

BIOMARCADORES TUMORAIS: VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO DE ELETROFORESE CAPILAR PARA QUANTIFICAÇÃO DE NUCLEOSÍDEOS MODIFICADOS

Lucas Tizei Vidotto (IC)*, Sumaya Ferreira Guedes (PG), Ana Valéria C. Simionato (PQ),

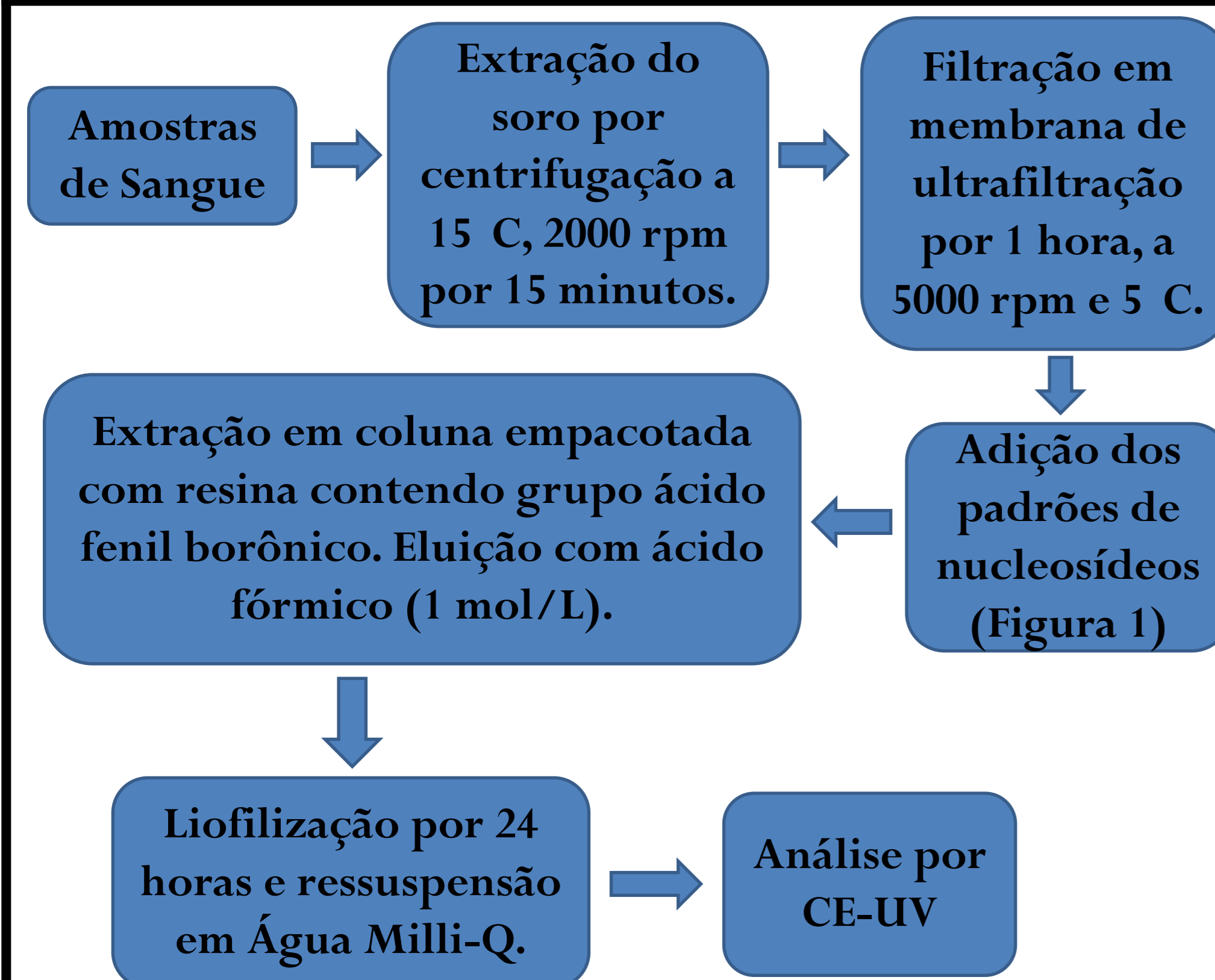
*lucasvidotto@gmail.com

Palavras-chave: Câncer – Eletroforese - Nucleosídeos

INTRODUÇÃO

A detecção e tratamento de tumores cancerígenos representa um dos grandes desafios para a medicina e a ciência do século XXI. Visando-se um diagnóstico prévio da doença, os nucleosídeos modificados, metabólitos do ácido ribonucléico transportador, vêm sendo empregados^[1-2]. Como eles são produzidos em maior quantidade nas células afetadas, devido a seu metabolismo acelerado^[3], são potenciais biomarcadores tumorais. O método de eletroforese capilar é ideal para análise de biomoléculas pois possibilita uma análise rápida, com o uso de poucas quantidades de amostra e reagentes, versatilidade e simplicidade de instrumentação. Neste trabalho estão sendo feitas a otimização e validação de um método analítico para a quantificação de nucleosídeos modificados em soro sanguíneo por eletroforese capilar com detecção por UV-vis (CE-UV).

METODOLOGIA



Condições de Análise:

- Equipamento: CE 7100 – Agilent Technologies
- Eletrólito: Borato 20 mmol/L (pH 9,2), dodecil sulfato de sódio 260 mmol/L e 17% de metanol;
- t_{inj} : 15 s (50 mbar), λ : 260 nm, V: 23,8 kV, T: 20 °C;
- L_{total} : 57,3 cm; $L_{efetivo}$: 48 cm; $\varnothing_{interno}$: 50 μ m.

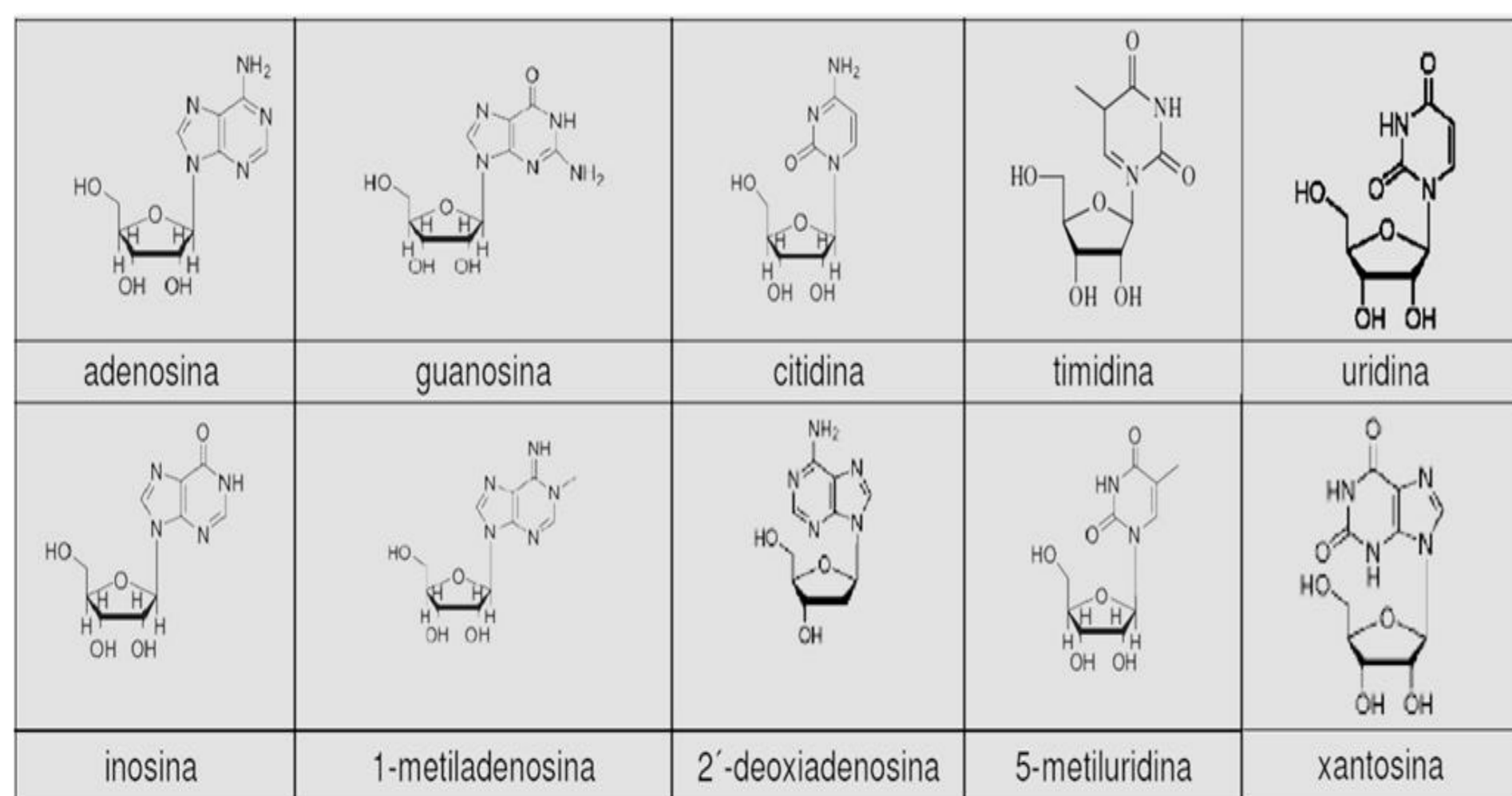


Figura 1: Estrutura dos padrões de nucleosídeos

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 1: Parâmetros das curvas analíticas. Coeficiente de correlação (R) e Faixa Linear (F.L.)

Nucleosídeos	Sensibilidade (mAu/mol)	Intercepto	R	F.L. (μ mol/L)
1-Metiladenosina	0,0708	0,0526	0,9984	2-10
Citidina	0,0463	0,7880	0,9954	40-120
5-Metiluridina	0,0566	0,2208	0,9971	8-16
Guanosina	0,0708	0,3142	0,9963	8-16
Adenosina	0,1200	0,1239	0,9959	5-13
Uridina	0,0913	0,258	0,9989	11-19
Inosina	0,1047	0,0554	0,9962	7-15
Xantosina	0,2232	0,4810	0,9980	7-15

Tabela 2: Limites de quantificação (LQ) e detecção (LD) determinados no método validado.

Nucleosídeos	LQ (μ mol/L)	LD (μ mol/L)	LD1 (μ mol/L)	LD2 (μ mol/L)	LD3 (μ mol/L)
1-Metiladenosina	1	0,3	3,5	1,06	0,17
Citidina	4	1,2	3,1	1,67	0,5
5-Metiluridina	2	0,6	2,5	0,56	0,61
Guanosina	1	0,3	2	1,09	0,78
Timidina	2	0,6	2,6	0,77	0,55
2-Deoxiadenosina	1	0,3	9,2	0,78	0,41
Adenosina	2	0,6	N.A.	0,76	0,65
Uridina	5	1,5	N.A.	N.A.	N.A.
8-Bromoguanosina	2	0,6	N.A.	N.A.	N.A.
Inosina	3,5	1,05	N.A.	N.A.	N.A.
Xantosina	7	2,1	N.A.	N.A.	0,98

LD1, LD2 e LD3 são valores obtidos por outros métodos na literatura. N.A – Não analisados

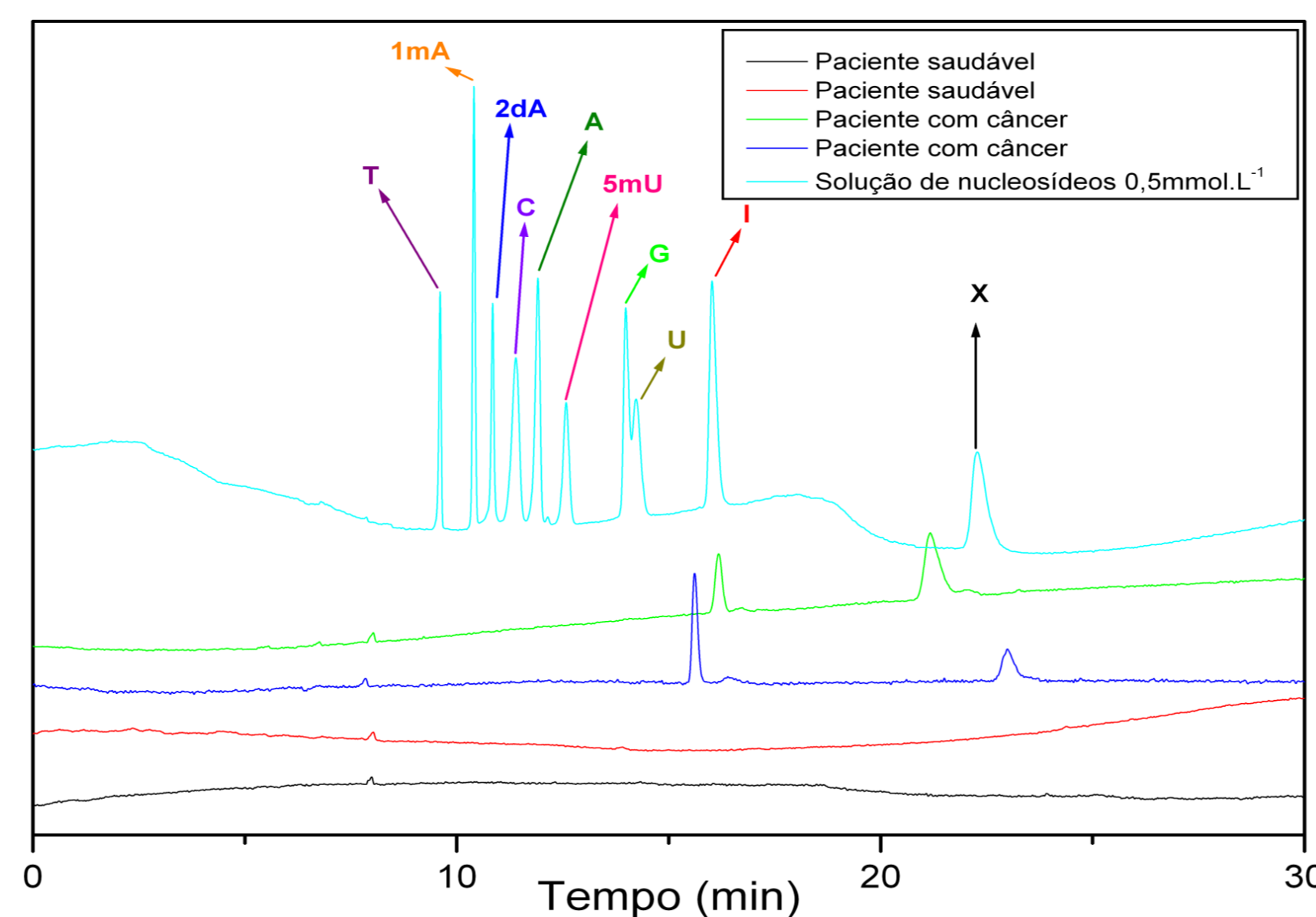


Figura 4: Aplicações iniciais do método validado. Comparação entre eletroferogramas de amostras de soro sanguíneo de pacientes saudáveis, pacientes com câncer de próstata, e padrões de nucleosídeos ressuspensos em água Milli-Q após extração.

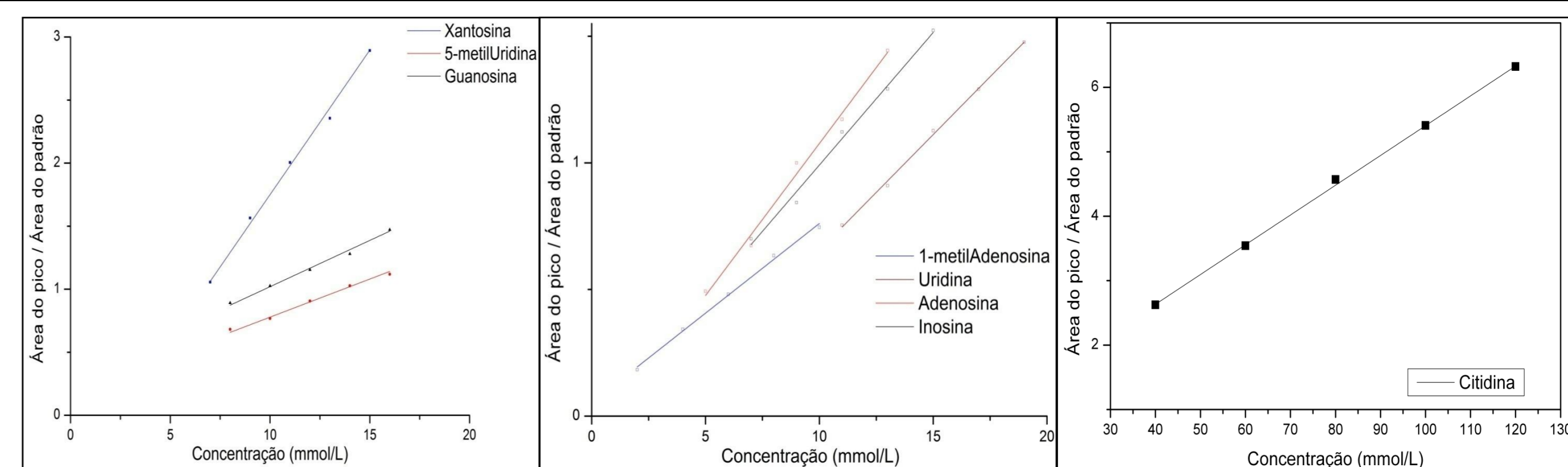


Figura 2: Curvas analíticas para os padrões de nucleosídeos. A Timidina (T) e a 2'-deoxiadenosina (2dA) não foram extraídos pelo método de preparo das amostras e, portanto, não foram avaliados.

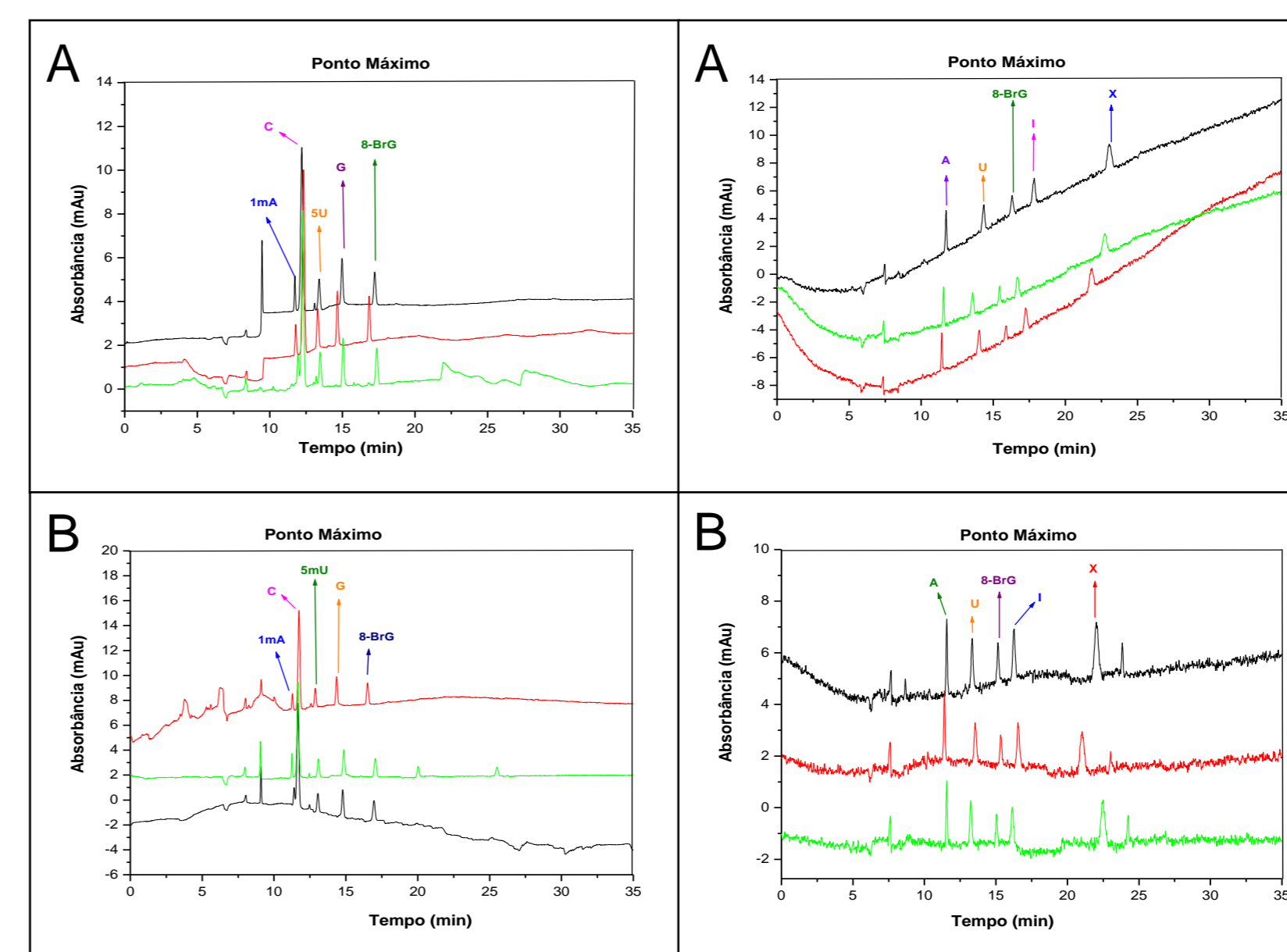


Figura 3: Eletroferogramas da precisão intra-dia (A) e inter-dia (B) para o ponto máximo.

Tabela 3: Precisão intra-dia do método

Nucleosídeos	Precisão Intra-dia		
	Ponto Mínimo	Ponto Médio	Ponto Máximo
1-metiladenosina	16	2	13
Citidina	22	1	5
5-metiluridina	14	3	8
Guanosina	16	6	5
Adenosina	7	7	5
Uridina	9	6	12
Inosina	10	5	12
Xantosina	16	16	10

Tabela 4: Precisão inter-dia do método

Nucleosídeos	Precisão Inter-dia		
	Ponto Mínimo	Ponto Médio	Ponto Máximo
1-metiladenosina	16	10	10
Citidina	10	12	2
5-metiluridina	4	6	2
Guanosina	6	8	3
Adenosina	13	9	5
Uridina	17	7	12
Inosina	18	15	15
Xantosina	1	13	7

- As Tabelas 1 à 4 apresentam valores que se enquadram-se nas normas da ANVISA^[4], com exceção para as análises de precisão do ponto mínimo da Citidina e o ponto máximo da Xantosina.
- Os valores obtidos na análise de exatidão também se adequam as normas, variando de 91% à 117% para o ponto mínimo e de 89% a 113% para ponto médio e máximo.

CONCLUSÕES

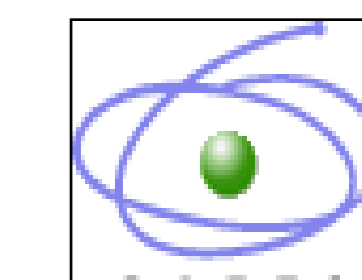
As figuras de mérito analisadas até o momento, apresentam valores dentro dos limites especificados pela ANVISA^[4], demonstrando a capacidade do método na análise de nucleosídeos extraídos de soro sanguíneo. Ao ser aplicado a duas amostras de pacientes com câncer, resultados positivos foram obtidos para ambos, com um tempo de análise de aproximadamente vinte e cinco minutos e consumo de amostra e eletrólito na ordem de μ L e nL, respectivamente. Têm-se a confirmação de que, após a validação, o método pode ser utilizado na detecção rápida e eficiente de neoplasias.

As aplicações futuras podem ser tanto no prognóstico, quanto na confirmação da doença em casos onde os exames de rotina possam gerar dúvidas.

BIBLIOGRAFIA

- 1-Ma, Y., Liu, G., Du, M. and Stayton, I., Electrophoresis, 25: 1473–1484, 2004.
- 2-Szymànska, E.; Markuszewski, M. J.; Bodzioch, K.; Kaliszan, R., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 44, 1118–1126, 2007.
- 3-A. Seidel, S. Brunner, P. Seidel, G.I. Fritz and O. Herbarth, *British Journal of Cancer* 94, 1726 – 1733, 2006.
- 4-ANVISA, resolução n° 899, de 29 de maio de 2003 - http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm#, acessado em 01/06/2011.

AGRADECIMENTOS



Laurione Candido de Oliveira- Hospital das Clínicas-Unicamp