPE, em pequenas quantidades do substrato (nano ou picomoles) orgânico presente em misturas complexas como o plasma. É necessário derivatizar a substância a ser analisada para que esta se torne volátil e estável à temperatura compatível com a utilização de cromatografia gasosa. Para os aminoácidos, por exemplo, a derivatização geralmente é feita pela adição, por exemplo, de um grupo propil nos grupos polares dos aminoácidos. Os produtos formados são, à seguir, injetados no cromatógrafo.^{8,11}

Esta técnica apresenta alta especificidade na identificação de metabólitos. Esta especificidade se dá justamente por esta perfeita combinação do poder de separação capilar do cromatógrafo a gás, seletividade do processo de derivatização química usado para volatilização, características discriminantes do módulo de ionização espectrométrica da massa dos fragmentos de íons escolhidos para análise e a capacidade do espectrômetro de massa separar íons com diferenças de massas muito pequenas¹¹.

2.1.3) GC-C-IRMS - Combustão

Nesta técnica, são acoplados, em série, cromatografia gasosa, forno de combustão e por fim espectrometria de massa. Desta maneira, amostras biológicas, separadas por meio de GC, são oxidadas a CO₂ a 800°C, em um forno de combustão, e a seguir, a relação ¹³CO₂/¹²CO₂ é analisada em IRMS. Esta técnica combina a capacidade do GC-MS de separar/extrair uma substância complexa, na ordem de nano a picomoles, alta precisão do IRMS para determinação do enriquecimento isotópico de ¹³C, na ordem de 0,1 a 0,7%^{8,11}.

2.1.4) Aplicações Clínicas do Isótopo Estável Utilizando Espectrometria de Massa

Nos últimos anos têm sido cada vez maior a aplicação de isótopos estáveis aos estudos metabólicos no homem, assim como sua utilização em estudos de biodisponibilidade de nutrientes, cinética de fármacos entre outras aplicações clínicas relevantes^{12,13,14}. Isto se deve à especificidade da técnica de espectrometria de massa e a segurança da utilização do isótopo estável que é inócuo ao homem.

Uma das aplicações clínicas mais importantes da espectrometria de massa, relaciona-se com análises orgânicas, como por exemplo, na determinação do peso molecular, a partir de quantidades diminutas do analito, sempre que for necessário elucidar

a estrutura química do composto alvo. Como previamente descrito, ao se combinar a cromatografia gasosa à espectrometria de massa, este método tornou-se importante na detecção de concentrações traços de compostos orgânicos no sangue, urina, gás expirado e outros fluidos biológicos. Este método pode fornecer informações, relacionando o diagnóstico de doenças e contribuindo com o seu entendimento fisiopatológico^{11,15}.

As aplicações clínicas incluem o diagnóstico de doenças que alteram o metabolismo de ácidos orgânicos, como por exemplo, os aminoácidos e simultaneamente, análises multicomportamentais se mostram úteis na identificação de vias metabólicas anormais (estudo do metabolismo protéico, de hidratos de carbonos e lipídeos). Assim são passíveis de serem estudados os ácidos orgânicos, como por exemplo, os ácidos metilmalônico (acidúria metilmalônica) e fenilcetonúria); ácidos graxos de cadeia curta; compostos orgânicos voláteis, como as cetonas e aldeídos, polióis, aminas, prostaglandinas, esteróides, ácidos biliares, constituintes dos ácidos nucléicos e aminoácidos^{16,17,18}.

O uso de isótopos estáveis para o estudo da cinética de substratos metabólicos, tais como, proteínas, carboidratos e gorduras, requerem uma meticulosa avaliação do caminho traçado pelo metabólito. Estes estudos geralmente envolvem a infusão na circulação sanguínea, de um elemento ligado a um isótopo estável e a medida subsequente do caminho traçado por este metabólito de interesse¹².

a) Estudo da Taxa de Metabolismo Basal

O estudo da Taxa de Metabolismo Basal é feito após 12 horas de jejum noturno, os voluntários são estudados em repouso no leito, deitados, com a temperatura ambiente de cerca de 20°C. Cada voluntário é orientado a respirar tranquilamente na campânula de um calorímetro indireto móvel (Sensormedics, Vmax 29 Series) de fluxo contínuo. As taxas de consumo de O₂ e de produção de CO₂ são obtidas e a taxa metabólica basal é calculada de acordo com a equação de Elia e Livesay (1992).

b) Estudo do Gasto Energético Total (GET)

Até o advento da criação do método da água duplamente marcada, o gasto energético total só podia ser realizado, na comunidade, através: de inquérito alimentar e sua comparação com a estabilidade do peso (método por demais inexato); do emprego de

um calorímetro portátil (pouco prático e impraticável para a população idosa); da restrição do voluntário a uma câmara de trocas gasosas fechada (situação excessivamente artificial) ou da reprodução, em laboratório, da atividade física na comunidade, com baixa representatividade. O método da água duplamente marcada representou uma revolução no estudo do metabolismo energético, pois permite que o voluntário permaneça na comunidade, desempenhando suas atividades habituais e, após a ingestão da água marcada com isótopos estáveis, ter o seu gasto energético total determinado com extrema precisão, pela simples coleta de amostras de urina. Trata-se, portanto, de método não-invasivo, seguro, que, por empregar isótopos estáveis, não submete os voluntários à exposição radioativa¹⁹.

Determinação do Nível de Atividade Física e Termogênese (NAT)

O gasto energético com atividade física e termogênese é calculado da seguinte forma (Fuller e colaboradores, 1996):

$$\text{NAT} = \text{GET} - \text{TMB}$$

2.1.5) Cromatografia Líquida – Espectrometria de Massa (LC-MS)

Cromatografia líquida é uma técnica de separação fundamental em ciências biológicas e áreas afins. Ao contrário de cromatografia gasosa, que não é apropriada para as moléculas não voláteis e termicamente frágeis, a cromatografia líquida pode separar com segurança uma gama muito ampla de compostos orgânicos, a partir de pequenas moléculas tais como metabolitos de drogas, peptídeos, proteínas etc. Para a maioria das aplicações de LC-MS, uma boa execução exige uma integração de automação em larga escala e / ou separação dos compostos em fase líquida²⁰.

2.1.5.1) Aplicações bioquímicas da LC-MS

a) Identificação rápida de proteínas usando LC capilar / MS / MS com procura em banco de dados. A combinação da LC / MS / MS, dados dependentes da probabilidade baseada na busca em banco de dados tornando possível identificar rapidamente cerca de 100 proteínas em uma única análise. Com a conclusão do Projeto Genoma Humano, o interesse científico está se voltando cada vez mais para a tarefa de converter informações da sequência de DNA em conhecimento que potencialmente melhoram a medicina humana e saúde. A surpreendente descoberta de que o genoma humano contém menos

genes do que o previsto salienta a importância das proteínas como os principais atores em sistemas biológicos. Análise de um proteoma, todo o conjunto de proteínas expressas por um organismo, célula ou organela, é altamente complexo e sob fluxo constante, em resposta a vários estímulos, ao longo do tempo. Proteômica tem de lidar com a separação de misturas de proteínas altamente complexas. Além disso, as proteínas pouco abundantes e de alta concentração diferem em abundância ao longo de mais de cinco ordens de magnitude, portanto, altamente abundantes proteínas podem mascarar os de baixa abundância. O futuro da LC-MS em Proteômica é promissor, pois sistemas biológicos geralmente não reagem a perturbações regulando apenas alguns componentes, mas através de mudanças em muitas vias de interação. Torna-se evidente que, por exemplo, doenças multifatoriais não podem ser diagnosticadas com base em biomarcadores individuais, mas que os padrões de marcadores são necessários para um prognóstico, assim como para seguir as intervenções terapêuticas. Sistemas analíticos da proteína, bem como abordagens LC-MS podem fornecer os meios tecnológicos para fazer isso no futuro^{20,21}.

Recentemente, vários esforços têm mostrado que a integração dos dados analíticos obtidos a partir de um sistema biológico, a vários níveis podem conduzir a uma melhor compreensão de como ele reage a uma dada perturbação. O próximo campo da análise de grande escala de metabolitos, “metabolômica” também depende fortemente de LC-MS, como um método analítico. Metabolômica agora está sendo integrado na análise de sistemas biológicos e fornece informações relevantes. Novos espectrômetros de massa e de softwares associados a LC-MS poderão facilitar a aquisição de espectros em uma análise automatizada. A conclusão de bases de dados de sequência com organismos adicionais cujos genomas são totalmente sequenciado irá fornecer o modelo para proteína de sucesso e identificação de peptídeos²⁰.

b) LC-MS na Análise de Carboidratos: A glicosilação, uma das modificações pós-traducionais das proteínas mais comuns encontrados em quase todos os sistemas biológicos, consiste na ligação covalente de sacarídeos de resíduos de aminoácidos específicos em peptídeos. Existem dois tipos principais de ligações nas glicoproteínas: A ligação N-glicosídica glicosídicas em glicoproteínas: a

N-glicosídica através do nitrogênio da amida de um resíduo de asparagina e a ligação O-glicosídica, através do grupo hidroxila da serina, treonina, tirosina, hidroxilisina ou hidroxiprolina. Os componentes de hidratos de carbono de glicoproteínas desempenham um papel crucial na modulação das suas propriedades físico-químicas²⁰.

Diferentes estratégias podem ser seguidas para a análise das cadeias de hidratos de carbono ligados a uma glicoproteína. Um deles consiste na liberação química ou enzimática de oligossacárideos e o seu subsequente fracionamento por cromatografia ou eletroforése seguido pela caracterização das frações separadas. A separação dos glicanos clivados a partir de uma glicoproteína produz uma impressão digital, também referido como o perfil de oligossacárido ou um mapa.

Na indústria farmacêutica e de biotecnologia, têm sido usadas técnicas de mapeamento de estruturas de carboidratos de glicoproteínas:

- durante a primeira caracterização, para comparação da glicosilação da proteína nativa e recombinante;
- para separar e identificar as estruturas que os oligossacárideos apresentam;
- para controlar a consistência da glicosilação e identificar alterações que possam ter resultado de alterações na cultura celular;
- para monitorizar alterações na glicosilação que ocorrem como resultado da expressão em linhas de células diferentes.

No futuro, a combinação de LC com MS provavelmente será a ferramenta analítica mais amplamente utilizada para a análise de oligossacáridos derivados de proteínas, apesar das restrições da MS, como a impossibilidade de distinguir entre monossacárideos com a mesma massa (glicose, manose, galactose, etc), ou o fato de que diferentes combinações de monossacárideos resultam na mesma massa. Para superar estas limitações, a combinação de MS com várias técnicas cromatográficas, bem como várias etapas de degradação enzimática poderá ser valiosa²⁰.

2.2) Tecnologia XF para estudo da função mitocondrial

É uma nova tecnologia capaz de medir atividade enzimática da cadeia de transporte eletrônica de mitocôndrias em células musculares ou do tecido adiposo devidamente preparado. Tem sido usada no estudo do envelhecimento muscular, na obesidade e durante exercício físico controlado. Requer biopsia

muscular ou de tecido adiposo e uso de células em cultura primária, nãocongeladas. O tecido pode ser reutilizado após análise da função mitocondrial para outras finalidades. Todos XF instrumentos integram a tecnologia “label-free”, eliminando artefatos rótulo em respostas celulares e interações medicamentosas. XF analisadores também incorporam um design descartável cartucho de ensaio, o que facilita melhores técnicas de cultura de tecidos, sem necessidade de especial de limpeza, e economizando tempo. O poder da tecnologia XF fornece cinética em tempo real que desbloqueia dados bioenergéticos celulares essenciais. Tecnologia XF e kits de teste de estresse XF, são fazer estudos bioenergéticos celulares simples, eficiente. A primeira medição metabólica in vitro, a tecnologia XF perfis de forma não invasiva a atividade metabólica das células em questão de minutos, oferecendo cientistas um ensaio baseado em células fisiológicas para a determinação do consumo de oxigênio basal, as taxas de glicólise, a produção de ATP, e a capacidade respiratória numa única experiência para avaliar a disfunção mitocondrial. Ao medir as duas principais vias de produção de energia da célula, em simultâneo, a respiração mitocondrial e glicólise, cientistas obter o ensaio bioenergética mais fisiologicamente relevante disponível, o que resulta em uma melhor visão geral do metabolismo. XF tecnologia também mede a oxidação de ácidos gordos e o metabolismo da glucose e de aminoácidos para a informação metabólica cinética. Sem rótulos, radioatividade, corantes, tripsina, ou permeabilização. As células aderentes, as células primárias, células da suspensão, e mitocôndrias isoladas pode ser facilmente analisado²².

2.2.1) Medida da respiração mitocondrial e a função glicolítica em células com kits de teste de estresse XF.

A Tecnologia XF permite medir a função mitocondrial e disfunção, em células vivas com menos configurar e limpar do que os métodos de eletrodo de Clark²³.

a) Aplicações no Envelhecimento

Disfunção mitocondrial é de preocupação central no processo de envelhecimento. O aumento da idade correlaciona-se com um acúmulo de danos oxidativos do DNA mitocondrial (mtDNA) mutações e um declínio na fosforilação oxidativa. O Analisador XF gera dados que podem fornecer uma nova compreensão em relação ao envelhecimento

e à disfunção mitocondrial, permitindo a medição do metabolismo celular, em tempo real, de uma microplaca. Através da medição da taxa de consumo de oxigênio (OCR), - uma medida da respiração mitocondrial, bem como a taxa de acidificação extracelular (ECAR) - uma medida da glicólise, que será fornecido com o mais fisiologicamente relevante para a medição *in vitro* para os seus estudos bioenergética²⁴.

b) Aplicações em obesidade, diabetes e distúrbios metabólicos

A disfunção mitocondrial é central para a fisiopatologia da obesidade, diabetes, e doenças metabólicas, e está associada com a resistência à insulina. O Analisador XF gera dados que podem fornecer uma nova compreensão em relação à obesidade, a diabetes, e doenças metabólicas, e disfunção mitocondrial, permitindo a medição do metabolismo celular, em tempo real, numa microplaca. Através da medição da taxa de consumo de oxigênio (OCR), - uma medida da respiração mitocondrial, bem como a taxa de acidificação extracelular (ECAR) - uma medida da glicólise, que será fornecido com o mais fisiologicamente relevante para a medição *in vitro* para os seus estudos bioenergéticos²⁵.

3) Nutrigenômica:

O conceito das novas ciências nutricionais, nutrigenética e nutrigenômica, e das tecnologias “ômicas” incorpora o uso de ferramentas para análise de parâmetros moleculares, estudo das interações gene-dieta englobando a influência dos genótipos na resposta aos diferentes tratamentos dietéticos e a ação dos nutrientes sobre a modulação da expressão gênica e proteica^{26,27}. As alterações encontradas por meio de estudos genéticos são a chave para distinguir os indivíduos que respondem ou não determinado tratamento, visto que estudos recentes realizados em nosso grupo foi observado que pacientes submetidos à cirurgia bariátrica, após 12 meses apresentaram deficiências nutricionais, mesmo com suplementação, ou seja responderam de forma diferente à esta técnica, muitas vezes aplicada para tratamento da obesidade e comorbidades^{28,29}. Essa nova abordagem pode envolver milhares de polimorfismos genéticos, medidas de proteínas, sequência genética, dados metabólicos e a combinação de todos estes dados e de suas interações^{30,31}. A utilização de “arrays” de

DNA baseada em ensaios com anticorpos “multiplex” contra inúmeros componentes de proteínas e suas isoformas nas vias metabólicas tornou-se uma importante ferramenta nas pesquisas relacionadas à obesidade e suas complicações, bem como para o entendimento da nutrição molecular³².

Com o Projeto do Genoma Humano, muitos estudos têm sido realizados objetivando encontrar as interações entre genes e ambiente e permitiu identificar os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs)³³.

Polimorfismo de nucleotídeo único ou polimorfismo de nucleotídeo simples (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) é uma variação na sequência de DNA que afeta somente uma base (adenina (A), timina (T), citosina (C) ou guanina (G) na sequência do genoma. No entanto, alguns autores consideram a troca de poucos nucleotídeos, assim como pequenas inserções ou deleções (indel) como SNPs. Nestes casos, o termo polimorfismo de nucleotídeo simples é mais adequado³⁴. Estas variações devem ocorrer em no mínimo 1% de uma determinada população para ser considerada como um SNP. Se, por outro lado, a frequência de uma variação for inferior a 1%, a mesma será considerada simplesmente uma mutação. Os SNPs constituem 90% de todas as variações genômicas humanas e aparecem, em média, uma vez a cada 1.300 bases, ao longo do genoma humano. Dois terços dos SNP correspondem a substituições de uma citosina (C) por uma timina (T). Além de poder acarretar mudanças morfológicas, essas variações na sequência do DNA podem influenciar a resposta dos organismos a doenças, bactérias, vírus, produtos químicos, fármacos, etc³³.

SNPs estão dispersos por todo o genoma, podendo ocorrer tanto em regiões codificadoras como em não codificadoras. O SNP em regiões codificadoras: são denominados sinônimos e não sinônimos (SNPs)³⁴.

Dependendo dos SNPs herdados, os indivíduos podem se tornar mais susceptíveis a determinadas doenças ou mesmo apresentar diferentes respostas ao tratamento³⁰. Neste caso, o desenvolvimento de tecnologias de genotipagem em larga escala, faz com que essas variações genéticas sejam conhecidas, podendo se tornar possíveis marcadores moleculares utilizados na prevenção, diagnóstico e tratamento de doenças³³.

Estudos em modelos animais e humanos evidenciaram a contribuição substancial da genética no

desenvolvimento da obesidade³⁵. Estima-se que a influência genética na massa corporal esteja entre 30 a 70%^{36,37}, sendo que, a adiposidade pode ser explicada por fatores genéticos em 75 a 80%^{35,38}. O número de estudos associando as variações na sequência de bases de genes específicos e o fenótipo da obesidade tem aumentado continuamente. A publicação do Human Obesity Maps (2005)³⁹ mostrou 127 possíveis genes associados à obesidade que podem atuar na massa corporal, gordura corporal e/ou distribuição desta.

Acredita-se que a atual epidemia de obesidade é o resultado de uma combinação complexa de fatores genéticos e um ambiente obesogênico. Nesse caso, a alimentação é um dos principais fatores responsáveis pela alteração na expressão dos genes, sendo a dieta fator de grande relevância na manutenção do equilíbrio genômico, influenciando o controle das atividades de síntese e reparo do DNA e apoptose³². Deste modo, as alterações nutricionais podem ocorrer, por mecanismos indiretos ou epigenéticos, lesões no DNA, uma vez que o estado nutricional afeta diretamente o estado de metilação do DNA³². Quando a ingestão crônica de nutrientes se torna menor que a recomendação, mecanismos reguladores podem reservar pequenas quantidades do nutriente para atender as funções básicas e assim, reduzir as quantidades disponíveis para manutenção dos eventos que promovem o funcionamento correto do DNA⁴⁰.

4) Histomorfometria - Microscopia Biológica e Industrial

A histologia e a citologia de amostras de tecido obtido durante os Testes Dinâmicos abaixo descritos complementam estudos de Composição Corporal por imagem e a avaliação da cinética dos nutrientes e moléculas derivadas no organismo humano. These microscopes are used for biological research at laboratories and universities, inspections at hospitals, and for science education⁴¹.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Cersósimo, Eugênio ; DUTRA-DE-OLIVEIRA, José Eduardo . Nutrology and type 2 diabetes: Nutrient Pathophysiology and the transition from health to disease. *International Journal of Nutrology*, v. 5, p. 6-13, 2012.
2. Albu JB, Heilbronn LK, DE, Smith SR, K,3 et al. Metabolic Changes Following a 1-Year Diet and Exercise Intervention in Patients With Type 2 Diabetes 59(3): 627–633, 2010
3. Tipton KD, Elliott TA, Cree MG, Aarsland AA, Sanford AP, Wolfe RR. Stimulation of net muscle protein synthesis by whey protein ingestion before and after exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007; 292(1):E71-6
4. MARCHINI J.S., BASILE FILHO A., VANNUCCHI H., et alli. Utilização de espectrometria de massa para o estudo do metabolismo protéico e aminoacídico, em *Medicina. Medicina, Ribeirão Preto*, 30:494-507, 1997.
5. JUNQUEIRA-FRANCO MVM, FERRIOLI E., PADOVAN G.J., VANNUCCHI H, MARCHINI J.S. “Espectrometria de Massa: Aplicações Clínicas de Isótopos Estáveis em Nutrição”. *Cadernos de Nutrição*, v. 18, 1999.
6. JUNQUEIRA-FRANCO MVM, TANNUS AFS, SUEN VMM, MARCHINI JS. “Métodos de espectrometria de massa em Nutrição Humana”. *Revista Médica de Minas Gerais*, 14(2), 87-93, 2004.
7. JONES P.J., WINTHROP A.L. & SCHOELLER D.A. Validation of doubly labeled water for assessing energy expenditure in infants. *Pediatr. Res.*, 21:242-245, 1987.
8. Peng J, Elias JE, Thoreen CC, Licklider LJ, and Gygi SP. Evaluation of Multidimensional Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometry (LC/LC-MS/MS) for Large-Scale Protein Analysis: The Yeast Proteome. *Journal of Proteome Research*, 2 (1), pp 43–50, 2003.
9. JENSEN MD, KANALEY JA, REED JE, SHEEDY PF. Measurement of abdominal and visceral fat with computed tomography and dual energy x-ray absorptiometry. *Am J Clin Nutr.* 1995;61:274-78
10. Ross R, Goodpaster B, Kelley D, et al. Magnetic resonance imaging in human body composition research. From quantitative to qualitative tissue measurement. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 904: 12-7.
11. Ross R, Rissanen J, Pedwell H, et al. Influence of diet and exercise on skeletal muscle and visceral adipose tissue in men. *J Appl Physiol* 1996; 81: 2445-55.
12. Mitsiopoulos N, Baumgartner RN, Heymsfield SB, et al. Cadaver validation of skeletal muscle measurement by magnetic resonance imaging and computerized tomography. *J Appl Physiol* 1998; 85: 115-22. Snyder WS et al. Report on the Task Group on Referência Man, OXFORD, Pergamon, 1975.
13. Schenk et al. *Am J Physiol Endo Metabol* 2005; 288:E519-E525
14. Schenk & Horowitz. *J Clin Invest* 2007; 117(6):1690-97
15. Goodpasture BH, Thaete FL, Simoneau JA. Subcutaneous abdominal fat and thigh muscle composition predict insulin sensitivity independently of visceral fat. *Diabetes.* 1997;46:1579–85.

16. Frederico T et al. *J Clin Endo Metabol* 2006; 91:3224-27
17. Hesketh J, Wybranska I, Dommels Y, King M, Elliott R, Pico C, Keijer J. Nutrient-diet interactions in benefit-risk analysis. *Br J Nutr* n.95, p. 1232-1236, 2006
18. Fenech M. Genome health nutrigenomics and nutrigenetics – diagnosis and nutritional treatment of genome damage on an individual basis. *Food and Chem Toxicol* 46: 1365-1370, 2008.
19. Donadelli, SP, Junqueira-Franco, MVM, de Mattos Donadelli, CA, Salgado, W, Ceneviva, R, Marchini, JS, Dos Santos, JE, Nonino, CB. Daily vitamin supplementation and hypovitaminosis after obesity surgery. *Nutrition* v.28, p.391 - 396, 2012.
20. Nicoletti, C. F., Junqueira-Franco MVM., Salgado, W, MARCHINI, J. S., SANTOS, J. E., NONINO, C. B. Protein and amino acid status of obese patients before and after bariatric surgery: a 12 months study follow-up. *Surgery for Obesity and Related Diseases*, 8(6), 1008-1012, 2013
21. Salgado W Jr, Modotti C, Nonino CB, Ceneviva R Anemia and iron deficiency before and after bariatric surgery. *Surg Obes Relat Dis.* 15.: S1550-7289(13), 2013
22. Greer R; Lehnert M; Lewindon P; Cleghorn G J; Shepherd R W. Body Composition and Components of Energy Expenditure in Children With End- Stage Liver Disease
23. Kaput J. Genomics research for personalized nutrition and medicine. *Food Biotech*, v19, p110-120, 2008
24. Afman L, Muller M. Nutrigenomics: from molecular nutrition to prevention to disease. *J AM Diet Assoc*, v4, n106, p569-576, 2006.
25. Frazer KA, Sarah S. Murra SS., Schork NJ and Topol EJ Human genetic variation and its contribution to complex traits. *Nature Reviews*; v. 10, p 241, 200
26. Mimila LP., Hugo Villamil-Rami 'H., Villalobos-Compara 'M et al Contribution of Common Genetic Variants to Obesity and Obesity-Related Traits in Mexican Children and Adults. *PLOS ONE*, v.08, n.8, e70640, 2013.
27. Subbiah R. Understanding the nutrigenomic definitions and concepts at the food-genome junction. *J Intert Biol*, v12, n4, p1-7, 2008
28. Koletzko b., sauerwald t.; demmelmair. Safety of stable isotope use. *Eur. J. Pediatr*, 156 (suppl. 1):S12-S17, 1997.
29. Neena Srivastava, B. R. Achyut,1 Jai Prakash, C. G. Agarwal,2 D. C. Pant,2 and Balraj Mittal1. Association of β 2-adrenergic receptor and insulin receptor substrate-1 polymorphisms with obesity in a Northern Indian population. *Indian J Hum Genet.* 2008 May-Aug; 14(2): 48–54.
30. Lieber D.C., Burr J.A., Philips L. et al. Gas chromatography-mass spectrometry analysis of vitamin E and its oxidation products. *Anal. Biochem.*, 236:27-34, 1996.
31. Maccann M.T., THOMPSON M.M., GUERON J.C. et all. Methylmalonic acid quantification by stable isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry from filter paper urine samples. *Clin. Chem.*, 42 (6):910-914, 1996.
32. Dizdaroglu M. Gas Chromatography-mass spectrometry of free radical-induced products of pyrimidines and purines in DNA. *Meth. Enzymol.*, 193: 842-857, 1990.
33. Dueker S.R., Lunetta J.M., Jones A.D. et al. Solid-phase extraction protocol for isolating retinol-d4 and retinol from plasma for parallel processing for epidemiological studies. *Clin. Chem.*, 39 (11): 2318-2322, 1993.
34. Dueker S.R., Jones A.D., Smith G.M. et al. Stable isotope methods in humans utilizing tandem mass spectrometry and high performance liquid chromatography. *Anal. Chem.*, 66: 4177-4185, 1994.
35. Ghoss Y.F., Maes B.D., Geypens B.J. et al. Measurement of gastric emptying rate of solids by means of a carbon labelled octanoic acid breath test. *Gastroenterology*, 104:164-167, 1993.
36. Ghoss Y. & Beaufrère B. ^{13}C protein breath tests. *Gut*, 43 (supl. 3):S23-S24, 1998.
37. Goupal N.K., Ånggard E.E., Mallet A.I. et al. Plasma 8-epi-PGF2 - levels are elevated in individuals with non-insulin dependent diabetes mellitus. *FEBS Letters*, 368:225-229, 1995.
38. Handelman G.J., Haskell M.J., Jones A.D. et al. An improved protocol for determining ratios of retinol-d4 to retinol isolated from human plasma. *Anal. Chem.*, 65:2024-2028, 1993.
39. Hasten D.L., Morris G.S., Ramanadham S. et al. Isolation of human skeletal muscle myosin heavy chain and actin for measurement of fractional synthesis rates. *Am. J. Physiol.*, 275 (Endocrinol. Metab. 38):E1092-E1099, 1998.
40. Jackson M.J. The assessment of bioavailability of micronutrients: Introduction. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 51 (suppl. 1):S1-S2, 1997.
41. Westertep K.A., Wouters L. & Van Marken Lichtenbelt W.D. The Maastricht protocol for measurement of body composition and energy expenditure with labeled water. *Obes. Res.*, 3 (suppl 1): 49-57, 1995.

Recebido em 13/07/2015

Revisado em 20/07/2015

Aceito em 01/08/2015

Autor correspondente:

José Eduardo Dutra de Oliveira

Rua Lafaiete 1222, Ap 71 Centro - CEP 14015 080

Ribeirão Preto – SP

Email: jeddoliv@fmrp.usp.br