

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LETÍCIA MEIER PEREIRA

**APLICAÇÕES E PERSPECTIVAS DA ESPECTROMETRIA DE MASSAS NA
ROTINA DE LABORATÓRIOS CLÍNICOS**

CURITIBA

2018

LETÍCIA MEIER PEREIRA

**APLICAÇÕES E PERSPECTIVAS DA ESPECTROMETRIA DE MASSAS NA
ROTINA DE LABORATÓRIOS CLÍNICOS**

Artigo apresentado como requisito parcial à conclusão do Curso de Especialização em Análises Clínicas do Setor de Ciências da Saúde do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profª Drª. Dayane Alberton

Coorientadora: Drª. Letícia Bonancio Cerqueira

CURITIBA

2018

Aplicações e perspectivas da espectrometria de massas na rotina de laboratórios clínicos

Letícia Meier Pereira

RESUMO

As técnicas analíticas atuais empregadas pelos laboratórios de Análises Clínicas apresentam resultados com baixa sensibilidade e seletividade para determinados analitos. Apesar das constantes melhorias dos imunoenaios, eles apresentam uma baixa seletividade devido à interferência das reações cruzadas. Em outros casos, os ensaios clínicos apresentam uma baixa sensibilidade pelo fato do analito estar presente em concentrações muito baixas para ser detectado. Estes obstáculos dos ensaios clínicos têm sido superados com a utilização da espectrometria de massas (MS), porém sua aplicação na rotina de laboratórios clínicos permanece limitada. A identificação e quantificação de analitos com sensibilidade e seletividade de forma rápida, abrangente e com capacidade de analisar múltiplos analitos simultaneamente são características da MS. Desta forma, a MS tem demonstrado ser uma ferramenta alternativa as técnicas analíticas atuais. A triagem neonatal para os erros inatos do metabolismo foi a primeira aplicação da MS na rotina de laboratório clínico. Com os avanços tecnológicos da MS concomitante com técnicas de separação cromatográfica, como, por exemplo, a cromatografia líquida (LC), as áreas de aplicações da MS em laboratórios clínicos apresentam um crescente uso. Por isso, nesta revisão abordaremos as principais aplicações e perspectivas da MS na rotina de laboratórios clínicos. Além disto, discutiremos que apesar das vantagens significativas que podem ser obtidas da incorporação da MS no laboratório clínico, ainda existem desafios consideráveis.

Palavras-chaves: Espectrometria de Massas, Cromatografia Líquida, Laboratórios Clínicos, Aplicações de rotina clínica

ABSTRACT

The current analytical techniques employed by the clinical analysis laboratories present results with low sensitivity and selectivity for certain analytes. Despite the constant improvement of immunoassays, they present a low selectivity due to the interference of cross-reactions. In other cases, clinical trials have a low sensitivity since the analyte is present in very low concentrations to be detected. These obstacles in clinical trials have been overcome with the use of mass spectrometry (MS), but their application in the routine of clinical laboratories remains limited. The identification and quantification of analytes with sensitivity and selectivity, quick way and with the ability to analyze multiple analytes simultaneously are characteristics of MS. Thus, MS has been shown to be an alternative tool current analytical technique. Neonatal screening for the innate errors of metabolism was the first application of MS in the clinical laboratory routine. With the technological advances of MS concomitantly with chromatographic separation techniques, such as liquid chromatography (LC), the areas of MS applications in clinical laboratories have a growing use. Therefore, in this review, we will address the main applications and perspectives of MS in the routine of clinical laboratories. In addition, we will discuss that despite the significant advantages that can be obtained from the incorporation of MS into the clinical laboratory, there are still considerable challenges.

Keywords: Mass Spectrometry, Liquid Chromatography, Clinical laboratories, routine clinical applications,

1 INTRODUÇÃO

O laboratório clínico desempenha um papel essencial na decisão diagnóstica e terapêutica. Os exames laboratoriais contribuem na verificação das condições de saúde dos pacientes, auxiliam nas intervenções terapêuticas e são úteis para o monitoramento e eficácia de terapias medicamentosas. As técnicas analíticas atuais empregadas pelos laboratórios de Análises Clínicas baseiam-se nos princípios fotométricos, turbidimétricos, eletroquímicos, imunológicos, cromatográficos e eletroforéticos. No entanto, muitos analitos de interesse clínico não são quantificados por essas técnicas devido à baixa especificidade e sensibilidade analítica na detecção de moléculas de baixo peso molecular e as interferências de reações cruzadas verificadas nos imunoenaios (IA do inglês, *immunoassay*) (VOGESER; SEGER, 2012).

A espectrometria de massas (MS do inglês, *Mass Spectrometry*) foi primeiramente introduzida nas áreas de triagem neonatal, triagem de drogas e diagnóstico de distúrbios metabólicos orgânicos (MAURER, 1992, 1999; MILLINGTON et al., 1990; RASHED et al., 1997). A espectrometria de massas sequencial (TMS do inglês, *Tandem Mass Spectrometry*) tornou-se o método padrão para a triagem neonatal de doenças metabólicas (CEGLAREK et al., 2002). Enquanto que o acoplamento da cromatografia a gás à espectrometria de massa (GC-MS do inglês, *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*) tornou-se essencial na análise toxicológica sistemática de várias categorias de medicamentos relevantes para toxicologia clínica, toxicologia forense e controle de *doping* (BERTHOLF, 2000).

A detecção de compostos mais polares e de baixo peso molecular, os quais a GC-MS não era capaz de detectar, foi possível através dos avanços tecnológicos na área da cromatografia líquida e da MS. Os avanços da cromatografia líquida concomitante com o desenvolvimento de fontes de ionização e de analisadores de massas promoveram o acoplamento destas duas técnicas analíticas, a LC-MS (LC-MS, do inglês *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*). A união de ambas proporcionou uma alta especificidade, sensibilidade e potencial multi-analítico na detecção de compostos. Deste modo, a LC-MS tornou-se uma metodologia poderosa na rotina em laboratórios clínicos e uma alternativa para testes de imunoenaios e para a cromatografia líquida de alta performance convencional (HPLC do inglês, *High performance Liquid Chromatography*) (LEUNG; FONG, 2014).

Uma análise comparativa da determinação de vitamina D em soro e plasma humano, mostrou que por LC-MS o limite de quantificação foi de 4 nmol/L, enquanto que por IA, a sensibilidade funcional foi 13 nmol/L. (MAUNSELL; WRIGHT; RAINBOW, 2005). Em outro estudo de quantificação de cortisol na urina por GC-MS, LC-MS/MS e por dois kits de IA, os valores de cortisol foram superestimados nos IA, enquanto que a sensibilidade por LC-MS foi de 2 nmol/L e as variações intra e inter-ensaio foram menores que 5% em cada amostra de controle de qualidade. Portanto, a alta sensibilidade, especificidade, linearidade, precisão e exatidão da determinação de cortisol urinário por LC-MS, mostra que esse método pode ser utilizado na rotina laboratorial. (WOOD et al., 2008).

Ao longo dos anos, a LC-MS foi consolidada como tecnologia chave em pesquisa biomédicas, especificamente, na busca por novos biomarcadores. No entanto, o emprego da LC-MS no laboratório clínico ainda permanece limitado e restrito a poucos laboratórios especializados. (GREBE; SINGH, 2011), pois ainda há o preconceito que a tecnologia é onerosa e complexa, requerendo analista especializado. Contudo, os ensaios clínicos baseados na LC-MS podem oferecer análises rápidas, abrangentes e de múltiplos componentes, com sensibilidade, seletividade e precisão. (HIMMELSBACH, 2012).

Ampliar e divulgar o uso da MS na rotina de laboratório clínico é importante para reforçarmos a importância da implementação desta versátil e poderosa técnica analítica que, majoritariamente, é utilizada em associação com a LC. Desta forma, o objetivo da revisão é apresentar as características da MS, suas aplicações e perspectivas na detecção de analíticos com importância clínica.

2 ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A MS é uma técnica analítica utilizada para identificar compostos desconhecidos, estudar as estruturas moleculares e quantificar moléculas específicas com sensibilidade até níveis sub-nanomolares (WATSON; SPARKMAN, 2005). Um dos requisitos para as análises de MS é a formação de íons em fase gasosa das moléculas presentes na amostra para que possam ser separados de acordo com a sua razão massa/carga (m/z do inglês, *mass-to-charge ratio*) e detectados (PAVIA. et al., 2015). Além disto, é necessário analisar os íons no vácuo para minimizar qualquer interferente em forma de matéria. (NIER.; YERGEY.; GALE., 2015).

É importante destacar terminologias utilizadas na MS. Íon é uma espécie atômica, molecular ou radicalar com carga elétrica líquida não nula. Uma molécula desprotonada é um íon formado pela remoção (abstração) de um próton (íon H^+) a partir de uma molécula M , sendo representada por $[M - H]^-$. Um íon formado pela interação de uma molécula com um próton é representado por $[M + H]^+$, chamada de molécula protonada. Quando a molécula interage com múltiplos prótons, representamos por $[M + nH]^{n+}$, onde n é o número de prótons (MURRAY et al., 2013; VESSECCHI et al., 2011).

O espectro de massa é um gráfico construído através da abundância relativa de íons em função de seus valores de m/z . O espectrômetro de massa faz a medida da m/z e não da massa da molécula. Uma biomolécula é ionizada, por exemplo, pela adição de um ou mais prótons. O instrumento irá medir a m/z após a adição de 1 Da (Dalton) para cada próton adicionado. Sendo assim, a molécula com massa de 1500 Da que for ionizada pela adição de um próton, aparecerá no espectro de massa com m/z de 1501 ($[1500+1]/1$). Caso a molécula for ionizada pela adição de dois prótons, a m/z será de 751 ($[1500+2]/2$). As moléculas podem ser ionizadas perdendo um próton, adquirindo carga negativa. Neste caso, a molécula com massa de 1500 Da aparecerá no espectro de massas com m/z de 1499 ($[1500-1]/1$) (WILSON; WALKER, 2013).

Em geral, todos os espectrômetros de massas compreendem 4 componentes principais: o inlet (injetor de amostra, termo do inglês), a fonte de ionização, analisador de massas e o detector (Fig 1). A Figura 1 mostra alguns métodos de ionização comumente usados e técnicas de separação de massa para laboratórios clínicos (LEUNG; FONG, 2014).

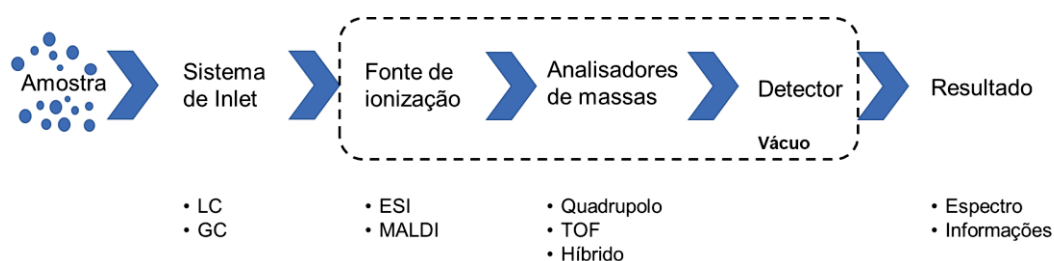


Figura 1: Representação dos componentes principais dos MS com alguns métodos de ionização e separação de massas para laboratórios clínicos. LC (Cromatografia Líquida); GC (Cromatografia a Gás); ESI (Fonte de Ionização Eletrospray), MALDI (Fonte de Ionização/Dessorção a laser assistida por matriz); TOF (Analisador de massa do tipo tempo-de-vôo); Híbridos que são constituídos por pelos menos dois analisadores de massa diferentes. (O AUTOR, 2018).

O desenvolvimento e a construção de cada componente dos espectrômetros de massas levaram anos. Thomson, Aston e Dempster são considerados os fundadores do campo da MS. J.J Thomson ganhou o prêmio Nobel de física em 1906 pela descoberta do elétron. F.W Aston foi ganhador do Nobel de química em 1922 pelo desenvolvimento do espectrógrafo de massa usando campos elétricos e magnéticos para realizar a focagem de velocidade de um feixe de íons e a medição dos isótopos dos elementos. J. Dempster desenvolveu independentemente um instrumento de setor magnético que empregava a focagem de direção pela constante de energia dos íons. Todos estes conhecimentos ganharam notoriedade durante a Segunda Guerra Mundial, na qual a MS desempenhou um papel fundamental na preparação de plutônio para uso militar. No entanto, somente após a Segunda Guerra Mundial, a MS passou a ter um grande número de aplicações na química orgânica. (DE LAETER, 2016; NIER.; YERGEY.; GALE., 2015; WATSON; SPARKMAN, 2005).

Em 1938, A. O. Nier usou pela primeira vez a MS para análise de uma mistura complexa. Este fato levou a produção comercial dos espectrômetros de massas nos Estados Unidos da América. (NIER, 1990). Na década de 1950, a GC-MS foi desenvolvida e introduzida no campo do diagnóstico clínico para a análise de compostos voláteis e termicamente estáveis. No caso de compostos não voláteis, é necessário realizar a reação de derivatização. Essa reação consiste na substituição dos hidrogênios ativos na molécula por agrupamentos apolares com o objetivo de reduzir a polaridade e aumentar a volatilidade tornando os compostos viáveis ao uso na GC-MS. (BLAU; KING, 1993). Porém, a utilização de amostras biológicas ainda permaneceu limitada devido às características químicas da maioria dos analitos, bem como pela falta de técnicas de ionização das amostras que eram adequadas somente para compostos de peso molecular baixo e também pela falta de bons métodos para introdução da amostra no alto vácuo dos espectrômetros de massas. (VAN DEN OUWELAND; KEMA, 2012).

Essa situação mudou drasticamente quando John Fenn, nos anos 80, desenvolveu a fonte de ionização *electrospray* (ESI do inglês, *electrospray ionization*), ganhando o Prêmio Nobel 2002. A ESI permitiu analisar biomoléculas com maior peso molecular, devido a sua ionização ser mais branda quando comparada a ionização por impacto eletrônico usada na GC-MS, permitindo assim a visualização do íon molecular. (FENN et al., 1989). Em sequência, na década de 1990, K. Tanaka desenvolveu a fonte de ionização por Ionização/Dessorção a laser assistida por matriz

(MALDI do inglês, *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*) .(KAUFMANN, 1995). Essas técnicas permitiram que compostos polares ou termicamente instáveis de alto peso molecular fossem ionizados em fase líquida e transferidos para a fase gasosa, permitindo a interface bem-sucedida da LC para espectrômetros de massas. Concomitantemente, houve grande avanço tecnológico nos analisadores de massas com o desenvolvimento dos quadrupolos e dos tempo-de-vôo (TOF do inglês, *time-of-flight*) .(ZHANG et al., 2016).

Em termos de instrumentação, a sensibilidade e especificidade da LC-MS quase dobra a cada ano. Além de ser uma técnica flexível por realizar múltiplas análises simultaneamente, possui rendimento superior em comparação a outras técnicas. Apesar do custo inicial do equipamento ser expressivo, o custo dos reagentes usados para operar o instrumento, bem como o custo da preparação da amostra é geralmente menor em relação aos reagentes dos IA. Por estas razões, tem-se tornado uma técnica amplamente aceita no campo dos laboratórios clínicos .(WU; FRENCH, 2013).

As matrizes biológicas mais comuns nos testes de diagnósticos clínicos são soro/plasma e urina, podendo também ser utilizadas saliva e tecidos. A preparação da amostra, também conhecida como tratamento de amostras/limpeza de amostras/extração de amostras, é uma parte integrante da análise do método bioanalítico (análise quantitativa ou qualitativa de fármacos, metabólitos e biomarcadores em matrizes biológicas) .(LEUNG; FONG, 2014). O tipo de matriz da amostra afeta a escolha da técnica de preparação da amostra. A extração líquido-líquido, precipitação de proteína, extração em fase sólida e diluição são as técnicas de preparo de amostra que têm sido mais utilizadas .(KOLE et al., 2011).

Métodos baseados na LC-MS exigem uma validação completa, semelhantes aos de outros métodos de diagnóstico. A validação deve incluir a documentação de linearidade, precisão, exatidão, sensibilidade, especificidade, intervalos de referência, substâncias interferentes, *carryover* e estabilidade .(VAN DEN OUWELAND; KEMA, 2012). Além disto, são necessárias a determinação dos efeitos da matriz (supressão de íons) e a recuperação do preparo da amostra para metodologias desenvolvidas utilizando LC-MS .(TRUFELLI et al., 2011). A FDA (Food and Drug Administration's) publicou um guia para Indústria de Validação de Métodos Bioanalíticos, no qual indica a necessidade da avaliação do efeito matriz durante o desenvolvimento e validação de métodos LC-MS para *“garantir que a precisão, seletividade e sensibilidade não*

sejam comprometidas” .(U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 2013). No Brasil, a RDC nº 27 de 17 de Maio de 2012 dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos .(ANVISA, RDC nº27/2012).

A importância da MS nos laboratórios clínicos está aumentando, principalmente com o uso da LC-MS. Por isso, o Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (CLSI do inglês, *Clinical and Laboratory Standards Institute*) nos EUA, publicou em outubro de 2014, um guia chamado C62-A sobre o desenvolvimento e validação de métodos para testes desenvolvidos em laboratório. O documento tem por objetivo estabelecer orientações para avaliar interferências, desempenho do ensaio desenvolvido e outras características pertinentes para reduzir a variação interlaboratorial dos ensaios clínicos .(CLARKE et al., 2014).

3 APLICAÇÕES DOS ENSAIOS CLÍNICOS BASEADOS NA ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A busca por metodologias mais sensíveis e específicas é um retrato do panorama atual observada pelo número continuamente crescente de protocolos publicados para analitos de relevância clínica. O emprego da MS, principalmente em associação com a LC, tem sido a técnica analítica de escolha no desenvolvimento de métodos bioanalíticos. A LC-MS proporciona rapidez, sensibilidade, especificidade, resultados robustos e rápidos e, por isso, tem sido utilizada na aplicação de ensaios clínicos.

Por desempenhar um papel essencial na homeostase do cálcio e sua deficiência está associada ao aumento do risco de doenças cardiovasculares, diabetes, doenças infecciosas, raquitismo em crianças e osteoporose em adultos .(HOLICK; CHEN, 2008), a Vitamina D (25(OH)D) apresenta variações na quantificação entre os métodos de imunoenaios e, por isso, tem sido alvo no desenvolvimento de método analítico por LC-MS .(ANNEMA et al., 2018). Um estudo realizou a comparação nos níveis séricos de Vitamina D entre radioimunoensaio e LC-MS em pacientes mulheres lactantes e pós-parto, e demonstram que o radioimunoensaio apresentou resultados falsamente alto quando comparado com a LC-MS .(HARA et al., 2018).

A avaliação clínica dos distúrbios adrenais é realizada através dos ensaios de esteroides séricos e são rotineiramente medidos com imunoenaios. Porém, não é

possível realizar a quantificação simultânea de todos os esteroides o que demanda bastante tempo de análise. Neste sentido, foi desenvolvido um método para realizar a quantificação simultânea de 15 esteroides adrenais, sendo eles: cortisol, cortisona, 11-desoxicortisol, 17-hidroxiprogesterona, 21-desoxicortisol, progesterona, 11-desoxicorticosterona, corticosterona, 11-desidrocorticosterona, 18-hidroxicorticosterona, 18-hidroxi-11-desoxicorticosterona, aldosterona, sulfato de dehidroepiandrosterona, testosterona e androstenediona. Demonstrou-se que o método por LC-MS/MS foi sensível, específico e ágil na quantificação dos 15 esteroides simultaneamente quando comparado com os imunoenaios. No caso dos esteroides aldosterona, 17-hidroxiprogesterona, androstenediona e 11-desoxicortisol os imunoenaios revelaram um grande viés negativo. Além disso, a quantificação em pacientes com hiperplasia adrenal congênita com deficiência de 21-hidroxilase foi mais sensível e específica mesmo tendo um pequeno volume de amostra. (TRAVERS et al., 2017)

Existem várias aplicações da MS em ensaios clínicos com potencial uso na rotina de laboratórios clínicos. A Tabela 1 traz alguns exemplos de aplicações.

Aplicações da LC-MS em aplicações clínicas

Analito	Matriz Biológica	Preparação da amostra	Referência
Acetyl coenzyme A	Sangue	PPT	SPEZIALE et al., 2018
l-Arginina, Derivados de Arginina, Dimetilada, L-Citrulina e Dimetilamina	Soro	ELL	FLESZAR et al., 2018
25-hidroxivitamina D (25 (OH) D)	Soro	PPT	DIRKS et al., 2016
Aminoácidos	Soro	EL	SONG et al., 2015
Testosterona	Soro	PPT	NEALE et al., 2013
Cortisol e dexametasona	Plasma	EFS	HEMPEN et al., 2012
Cortisol e Cortisona	Saliva	EFS	JONES et al., 2012
Alipoproteína A-I e Alipoproteína B	Plasma e soro	PPT	AGGER, 2010
Estrona e Estradiol	Soro e plasma	ELL	KUSHNIR et al., 2008

Analito	Matriz Biológica	Preparo da amostra	Referência
Epinefrina e Noraepinefrina	Plasma	PPT	JI et al., 2010
Tiroxina livre (T4)	Soro	EL	SOLDIN et al., 2005
Plitidepsina	Plasma, sangue total e urina	ELL	VAN ANDEL et al., 2017
Sulfato de colesterol, androgênio e progestágeno	Soro	PPT	SÁNCHEZ-GUIJO et al., 2015
Busulfan	Plasma	PPT	FRENCH et al., 2014
Tacrolimus, sirolimus, everolimus e ciclosporina A	Mancha de sangue seco	EL	KOSTER et al., 2013
Glicocorticóides sintéticos	Urina	EFS	DJEDOVIC; RAINBOW, 2011
Tetrodoxina	Urina e Plasma	Filtração	LEUNG; FONG; TSOI, 2011
28 benzodiazepínicos	Cabelo	ELL	VOGLIARDI et al., 2011
Metanefrinas e catecolaminas	Urina	EFS	WHITING, 2009

Tabela 1: Publicações envolvendo o uso da LC-MS em aplicações clínicas. ELL: extração líquido-líquido; EFS: extração em fase sólida; EL: extração líquida; PPT: precipitação de proteína.

As aplicações da técnica de LC-MS são amplas. Atualmente, seu uso está envolvido no monitoramento de drogas terapêuticas, toxicologia, hormônios esteroides, hormônios tireoidianos e na triagem dos erros inatos do metabolismo .(FRENCH, 2017).

4 PERSPECTIVAS DA ESPECTROMETRIA DE MASSAS EM ENSAIOS CLÍNICOS

Introduzida pela primeira vez nos laboratórios de microbiologia clínica e ganhando espaço rapidamente por outros laboratórios em todo o mundo, a espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF, para a identificação bacteriana e fúngica, tem sido considerada um avançado técnico incontestável por ser uma ferramenta rápida, precisa, econômica e aplicável. A utilização do MALDI-TOF permite a detecção de componentes celulares intactos que podem ser comparados a impressões digitais individuais contido em bancos de dados para identificar organismos específicos. Contudo, os organismos da amostra do paciente precisam ser cultivados em meios de cultura. Uma vez crescida a colônia, estas são transferidas para um slide contendo uma matriz e inserida no MALDI-TOF. Apesar disto, o tempo neste processo é significativamente inferior ao tempo necessário para a obtenção de respostas através das técnicas tradicionais microbiológicas. (FORD; BURNHAM, 2013; PATEL, 2015; SEGAWA et al., 2014).

Alguns estudos demonstraram o sucesso do uso do MALDI-TOF na identificação de microorganismos na urina (DEMARCO; BURNHAM, 2014), Líquido Cefalorraquidiano (SEGAWA et al., 2014) e cultura de sangue (LELI et al., 2013). Outros estudos mostraram a utilidade da análise de MALDI-TOF na identificação de *Enterobacteriaceae* (RICHTER et al., 2013), na identificação de bactérias Gram-Positivas de relevância clínica (TEKIPPE et al., 2013) e no desenvolvimento na identificação de espécies *Mycobacterium* não tuberculosas. (ALCAIDE et al., 2018).

O uso da LC-MS na identificação e determinação quantitativa de peptídeos e proteínas de relevância clínica no soro, plasma e urina humano tem despertado muito interesse na comunidade científica. (GILLETTE; CARR, 2013). A importância desse tipo de pesquisa é vista na quantificação do peptídeo β -amilóide associado à Doença de Alzheimer (BROS et al., 2015); na detecção do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF1) envolvido em diversos processos fisiológicos (NIEDERKOFLE et al., 2013); na quantificação multicomplexa de 67 prováveis biomarcadores de doença cardíaca (DOMANSKI et al., 2012); detecção de biomarcadores no câncer de pâncreas (PAN et al., 2013); desenvolvimento e validação de método para quantificação da hemoglobina glicada importante no diagnóstico de diabetes (CERQUEIRA., 2018).

As análises metabolômicas (estudo dos metabólitos) baseadas na MS também tem sido aplicada na busca por biomarcadores em diversas doenças. Como no caso da identificação de metabólitos urinários de nefropatia causada por Diabetes Tipo 2 (CHEN et al., 2018); do perfil metabólito tecidual e sérico de pacientes com carcinoma hepatocelular humano (HAN et al., 2019) e dos novos candidatos a biomarcadores para Neutropenia Febril em pacientes hematológicos (LAPPALAINEN et al., 2018).

O monitoramento de proteínas no plasma utilizando protocolos padronizados, demonstrou a reprodutibilidade, a recuperação, a faixa dinâmica linear, os limites de detecção e quantificação de ensaios multicomplexos entre diferentes laboratórios e plataformas instrumentais (ADDONA et al., 2009). Este estudo demonstra o caminho para o uso da MS e suas interfaces para substituir as plataformas analíticas nos laboratórios clínicos de rotina. Além disso, empresas têm demonstrado interesse na produção de Kits. Como o caso do primeiro kit de teste aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*, do inglês) para uso em laboratórios clínicos. O kit Waters MassTrak Immunosuppressants (Waters, Milford, MA), que foi usado para a quantificação de um imunossupressor, tacrolimus, em amostras de sangue total de pacientes transplantados de fígado e rim (J.E.M. et al., 2011). À medida que mais kits recebem aprovação do FDA e de outras agências de regulamentação, o uso de MS passará a ter um papel central nos exames laboratoriais levando a melhorias no desempenho interlaboratorial.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nos últimos anos, o desenvolvimento e aprimoramento da espectrometria de massas proporcionou a análise de misturas complexas, incluindo fluidos biológicos como soro, plasma e urina. A interface com a Cromatografia Líquida ampliou o espectro de moléculas possíveis de se identificar e quantificar, o que levou o desenvolvimento de métodos bioanalíticos de interesse clínico. Portanto, a LC-MS tem se tornado uma ferramenta analítica poderosa que pode identificar e quantificar simultaneamente diversos analitos em baixas concentrações em diferentes amostras biológicas.

Estudos demonstram que a sensibilidade e especificidade dos imunoensaios são ineficientes a diversos analitos. Isto impulsionou a busca por métodos mais

eficazes e rápidos, além de que a ciência tem descoberto novos biomarcadores através do uso da LC-MS. Neste sentido, observa-se um número crescente de publicações que envolvem a aplicação da MS em ensaios clínicos com o objetivo de substituir os imunoenaios.

Um ponto curioso é que as soluções de padrões utilizados nos kits de imunoenaios são validados e verificados através da MS para a conferência da pureza e concentração. Esse fato nos faz refletir sobre de porque os próprios analitos quantificados pelos imunoenaios não são analisados por MS.

A área de imunoenensaio em química clínica começou com a desenvolvimento do primeiro imunoenensaio para insulina por Solomon Berson e Rosalyn S. Yalow em 1959. Desde lá, vários avanços foram conquistados na área dos imunoenaios até sua definitiva implementação na rotina de laboratórios clínicos. Porém, como toda técnica inovadora sua implementação foi recebida com receio. O uso da MS na rotina de laboratório clínica também é recebido com receio pelos profissionais, porém suas vantagens de sensibilidade, especificidade e análise multi-analítica devem ser consideradas.

Um ótimo exemplo de como podemos ter na rotina de laboratório clínico a MS foi durante as Olimpíadas no Brasil em 2016. O Laboratório Brasileiro de Controle de Dopagem (LBCCD) realizou milhares de análises de doping diariamente em amostras de soro e urina de todos os atletas olímpicos. A lista da WADA (Agência Mundial Antidopagem) é extensa, contendo todas as substâncias proibidas. Este fato mostra que podemos analisar diversas substâncias simultaneamente, de forma rápida e exata.

Empresas tem desenvolvimento kits de LC-MS que contém os solventes, padrões e colunas cromatográficas para agilizar as análises. Esses kits eliminaram os esforços gastos no desenvolvimento e validação dos métodos utilizados, podendo ser usados diretamente na identificação e quantificação de bioanalitos. Desta forma, a MS tem diversas perspectivas e cada vez mais será utilizada em laboratórios clínicos.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADDONA, T. A. et al. Multi-site assessment of the precision and reproducibility of multiple reaction monitoring-based measurements of proteins in plasma. **Nature Biotechnology**, v. 27, n. 7, p. 633–641, 2009.

AGGER, S. A.; MARNEY, L. C.; HOOFNAGLE, A. N. Simultaneous quantification of apolipoprotein A-I and apolipoprotein B by liquid-chromatography-multiple-reaction-monitoring mass spectrometry. **Clinical Chemistry**, v. 56, n. 12, p. 1804–1813, 2010.

ALCAIDE, F. et al. How to: identify non-tuberculous Mycobacterium species using MALDI-TOF mass spectrometry. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 24, n. 6, p. 599–603, 2018.

ANNEMA, W. et al. Evaluation of the new restandardized Abbott Architect 25-OH Vitamin D assay in vitamin D-insufficient and vitamin D-supplemented individuals. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 32, n. 4, p. 1–5, 2018.

BERTHOLF, R. Gas chromatography and mass spectrometry in clinical chemistry. **Encyclopedia of Analytical Chemistry**, p. 1314–1336, 2000.

BLAU, K.; KING, G. S. **Handbook of Derivatives for Chromatography**. 2.ed ed. [s.l.] Chichester: John Wiley & Sons, 1993.

BROS, P. et al. Quantitative detection of amyloid- β peptides by mass spectrometry: State of the art and clinical applications. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 53, n. 10, p. 1483–1493, 2015.

CEGLAREK, U. et al. Validation of the phenylalanine/tyrosine ratio determined by tandem mass spectrometry: Sensitive newborn screening for phenylketonuria. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 40, n. 7, p. 693–697, 2002.

CERQUEIRA., L. B. **DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA QUANTIFICAÇÃO DA HEMOGLOBINA GLICADA POR LC-QTOF-MS**. [s.l.] Universidade Federal do Paraná, 2018.

CHEN, C.-J. et al. Identification of Urinary Metabolite Biomarkers of Type 2 Diabetes Nephropathy Using an Untargeted Metabolomic Approach. **J. Proteome Res., Just Accepted Manuscript**, v. 17, p. 28, 2018.

CLARKE, W. et al. C62-A Clinical and Laboratory Standards Institute. n. October, p. 22–51, 2014.

DE LAETER, J. R. A History of Mass Spectrometry in Nuclear Science. **The Encyclopedia of Mass Spectrometry**, p. 209–215, 2016.

DEMARCO, M. L.; BURNHAM, C. A. D. Diafiltration MALDI-TOF mass spectrometry method for culture-independent detection and identification of pathogens directly from urine specimens. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 141, n. 2, p. 204–212, 2014.

DIRKS, N. F. et al. Various calibration procedures result in optimal standardization of routinely used 25(OH)D ID-LC-MS/MS methods. **Clinica Chimica Acta**, v. 462, p. 49–54, 2016.

DJEDOVIC, N. K.; RAINBOW, S. J. Detection of synthetic glucocorticoids by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in patients being investigated for cushing's syndrome. **Annals of Clinical Biochemistry**, v. 48, n. 6, p. 542–549, 2011.

DOMANSKI, D. et al. MRM-based multiplexed quantitation of 67 putative cardiovascular disease biomarkers in human plasma. **Proteomics**, v. 12, n. 8, p. 1222–1243, 2012.

FENN, J. B. et al. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. **Science**, v. 246, n. 4926, p. 64–71, 1989.

FLESZAR, M. G. et al. Quantitative Analysis of L-Arginine, Dimethylated Arginine Derivatives, L-Citrulline, and Dimethylamine in Human Serum Using Liquid Chromatography–Mass Spectrometric Method. **Chromatographia**, v. 81, n. 6, p. 911–921, 2018.

FORD, B. A.; BURNHAM, C. A. D. Optimization of routine identification of clinically relevant gram-negative bacteria by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and the bruker biotyper. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 5, p. 1412–1420, 2013.

FRENCH, D. et al. Development and Validation of a Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Assay to Quantify Plasma Busulfan. **The Drug Monit**, v. 36, n. 2, p. 169–174, 2014.

FRENCH, D. **Advances in Clinical Mass Spectrometry**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2017. v. 79

GILLETTE, M. A.; CARR, S. A. Quantitative analysis of peptides and proteins in biomedicine by targeted mass spectrometry. **Nature Methods**, v. 10, n. 1, p. 28–34, 2013.

GREBE, S. K. G.; SINGH, R. J. LC-MS/MS in the clinical laboratory - Where to from here? **Clinical Biochemist Reviews**, v. 32, n. 1, p. 5–31, 2011.

HAN, J. et al. Tissue and serum metabolite profiling reveals potential biomarkers of human hepatocellular carcinoma. **Clinica Chimica Acta**, v. 488, n. 225, p. 68–75, 2019.

HARA, K. et al. Comparison of serum 25-hydroxyvitamin D levels between radioimmunoassay and liquid chromatography-tandem mass spectrometry in infants and postpartum women. **Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism**, v. 31, n. 10, p. 1105–1111, 2018.

HEMPEN, C. et al. Dexamethasone suppression test: Development of a method for simultaneous determination of cortisol and dexamethasone in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Annals of Clinical Biochemistry**, v. 49, n. 2, p. 170–176, 2012.

HIMMELSBACH, M. 10years of MS instrumental developments - Impact on LC-MS/MS in clinical chemistry. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 883–884, p. 3–17, 2012.

HOLICK, M.; CHEN, T. Vitamin D deficiency- A worldwide problem (2008).pdf. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 87, n. 87, p. 1080–1086, 2008.

J.E.M., J. et al. An everolimus method comparison between Waters {MassTrak} {XE} ({IUO}) Kit and an {HPLC-MS/MS} method, in renal transplant patients. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 45, n. 1, p. 27–32, 2011.

Jl, C. et al. Simultaneous determination of plasma epinephrine and norepinephrine using an integrated strategy of a fully automated protein precipitation technique, reductive ethylation labeling and UPLC-MS/MS. **Analytica Chimica Acta**, v. 670, n. 1–2, p. 84–91, 2010.

JONES, R. L. et al. Simultaneous analysis of cortisol and cortisone in saliva using XLC-MS/MS for fully automated online solid phase extraction. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 881–882, p. 42–48, 2012.

KAUFMANN, R. Matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) mass spectrometry: a novel analytical tool in molecular biology and biotechnology. **Journal of Biotechnology**, v. 41, n. 2–3, p. 155–175, jul. 1995.

KOLE, P. L. et al. Recent advances in sample preparation techniques for effective bioanalytical methods. **Biomedical Chromatography**, v. 25, n. 1, p. 199–217, 2011.

KOSTER, R. A. et al. Fast LC-MS/MS analysis of tacrolimus, sirolimus, everolimus and cyclosporin A in dried blood spots and the influence of the hematocrit and immunosuppressant concentration on recovery. **Talanta**, v. 115, p. 47–54, 2013.

KUSHNIR, M. M. et al. High-sensitivity tandem mass spectrometry assay for serum estrone and estradiol. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 129, n. 4, p. 530–539, 2008.

LAPPALAINEN, M. et al. Novel Biomarker Candidates for Febrile Neutropenia in Hematological Patients Using Nontargeted Metabolomics. **Disease markers**, v. 2018, p. 6964529, 2018.

LELI, C. et al. Rapid identification of bacterial and fungal pathogens from positive blood cultures by MALDI-TOF MS. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 303, n. 4, p. 205–209, 2013.

LEUNG, K. S.-Y.; FONG, B. M.-W. LC-MS/MS in the routine clinical laboratory: has its time come? **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 406, n. 9–10, p. 2289–2301, 2014.

LEUNG, K. S. Y.; FONG, B. M. W.; TSOI, Y. K. Analytical challenges: Determination of tetrodotoxin in human urine and plasma by LC-MS/MS. **Marine Drugs**, v. 9, n. 11, p. 2291–2303, 2011.

MAUNSELL, Z.; WRIGHT, D. J.; RAINBOW, S. J. Routine isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for simultaneous measurement of the 25-hydroxy metabolites of vitamins D2 and D3. **Clinical Chemistry**, v. 51, n. 9, p. 1683–1690, 2005.

MAURER, H. H. Systematic toxicological analysis of drugs and their metabolites by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 580, n. 1–2, p. 3–41, 1992.

MAURER, H. H. Systematic toxicological analysis procedures for acidic drugs and/or metabolites relevant to clinical and forensic toxicology and/or doping control. **Journal**

of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, v. 733, n. 1–2, p. 3–25, 1999.

MILLINGTON, D. S. et al. Tandem mass spectrometry: a new method for acylcarnitine profiling with potential for neonatal screening for inborn errors of metabolism. **J Inherit Metab Dis**, v. 13, n. 3, p. 321–324, 1990.

MURRAY, K. K. et al. Definitions of terms relating to mass spectrometry (IUPAC Recommendations 2013). **Pure and Applied Chemistry**, v. 85, n. 7, p. 1515–1609, 2013.

NEALE, S. M. et al. Adult testosterone and calculated free testosterone reference ranges by tandem mass spectrometry. **Annals of Clinical Biochemistry**, v. 50, n. 2, p. 159–161, 2013.

NIEDERKOFER, E. E. et al. Targeted selected reaction monitoring mass spectrometric immunoassay for insulin-like growth factor 1. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p. 1–6, 2013.

NIER., K. A.; YERGEY., A. L.; GALE., P. J. *The Encyclopedia of Mass Spectrometry*. Elsevier, 2015. p. 406.

NIER, A. O. Some reflections on the early days of mass spectrometry at the university of minnesota. **International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes**, v. 100, n. C, p. 1–13, 1990.

PAN, S. et al. Plasma : a Pancreatic Cancer Biomarker Case Study. v. 11, n. 3, p. 1937–1948, 2013.

PATEL, R. MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases. **Clinical Chemistry**, v. 61, n. 1, p. 100–111, 2015.

PAVIA., D. L. et al. **Introdução À Espectroscopia**. 4ª Edição ed. [s.l.: s.n.].

RASHED, M. S. et al. Screening blood spots for inborn errors of metabolism by electrospray tandem mass spectrometry with a microplate batch process and a computer algorithm for automated flagging of abnormal profiles. **Clinical Chemistry**, v. 43, n. 7, p. 1129–1141, 1997.

RICHTER, S. S. et al. Identification of Enterobacteriaceae by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry using the VITEK MS system. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 32, n. 12, p. 1571–1578, 2013.

SÁNCHEZ-GUIJO, A. et al. Simultaneous quantification of cholesterol sulfate, androgen sulfates, and progestagen sulfates in human serum by LC-MS/MS. **Journal of Lipid Research**, v. 56, n. 9, p. 1843–1851, 2015.

SEGAWA, S. et al. Direct application of MALDI-TOF mass spectrometry to cerebrospinal fluid for rapid pathogen identification in a patient with bacterial meningitis. **Clinica Chimica Acta**, v. 435, p. 59–61, 2014.

SOLDIN, S. J. et al. The measurement of free thyroxine by isotope dilution tandem mass spectrometry. **Clinica Chimica Acta**, v. 358, n. 1–2, p. 113–118, 2005.

SONG, C. et al. Accurate determination of amino acids in serum samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using a stable isotope labeling strategy.

Journal of Chromatographic Science, v. 53, n. 9, p. 1536–1541, 2015.

SPEZIALE, R. et al. Determination of acetyl coenzyme A in human whole blood by ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1083, n. 2017, p. 57–62, 2018.

TEKIPPE, E. M. et al. Optimizing Identification of Clinically Relevant Gram-Positive Organisms by Use of the Bruker Biotyper Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight Mass Spectrometry System. **Journal of clinical microbiology**, v. 51, n. 5, p. 1421–1427, 2013.

TRAVERS, S. et al. Multiplexed steroid profiling of gluco- and mineralocorticoids pathways using a liquid chromatography tandem mass spectrometry method. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 165, p. 202–211, 2017.

TRUFELLI, H. et al. An overview of matrix effects in liquid chromatography-mass spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 30, n. 3, p. 491–509, maio 2011.

U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. Food and Drug Administration (FDA), Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. n. May, 2013.

VAN ANDEL, L. et al. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay to quantify plitidepsin in human plasma, whole blood and urine. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 145, p. 137–143, 2017.

VAN DEN OUWELAND, J. M. W.; KEMA, I. P. The role of liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the clinical laboratory. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 883–884, p. 18–32, 2012.

VESSECCHI, R. et al. Nomenclaturas de espectrometria de massas em língua portuguesa. **Quimica Nova**, v. 34, n. 10, p. 1875–1887, 2011.

VOGESER, M.; SEGER, C. LC-MS/MS in clinical chemistry. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 883–884, p. 1–2, 2012.

VOGLIARDI, S. et al. Simultaneous LC-HRMS determination of 28 benzodiazepines and metabolites in hair. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 400, n. 1, p. 51–67, 2011.

WATSON, J. T. .; SPARKMAN, O. D. **Introduction to Mass Spectrometry: Instrumentation, Applications and Strategies for Data Interpretation**. Fourth Edition. John Wiley & Sons, Ltd, 2007.

WHITING, M. J. Original article simultaneous measurement of urinary metanephrines and catecholamines by liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. **Annals of Clinical Biochemistry**, v. 46, n. 2, p. 129–136, 2009.

WILSON, K.; WALKER, J. Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology. In: WILSON, K.; WALKER, J. (Eds.). . Cambridge: Cambridge University Press, 2013. p. 350–356.

WOOD, L. et al. Measurement of urinary free cortisol by tandem mass spectrometry and comparison with results obtained by gas chromatography-mass spectrometry and two commercial immunoassays. **Annals of Clinical Biochemistry**, v. 45, n. 4, p. 380–388, 2008.

WU, A. H. B.; FRENCH, D. Implementation of liquid chromatography/mass spectrometry into the clinical laboratory. **Clinica Chimica Acta**, v. 420, n. June, p. 4–10, 2013.

ZHANG, Y. V. et al. Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry: An Emerging Technology in the Toxicology Laboratory. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 36, n. 4, p. 635–661, 2016.