

# **Inibição de nucleases mediada pelo EDTA protege o DNA livre de células de degradação ex-vivo em amostras de sangue**

*J. Vasques<sup>1</sup>, T. Santa Rita<sup>2</sup>, C. Chianca<sup>2</sup>, L. Velasco<sup>1</sup>, L. Abdalla<sup>1</sup>, S. Costa<sup>1</sup>, G. Barra<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Laboratório Sabin, Brasília, Brasil

<sup>2</sup>Universidade de Brasília, Brasília, Brasil

## **Introdução**

O DNA livre de células (cfDNA) na circulação está se tornando um importante analito. Diversos estudos têm mostrado que sua quantificação é útil para o monitoramento de pacientes com câncer e outras condições de saúde. Além disso, o cfDNA fetal na circulação materna é atualmente o método de escolha para a determinação não-invasiva das características genéticas do feto. Entretanto, o cfDNA é desprotegido e pode estar susceptível a conhecida e alta atividade nuclease presente no sangue. Neste estudo, dosamos os níveis de uma sequência específica do cromossomo Y (DYS-14) no soro e plasma materno para investigar o impacto ex-vivo desta atividade nuclease sobre a quantidade de cfDNA.

## **Métodos**

Este estudo utilizou amostras pareadas de sangue e plasma- EDTA (n=34) de mulheres grávidas com feto do sexo masculino (idade gestacional de 12 ± 4 semanas). Consentimento informado foi obtido de todas as participantes e comitê revisor local aprovou o estudo. Os experimentos foram executados em conjuntos de 9-10 amostras pareadas, exceto no ensaio envolvendo exposição as temperaturas -20°C/4°C/24°C (as amostras de soro e plasma EDTa não eram pareadas). A extração de ácidos nucleicos foi feita no Nuclisens easyMAG (bioMerieux). Os ensaios para DYS-14 foram realizados no StepOne Real-time PCR Systems (Applied Biosystems) com uso de sondas de hidrólise (Taqman) e quantificação absoluta. Os resultados foram apresentados na forma de mediana em equivalentes genômicos/mL. As análises estatísticas foram o teste de Wilcoxon's ou o teste de Friedman's. Para o ensaio com nuclease exógena, as amostras foram tratadas ou não com 25U de DNase I (Fermentas) por uma hora a 37°C antes da dosagem do DYS-14. Para o ensaio de nuclease endógena uma sonda de hidrólise e uma referência passiva (ROX) foram adicionados diretamente ao soro ou plasma-EDTA, o aumento da fluorescência foi medido por 10 horas a 37°C no

equipamento de PCR em tempo real. Para o ensaio de inibição da atividade nuclease no soro uma diluição seriada de EDTA variando de 0.000005 a 50 mM foi usada.

## Resultados

A quantidade do DYS-14 foi maior no plasma-EDTA do que no soro (24.77 versus 18.13 GE/ml,  $P=0.0137$ ). Esta diferença aumentou ainda mais após a exposição da amostra a 37°C por 24 horas, 22.22 GE/ml para plasma-EDTA versus 5.18 GE/ml para soro,  $P=0.002$ . Em seguida, as amostras foram submetidas a -20°C, 4°C ou 24°C por 24 horas e nenhuma diferença foi observada na concentração de DYS-14 no plasma-EDTA, 36.24, 38.02 e 37.31 GE/ml ( $p=0.328$ ), respectivamente. No soro, a concentração de DYS-14 reduziu a 24°C (11.60 GE/ml) comparado a -20°C (18.65 GE/ml) e 4°C (17.90 GE/ml),  $p = 0.0002$ . Ademais, o tratamento com DNase I não alterou a quantidade de DYS-14 no plasma-EDTA (não-tratado 16.07 versus tratado 17.57 GE/ml,  $p=0.42$ ), mas o eliminou completamente do soro (não-tratado 9.21 versus tratado 0.0003 GE/ml,  $p=0.0039$ ). Adicionalmente, a degradação da sonda de hidrólise pode ser detectada no soro (12.7 X), mas não no plasma-EDTA (0.28 X). Finalmente, a degradação da sonda de hidrólise no soro foi inibida a partir da concentração de 0.5mM de EDTA.

## Conclusão

Descobrimos que o cfDNA está sujeito à degradação mediada pela temperatura no soro, mas não no plasma. Além disso, as nucleases exógenas e endógenas estão ativas apenas no soros. O EDTA provavelmente por quelar íons divalentes inibe as nucleases sanguíneas conferindo proteção ex-vivo ao cfDNA. Por fim, nós desenvolvemos um método em tempo real baseado em fluorescência para detecção da atividade nuclease em amostras clínicas.