



NUCLEOSÍDEOS MODIFICADOS COMO BIOMARCADORES PUTATIVOS DE CÂNCER DE PRÓSTATA: ANÁLISES INICIAIS PARA ADEQUAÇÃO DE UM MÉTODO DE CE-UV

Palavras-Chave: CÂNCER; NUCLEOSÍDEOS; AMOSTRAS *IN VITRO*; METABOLÔMICA; ELETROFORESE CAPILAR.

Autores/as:

Isabela Rocha (autora) (IQ-UNICAMP)

Ingridi Rafaela de Brito (IB-UNICAMP)

Prof.^a Dr.^a Aline Mara dos Santos (IB-UNICAMP)

Prof.^a Dr.^a Ana Valéria Colnaghi Simionato (orientadora) (IQ-UNICAMP)

INTRODUÇÃO:

O câncer de próstata é o quarto tumor mais diagnosticado no mundo^[1] e se caracteriza como um adenocarcinoma, isto é, quando células glandulares são as responsáveis por crescer descontroladamente e gerar o tumor (podem ainda entrar em metástase, se espalhando pelo organismo).^[2,3]

A incidência de câncer de próstata tem aumentado, uma vez que se observa uma tendência de aumento na expectativa de vida, ou seja, o envelhecimento populacional.^[4,5] Dentre as metodologias aplicadas atualmente para o diagnóstico desta patologia, tem se observado um aumento expressivo do uso de ciências ômicas e bioinformática.^[6]

O termo metabolômica foi cunhado por Oliver Fiehn e consiste em uma técnica de perfil analítico para medir e comparar um grande número de metabólitos presentes em amostras biológicas.^[7,8] A metabolômica pode ser útil tanto para pesquisas clinicamente relevantes

quanto para medicina de precisão e diagnóstico de indivíduos envolvendo comparações entre grupos, estudos epidemiológicos ou populacionais e perfis de determinados indivíduos em comparação a uma população de referência, obtendo assim, possíveis candidatos a biomarcadores.^[9]

Define-se um biomarcador como sendo uma alteração celular, bioquímica e/ou molecular capaz de ser mensurável em matrizes biológicas como tecidos, células e fluidos biológicos.^[10]

Durante o desenvolvimento do tumor, devido a uma maior conversão de glicose em lactato, há um aumento na taxa de respiração a fim de alimentar o fluxo metabólico através do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) objetivando promover uma maior quantidade de metabólitos necessários para seu crescimento celular.^[11] Com o aumento da taxa de respiração, há também o aumento da degradação do RNA, assim como uma hiperatividade das enzimas de metilação, o que leva a maiores concentrações

de nucleosídeos no meio extracelular de células cancerígenas. [12] Portanto, os nucleosídeos podem ser considerados potenciais candidatos a biomarcadores do câncer de próstata. Desta forma, sendo eles moléculas polares, hidrofílicas, de baixa massa molar e que absorvem radiação na região do ultravioleta, técnicas de separação em meio líquido com detecção por UV-visível (como cromatografia líquida e eletroforese capilar) podem ser empregadas na análise de amostras contendo tais analitos. [12]

A eletroforese capilar tem sido utilizada como técnica de separação de diversas amostras biológicas contendo analitos como os já citados nucleosídeos. Ela possui como vantagem a utilização de pequenos volumes de amostra (1-10 nL), automatização do processo, instrumentação simples e utilização de diferentes modos de detecção, como absorção no UV-Vis, fluorescência, métodos eletroquímicos, espectrometria de massas, [13] entre outros, demonstrando ser uma técnica bastante versátil e eficiente. Além disso, a existência do fluxo eletrosmótico (EOF, do inglês *Electroosmotic Flow*) com perfil radial constante de velocidade (o que provê menor alargamento das bandas dos analitos) é uma peculiaridade frente a outras técnicas de separação, como a cromatografia líquida, que apresenta menor eficiência de separação devido ao perfil parabólico do fluxo de fase móvel gerado pela aplicação de pressão, dentre outros motivos. [14,15]

METODOLOGIA:

O método utilizado no desenvolvimento deste trabalho já foi previamente otimizado por nosso grupo de pesquisa para análise de amostras de soro sanguíneo de pacientes saudáveis e com câncer de próstata. [12] No entanto, devido ao longo período passado desde que o método foi validado, torna-se necessário avaliar novamente algumas figuras de mérito a fim de verificar se ainda atendem às condições

especificadas pela ANVISA (Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 166, de 24 de Julho de 2017) [16], já que o equipamento pode ter sofrido alteração de seu desempenho (pelo tempo de uso e por ter passado por reparos).

As figuras de mérito sob avaliação são limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), linearidade, faixa linear, exatidão e precisão. Para isso, serão feitas curvas analíticas utilizando amostras de padrão dos nucleosídeos em diferentes concentrações, sendo testadas também as formas de padronização interna ou externa.

Os padrões analíticos de nucleosídeos utilizados neste projeto, são: citidina (C), adenosina (A), timidina (T), uridina (U), 5-metiluridina (5mU), guanosina (G), xantossina (X), inosina (I) e 8- bromoguanosina (8-BrG), sendo este último utilizado como padrão interno (Figura 1).

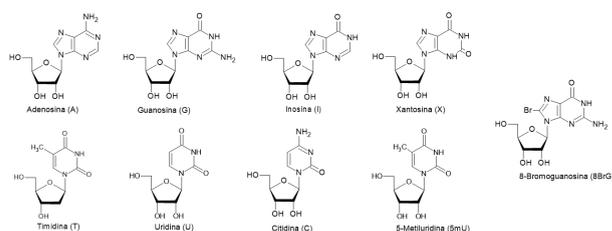


Figura 1. Estrutura química dos nucleosídeos avaliados. [12]

Ao contrário do trabalho previamente desenvolvido em nosso grupo com amostras de soro sanguíneo de indivíduos saudáveis e doentes, neste serão usadas amostras *in vitro* de células de próstata e de câncer de próstata, de forma a obter um sistema biológico mais controlado e corroborar com os dados já publicados (Figura 2). [12]

As análises estão sendo feitas em um equipamento CE-UV modelo CE7100 com software 3D-CE ChemStation, ambos da Agilent Technologies, em capilar de sílica fundida com dimensões de 50 µm de diâmetro interno, 56 cm de comprimento efetivo e 64,5 cm de comprimento total. O eletrólito de corrida (BGE, do inglês *Background Electrolyte*) é constituído

por solução de borato de sódio (30 mmol L⁻¹) e brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB, do inglês Cetyltrimethylammonium Bromide) (50 mmol L⁻¹) em pH 9,90 e metanol 10% (v/v).^[12] As amostras são introduzidas no capilar no modo hidrodinâmico a 50 mbar por 120 s, seguido de aplicação de tensão de 25 kV por 15 s, para ocorrência de *sample stacking*. A tensão aplicada para separação é de -10 kV, temperatura de 20 °C e comprimento de onda de detecção de 260 nm.



Figura 2. Linhagem de células DU 145 (células cancerígenas) cultivadas em meio RPMI de alta glicose contendo soro fetal bovino (10%), penicilina/estreptomicina (1%) adquiridas através do laboratório do Prof. Dr. Hernandes Faustino de Carvalho do Departamento de Biologia Celular (Instituto de Biologia da Unicamp-IB). Após a realização do crescimento, as mesmas são congeladas a -80°C a fim de conservá-las até o momento de realizar as análises por CE-UV.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Inicialmente, foram analisadas soluções de padrões de nucleosídeos sob as condições otimizadas previamente, obtendo-se o eletroferograma da Figura 3.^[12]

Nota-se que alguns picos, como o correspondente a 5mU, estão largos e com a presença de cauda (*tailing*). Além disso, observa-se também uma baixa resolução entre os picos da 5mU, G e X. A respeito disso, foram

feitos alguns testes modificando certos parâmetros de introdução da amostra a fim de tornar os picos mais eficientes e obtenção de melhores resoluções (Figura 4 e Tabela 1).

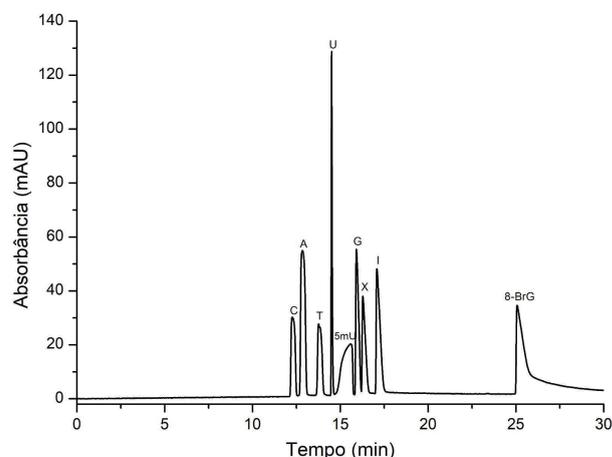


Figura 3. Eletroferograma obtido para as condições de introdução das amostras previamente estabelecidas e descritas na parte experimental.

Tabela 1. Condições avaliadas na otimização da introdução hidrodinâmica (50 mbar) seguida por aplicação de tensão entre vials de BGE.

Condição	Tempo de introdução (s)	Tensão (kV)	Tempo de aplicação de tensão (s)
Normal	120	25	15
1	120	30	15
2	120	25	30
3	90	20	20
4	90	25	10
5	90	25	15
6	120	25	20
7	60	30	10

As condições aqui escolhidas foram baseadas em testes já realizados e que demonstraram bons resultados para a separação dos nucleosídeos, mas que não foram os escolhidos na otimização feita.

A Figura 5 mostra os eletroferogramas obtidos para cada uma destas condições anteriormente descritas. O Gráfico 1, apresenta

os valores de resolução entre os picos críticos para o método (U-5mU e G-X), mostrando que, nos testes 2, 4 e 5, a resolução entre os picos X e G foi inferior a 1,5. Desta forma, tais condições foram descartadas. A condição normal demonstrou separação eficiente dos picos, assim como as do teste 5. Porém, neste último, apesar dos picos terem maior eficiência, observou-se uma redução na intensidade de alguns dos picos (como o U) quando comparado a condição normal (Figura 5), o que pode afetar negativamente a detectabilidade do método na análise de amostras reais.

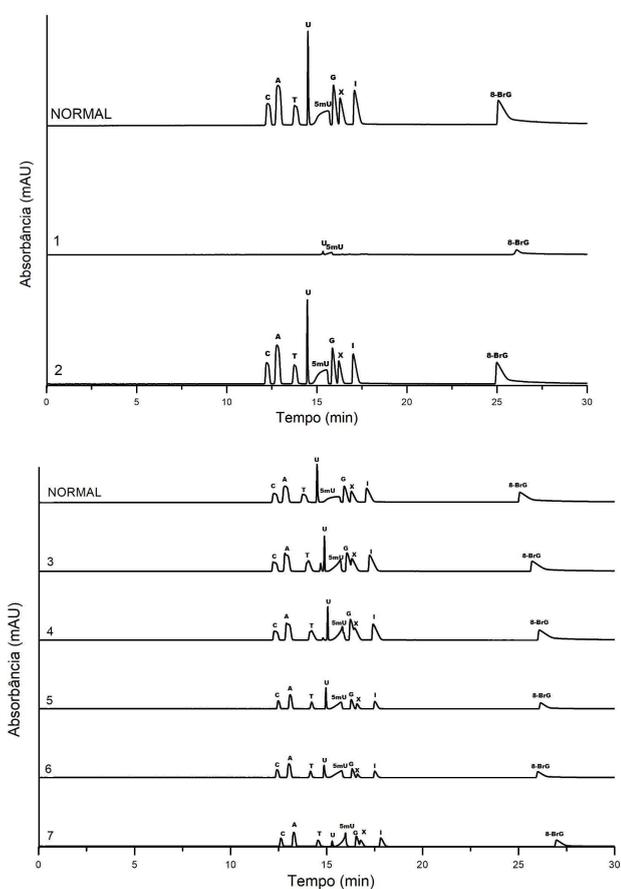


Figura 4. Eletroferogramas obtidos para a otimização da introdução hidrodinâmica seguida por aplicação de tensão entre vials de BGE. Condições de análise são análogas às já descritas na metodologia (normal), entretanto, as estratégias de introdução são diferentes (Tabela 1).

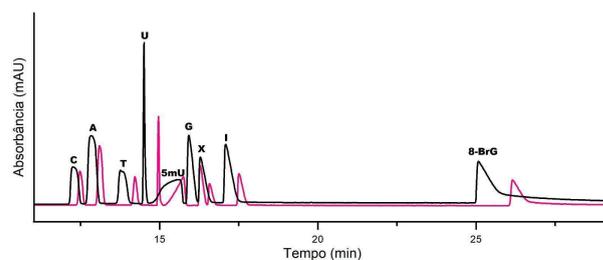


Figura 5. Eletroferogramas obtidos para as condições normal e 5 (Tabela 1) a fim de comparar as intensidades, tempos de migração, resolução e largura dos picos.

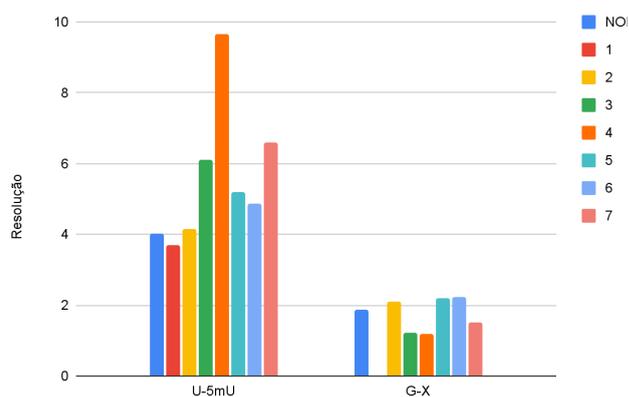


Gráfico 1. Resoluções dos picos obtidas para otimização dos modos de introdução avaliados. Condições de análise análogas às já descritas na metodologia, mas com estratégias de introdução diferentes (Tabela 1).

A partir destes resultados, os próximos testes terão como objetivo: aumentar a resolução entre os picos, principalmente entre os picos G e X; melhorar o formato dos picos 5mU e 8-BrG que, apesar de mais eficientes, ainda apresentam *tailing*; e não reduzir a intensidade dos picos a fim de não perder detectabilidade.

Em seguida, assim que encontrados os parâmetros ideais, serão obtidas as curvas de analíticas de cada padrão de nucleosídeos, assim como avaliação de algumas figuras de mérito do método validado.

CONCLUSÕES:

Apesar do método já ter sido otimizado e validado, alguns dos parâmetros estabelecidos já não proporcionaram uma boa resolução e formato dos picos. Desta forma, foram feitos alguns testes iniciais alterando as estratégias de introdução da amostra e *stacking* a fim de melhorar tais características.

