

Mendel Suchmacher Neto

Proposição de metodologia para estudo de uridina 5'-trifosfato trissódica e citidina 5'-monofosfato dissódica e derivados em matriz biológica durante neuropatias periféricas.

Rio de Janeiro

2015

Mendel Suchmacher Neto

Proposição de metodologia para estudo de uridina 5'-trifosfato trissódica e citidina 5'-monofosfato dissódica e derivados em matriz biológica durante neuropatias periféricas.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Gerenciamento, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica do Instituto de Tecnologia em Fármacos - FIOCRUZ, como um dos pré-requisitos para obtenção do Grau de Mestre.

Orientadora: Dr^a. Mariana Conceição de Souza

Orientadora Colaboradora: Dr^a Elaine Cruz Rosas

Rio de Janeiro

2015

S942p

Suchmacher Neto, Mendel

Proposição de metodologia para estudo de uridina 5' –trifosfato trissódica e citidina 5' –monofosfato dissódica e derivados em matriz biológica durante neuropatias periféricas. /Mendel Suchmacher Neto. – Rio de Janeiro, 2015.

xii, 75f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Mariana Conceição de Souza

Orientadora Colaboradora: Elaine Cruz Rosas

Dissertação (mestrado) – Instituto de Tecnologia em Fármacos – Farmanguinhos, Pós-graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica, 2015.

Bibliografia: f. 74-87

1. Uridina 5, -trifosfato trissódica 2. Citidina 5, -monofosfato Dissódica. 3. Matriz biológica. I. Título.

CDD 615.1

Eu autorizo a reprodução total ou parcial desta Dissertação, para propósitos acadêmicos e científicos somente, desde que a fonte seja citada.

Mendel Suchmacher Neto

Data

Mendel Suchmacher Neto

Proposição de metodologia para estudo de uridina 5'-trifosfato trissódica e citidina 5'-monofosfato dissódica e derivados em matriz biológica durante neuropatias periféricas.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Gerenciamento, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica do Instituto de Tecnologia em Fármacos - FIOCRUZ, como um dos pré-requisitos para obtenção do Grau de Mestre.

Aprovada em de de 2015.

Banca Examinadora:

Dr^a. Mariana Conceição de Souza
Instituto de Tecnologia em Fármacos – FIOCRUZ (Presidente da Banca)

Dr. José Luiz Mazzei da Costa
(Farmanguinhos/FIOCRUZ)

Prof^a. Dr^a. Carmen Penido
(Farmanguinhos/FIOCRUZ)

Prof^a. Dra. Mônica Freiman de Souza Ramos
Faculdade de Farmácia - UFRJ

Rio de Janeiro

2015

AGRADECIMENTOS

Às minhas Orientadoras por terem me aceito como Aluno, por terem se esforçado em compreender o Tema do meu Projeto e por tê-lo corrigido ao longo do seu desenvolvimento. Obrigado pela paciência e empenho.

Aos membros da Banca Examinadora que, durante os Seminários Avançados I e II, me apresentaram com indicações valiosas de como melhorar minha Dissertação.

Aos meus superiores no Laboratório Gross - Dr. Carlos Fernando Gross e Dr. Heros Rabelo - por ascerem na minha participação neste Mestrado Profissional.

Ao Prof. Valbert N. Cardoso - Coordenador do Laboratório de Radioisótopos da Faculdade de Farmácia da UFMG - e ao Prof. Dr. André B. de Barros, pelo apoio na descrição da metodologia proposta nesta Dissertação.

À minha Mãe que, com a coragem de dez homens, custeou minha Faculdade de Medicina vendendo à prestação, pagando suas mensalidades sem nunca atrasar e comprando toda a literatura que pedia sem fazer perguntas.

A Ester e Renan, pelas horas de convívio familiar que concordaram em sacrificar para que este Projeto pudesse se tornar realidade.

RESUMO

SUCHMACHER NETO, Mendel. Proposição de metodologia para estudo de uridina 5'-trifosfato trissódica e citidina 5'-monofosfato dissódica e derivados em matriz biológica durante neuropatias periféricas. 95 f. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Gerenciamento, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica - Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2015.

Uridina 5'-trifosfato trissódica (UTPt) e citidina 5'-monofosfato dissódica (CMPd) são nucleotídeos pirimidínicos do ácido nucleico. Eficácia e segurança de fármacos baseados na UTPt e CMPd, usados no tratamento para neuropatias periféricas já foram estudadas, no entanto informações sobre farmacocinética desses fármacos ainda não são conhecidas. O objetivo deste estudo foi propor metodologias para quantificar UTPt e CMPd em matrizes biológicas, baseando-se numa revisão sistemática da literatura. Levando em consideração que a biodisponibilidade das pirimidinas, durante as neuropatias periféricas é diferente da observada em voluntários sadios, os dados disponíveis acerca das concentrações plasmáticas do UTPt e CMPd não devem ser usados para estimar a dose de fármacos baseados nessas pirimidinas. Para diferenciar pirimidinas endógenas e exógenas em matrizes biológicas, estas últimas devem ser marcadas, antes da administração, com material radioativo tais como trício [^3H] ou carbono 14 [^{14}C]. Além disso, a cromatografia líquida de alta performance é a técnica mais aplicada para identificação e quantificação de pirimidinas radioativas. Nós concluímos que a radiomarcagem de UTPt e CMPd, seguida de separação cromatográfica e detecção por UV e cintilografia líquida, seria uma metodologia factível para estudos de detecção e quantificação de derivados de UTPt e CMPd em matriz biológica.

Palavras-chave: Uridina 5'-trifosfato trissódica. Citidina 5'-monofosfato dissódica. Matriz biológica.

ABSTRACT

SUCHMACHER NETO, Mendel. 2015. Proposition of a methodology for the study of uridine 5'-triphosphate trisodium and cytidine 5'-monophosphate disodium derivatives in biological matrices during peripheral neuropathies. 95 p. Dissertation presented to Post-graduation Program on Management, Research and Development in Pharmaceutical Industry - Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2015.

Pyrimidines uridine 5'-triphosphate trisodium (UTPt) and cytidine 5'-monophosphate disodium (CMPd) are standard nucleosides which make up nucleic acids. Efficacy and safety from UTPt and CMPd based drugs on peripheral neuropathies has already been studied. However, information regarding pharmacokinetics of UTPt and CMPd based drugs during pathological condition remains unknown. The aim of this study was to propose methodologies to quantify UTPt and CMPd in biological matrices, based on a systematic literature review. Concerning that the bioavailability of pyrimidines during peripheral neuropathies is different of observed in healthy volunteers, the available data regarding plasmatic levels of UTPt and CMPd should not be used to estimate the dose of UTPt and CMPd based drugs. Furthermore, to differentiate endogenous and exogenous pyrimidines in biological matrices the exogenous pyrimidines must be labeled with [3H] or [14C] before administration. Next, high-performance liquid chromatography (HPLC) has been the most applied technique for identification and quantitation of radiolabeled pyrimidines. We concluded that UTPt and CMPd radiolabelling, followed by chromatographic separation and detection by UV and liquid scintigraphy, is a feasible methodology for detection and quantitation of UTPt and CMPd derivatives in biological matrices.

Keywords: Uridine 5'-triphosphate trisodium. Cytidine 5'-monophosphate disodium. Biological matrices.

FIGURAS

Figura 1 -	Ilustração esquemática descrevendo as etapas do processo de degeneração walleriana	15
Figura 2 -	Via de resgate de nucleosídeos pirimidínicos	19
Figura 3 -	Interrelação entre as diferentes fontes de nucleotídeos pirimidínicos	20
Figura 4 -	Fórmula estrutural de uridina 5'- trifosfato trissódica	28
Figura 5 -	Fórmula estrutural de uridina 5'-monofosfato dissódica	29
Figura 6 -	Fórmula estrutural de citidina 5'-monofosfato dissódica	29
Figura 7 -	Um modelo para a homeostase sanguínea de uridina sob condições fisiológicas	35
Figura 8 -	Um modelo para a homeostase sanguínea de uridina sob condições de estresse tissular periférico, centrado no controle intrínseco hepático e controle sistêmico da taxa de transcrição genômica hepática da uridina fosforilase	37
Figura 9 -	Representação gráfica concentração x tempo de uridina plasmática, após ingestão de uridina	39
Figura 10 -	Bases nitrogenadas de uracila (A) e citosina (B), com respectivas especificidades de marcação por [³ H] assinaladas .	66
Figura 11 -	O átomo de Br na base nitrogenada pirimidínica de 5-bromouridina é trocado por [³ H]	68
Figura 12-	Substituição do radical de iodo na molécula de uma 5-iodopirimidina por [³ H], através de aquecimento	70

TABELAS

Tabela 1 -	Dosagens de pirimidinas medicamentosas administradas por via oral, em diferentes contextos	31
Tabela 2 -	Aspectos consolidados dos resultados da pesquisa bibliográfica	33
Tabela 3 -	Resultados do perfil plasmático e urinário de uridina	38
Tabela 4 -	Resultados farmacocinéticos referentes ao estudo descrito por Wurtman <i>et al.</i>	39
Tabela 5 -	Resultados consolidados de estudos em farmacocinética com uridina administrada por via oral em dose única a humanos	40
Tabela 6 -	Resultados de k para uridina e citidina, segundo o tipo de fase e pH respectivo	55
Tabela 7 -	Aspectos consolidados em desenvolvimento de métodos cromatográficos, com enfoque em efeitos de parâmetros selecionados sobre k e R_s de uridina e citidina	59
Tabela 8 -	Aspectos consolidados de métodos adotados em estudos de separação cromatográfica envolvendo pirimidinas	65

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

α : seletividade	$t_{1/2}$: tempo de meia-vida
ADP : adenosina 5'-difosfato	TBA : tetrabutílamônio fosfato
a.e. : atividade específica	t : tempo
AMP : adenosina 5'-monofosfato	t_{max} : tempo máximo
ATP : adenosina 5'-trifosfato	t_R : tempo de retenção
BASE : <i>Bielifeld Academic Search Engine</i>	Uck : uridina-citidina quinase
CAS : <i>Chemical Abstracts Service</i>	UDP : uridina 5'-difosfato
CD : citidina deaminase	UDPd : uridina 5'-difosfato dissódica
C_{max} : concentração máxima	UMP : uridina 5'-monofosfato
CMP : citidina 5'-monofosfato	UMP/CMPk : UMP/CMP quinase
CMPd : citidina 5'-monofosfato dissódica	UMPd : uridina 5'-monofosfato dissódica
cpm : contagens por minuto	UP : uridina fosforilase
CTP : citidina 5'-trifosfato	UTP : uridina 5'-trifosfato
CTPs : CTP sintetase	UTPt : uridina 5'-trifosfato trissódica
DMF : <i>Drug Master File</i>	UV : ultravioleta
DNA : <i>deoxyribonucleic acid</i>	v.o. : via oral
dps : decaimentos por segundo	v/v : vis-à-vis (de forma simultânea)
e.g. : <i>exemplia gratia</i> (por exemplo)	
Fig. : figura	
HPLC : Cromatografia líquida de alta performance	
i.e. : <i>id est</i> (isto é)	
INN : <i>International Non-proprietary Name</i>	
iP : <i>inorganic phosphate</i>	
k : fator de retenção	
K_m : constante de Michaelis-Menten	
LC-MS : <i>Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i>	
mIRNA : <i>messenger-like RNA</i>	
Mmc : 4-bromometil-7-metoxicumarina	
mRNA : RNA mensageiro	
MS : <i>Mass Spectrometry</i>	
N : normalidade (concentração equivalente)	
NI : não informado	
NT : 5'-nucleotidase	
NuS : nucleosidase	
ODS : octadecilsilano	
obs. : observação	
pK_{aa} : pH do meio no qual a substância perde seu primeiro próton	
pK_{ab} : pH do meio no qual a substância ganha seu primeiro próton	
ppv : partes por volume	
RNA : <i>ribonucleic acid</i>	
RPC : cromatografia de fase reversa	
rRNA : RNA ribossômico	
R_g : resolução	
SCN : núcleo supraquiasmático	

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	13
1	REVISÃO DA LITERATURA	14
1.1	Neuropatias periféricas traumato-compressivas	14
1.2	Fisiologia das pirimidinas	17
1.2.1	<u>Origem bioquímica das pirimidinas</u>	18
1.2.2	<u>Origem digestiva das pirimidinas</u>	20
1.2.3	<u>Transporte sanguíneo de pirimidinas</u>	20
1.2.4	<u>Importância do suprimento fisiológico de pirimidinas prontas aos tecidos periféricos</u>	21
1.3	Farmacodinâmica de pirimidinas em neuropatias periféricas ...	24
2	JUSTIFICATIVA	25
3	OBJETIVOS	25
3.1	Objetivo geral	25
3.2	Objetivos específicos	26
4	METODOLOGIA	26
4.1	Palavras-chave	26
4.2	Configuração de pesquisa	26
4.3	Fontes de busca	27
5	RESULTADOS DA PESQUISA BIBLIOGRÁFICA	27
5.1	Caracterização do material de estudo	27
5.1.1	<u>Fármacos contidos no Etna[®]</u>	27
5.1.2	<u>Dosagens praticadas com pirimidinas medicamentosas administradas por via oral</u>	29
5.2	Fontes literárias selecionadas	33
5.3	O estudo da farmacocinética dos nucleotídeos deve ser dividido em condições fisiológicas e patológicas	34
5.3.1	<u>Homeostasia de pirimidinas em condições fisiológicas</u>	34
5.3.2	<u>Homeostasia de pirimidinas em condições patológicas</u>	37
5.4	Achados de farmacocinética na literatura com pirimidinas administradas por via oral	38

5.5	Modelos farmacocinéticos de uridina 5'-trifosfato trissódica e citidina 5'-monofosfato dissódica administradas por via oral em condições basais e de estresse tissular periférico	40
5.5.1	<u>Modelos de uridina 5'-trifosfato trissódica</u>	40
5.5.2	<u>Modelos de citidina 5'-monofosfato dissódica</u>	41
5.5.3	<u>Racionalidade da associação de dose fixa de uridina 5'-monofosfato dissódica e citidina 5'-monofosfato dissódica baseada nos modelos farmacocinéticos propostos</u>	42
5.6	Cromatografia líquida de alta performance e pirimidinas	43
5.6.1	<u>Características da cromatografia líquida de alta performance no estudo de pirimidinas</u>	43
5.6.2	<u>Cromatografia líquida de alta performance em estudos em geral envolvendo separação de pirimidinas em matriz biológica</u>	61
5.7	Técnicas radioisotópicas e pirimidinas	66
5.7.1	<u>Características das técnicas radioisotópicas no estudo de pirimidinas</u>	66
5.7.2	<u>Métodos cromatográficos em estudos em geral envolvendo pirimidinas radiomarcadas</u>	72
6	CONCLUSÃO	75
7	REFERÊNCIAS	81

INTRODUÇÃO

Nucleotídeos são ésteres fosforilados de nucleosídeos, representando subunidades de ácidos nucleicos. Correspondem a uma das principais classes de biomoléculas, apresentando como funções: composição do ácido desoxiribonucleico (DNA) e ácido ribonucleico (RNA); síntese de membrana celular, de glicoproteínas, do glicogênio e da bainha de mielina; transporte e conservação de energia [(adenosina 5'-trifosfato (ATP))]; componentes de alguns co-fatores enzimáticos; e sinalização química celular (ALBERTS, 2008; CARVER, 1995; CONNOLLY, 1999; HIGGINS, 2007; VOET, 2013). Os nucleotídeos são compostos por uma base nitrogenada, um grupo fosfato e uma pentose (ribose ou desoxirribose). As bases nitrogenadas, por sua vez são classificadas como purínicas ou pirimidínicas. São tidas como bases purínicas adenina (A) e guanina (G) e as pirimidínicas citosina (C), uracila (U) e timina (T) (VOET, 2013).

Nucleotídeos pirimidínicos de citosina e uracila são moléculas utilizadas como modelos na síntese química de uma série de fármacos, tais como antivirais (e.g., cidofovir) e antimetabólitos (e.g., 5-fluorouracila) (BRUNTON, 2011; TOWNSEND, 1994). A associação de dois nucleotídeos pirimidínicos - uridina 5'-trifosfato trissódica (UTPd) e citidina 5'-monofosfato dissódica (CMPd) (associadamente a hidroxocobalamina) - é regularmente comercializada no Brasil, com indicação em distúrbios neurais periféricos do tipo traumato-compressivos. Esta forma específica de neuropatia periférica é caracterizada do ponto de vista etiopatogênico por agravo mecânico direto sobre o nervo periférico ou plexos nervosos que os originam, seguido por desintegração estrutural local e anterógrada ao trajeto do nervo. Muito embora sua abordagem terapêutica esteja bem definida sob os aspectos cirúrgico e analgésico, a disponibilização de substâncias e/ou procedimentos que auxiliem os processos neuroregenerativos periféricos subsequentes à lesão inicial permanece limitada. Nucleotídeos pirimidínicos são uma das únicas classes medicamentosas que têm exibido evidência em nível biológico e clínico, no que concerne ao suporte efetivo em neuroregeneração periférica.

Todavia, a despeito deste último aspecto, sabemos que o conhecimento acerca das propriedades farmacocinéticas dos nucleotídeos pirimidínicos permanece escassamente descrito. Tal limitação prejudica o avanço de seu desenvolvimento

como classe medicamentosa útil em neuropatias periféricas traumato-compressivas. O objetivo geral desta dissertação é identificar metodologias para a mensuração de nucleotídeos pirimidínicos em matriz biológica após a administração de uridina trifosfato trissódica (UTPt) e citidina monofosfato dissódica (CMPd).

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Neuropatias periféricas traumato-compressivas

Neuropatias periféricas correspondem a um termo que engloba todos os agravos que atingem os nervos periféricos espinhais (os que se originam da medula vertebral), os nervos craneanos (os que se originam diretamente do cérebro e tronco cerebral) e seus gânglios sensitivos (SUNDERLAND, 1978). Neuropatias periféricas traumato-compressivas são causadas por agentes que exercem pressão mecânica extrínseca sobre um nervo periférico. As neuropatias traumato-compressivas podem ser divididas em três tipos, de acordo com o nível de gravidade da lesão (classificação de Seddon) (TATAGIBA, 2003):

- neuropraxia

Caracterizada por um bloqueio temporário da condução do impulso neural axonal. Tanto o axônio como a célula de Schwann (célula mesenquimatosa que produz a bainha de mielina) mantêm-se estruturalmente íntegros.

- axonotmese

Caracterizada por desintegração axonal no ponto da lesão e daí distalmente. A célula de Schwann mantêm-se estruturalmente íntegra, muito embora suas correspondentes mais distais devam sofrer mudanças metaplásicas.

- neurotmese

Caracterizada por secção completa no nervo periférico em um coto proximal e um coto distal.

Sob o aspecto histopatológico, as neuropatias periféricas traumato-compressivas são caracterizadas principalmente pela degeneração walleriana. Trata-se na verdade de um processo degenerativo-regenerativo do nervo periférico lesionado, que consiste cronologicamente dos seguintes elementos:

(1) desintegração estrutural do axônio e da célula de Schwann no ponto da lesão, (2) desintegração anterógrada do axônio até seu receptor sensitivo ou terminação nervosa, no caso de nervo periférico sensitivo ou motor, respectivamente, (3) despregamento da célula de Schwann de sua bainha de mielina que envolve o axônio, (4) fagocitose dos debrís axonais e mielínicos pela própria célula de Schwann, com formação de um 'túnel' denominado feixe de Bungner, (5) progressão de um cone axonal (cone regenerativo) através do ponto de lesão, passando ao longo do feixe de Bungner, com remielinização pelas células de Schwann que o revestem e (6) chegada do cone regenerativo ao seu receptor sensitivo ou terminação nervosa (BIRCH, 2013; SUNDERLAND, 1978). As etapas do processo descrito acima estão ilustradas na Fig. 1.

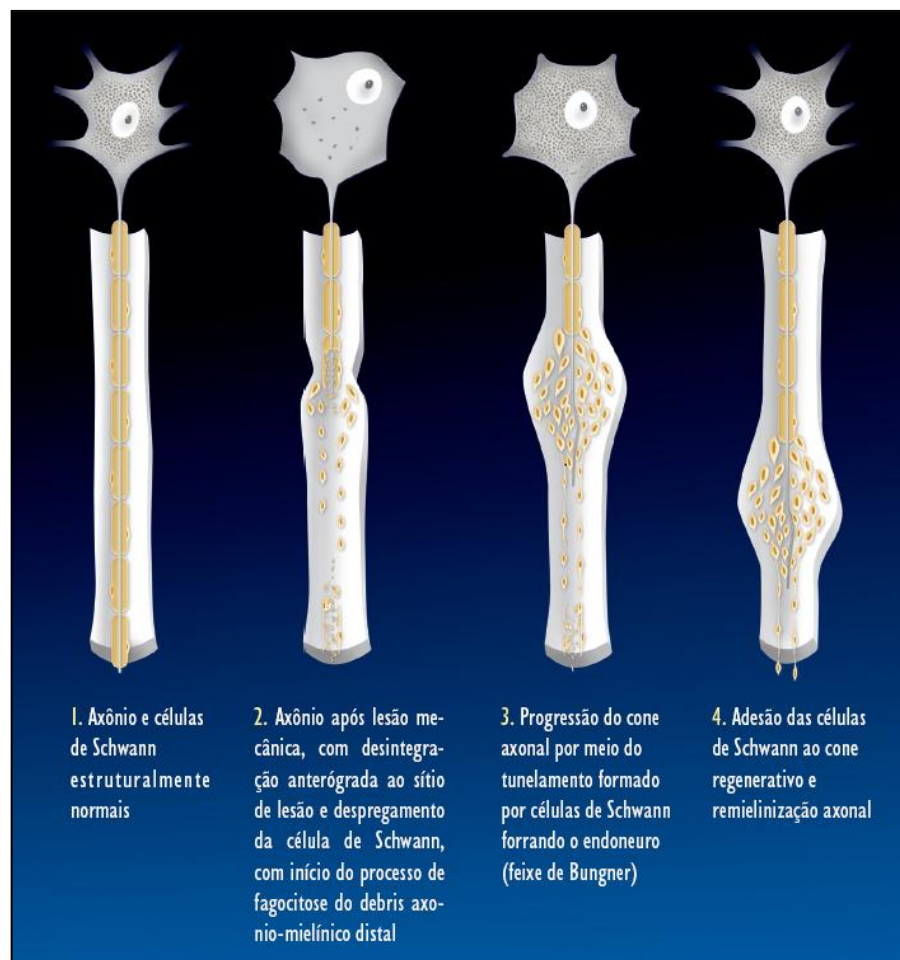


Fig. 1: Ilustração esquemática descrevendo as etapas do processo de degeneração walleriana (baseado em MESCHER, 2013).

Aspectos citopatológicos das neuropatias periféricas - com enfoque em metabolismo pirimidínico - foram demonstrados através de estudos experimentais de

seccionamento de nervo hipoglosso e nervo vago de ratos, seguido de acompanhamento das alterações evolutivas de corpos neuronais em gânglios sensitivos respectivos. Seus autores descreveram achados sugestivos de um padrão cronológico de resposta celular nucleosídica e nucleotídica, que pode ser resumido da seguinte forma (KAYE, 1977; LANGFORD, 1980; SJÖRBERG, 1987):

- Dia 1(D1) a D2: (1) aumento da captação neuronal de uridina e citidina, (2) aumento da incorporação de precursores do RNA ribossômico (rRNA) (uridina e citidina), (3) picos de concentração do rRNA, (4) alterações na distribuição celular do *messenger-like* RNA (mlRNA) [precursor do RNA mensageiro (mRNA)], (5) aumento sustentado da síntese de RNA até D3, (6) aumento da síntese de DNA, (7) aumento máximo da incorporação de fosfato a uridina 5'-trifosfato (UTP), citidina 5'-trifosfato (CTP) e adenosina 5'-difosfato (ADP), persistindo até o D8, (8) aumento da síntese da ribose nucleotídica e (9) aumento da taxa de transferência do RNA do núcleo para o citoplasma
- D3: (1) aumento da incorporação de citidina e de uridina ao RNA e (2) taxas de incorporação máxima de uridina e de citidina ao rRNA
- D4: início do aumento do RNA celular
- D7: normalização da taxa de incorporação de precursores do rRNA
- D14: (1) aumento da hetero-dispersão (dispersão com partículas de diâmetro diferentes) do mlRNA, (2) diminuição da concentração do rRNA e (3) retorno aos níveis basais do mRNA
- D20: atividade de síntese máxima do RNA celular
- D70: redução da taxa de síntese ribossômica

Estes autores também sugeriram ter havido um sincronismo entre estas alterações moleculares nucleotídicas e a regeneração citológica neuronal.

Não há dados epidemiológicos oficiais acerca das neuropatias periféricas traumato-compressivas na literatura, existindo apenas alguns relatos de incidência deste tipo de agravo em estudos específicos. Solino *et al.* analisaram uma população de 240 pacientes portadores de 154 fraturas, 44 luxações e 75 fraturas-luxações de coluna vertebral. Embora os autores não citem distúrbios neurais periféricos em seu trabalho, infere-se que a estreita relação estrutural entre coluna vertebral e nervos periféricos possa ter levado a um risco equivalente de lesão a

estes últimos (SOLINO, 1990). Em uma análise retrospectiva, Labrocini *et al.* identificaram 5 indivíduos de uma amostra de 255 pacientes que sofreram fratura clavicular, nos quais o agravo foi seguido de queixa de parestesia no aspecto anterior do tórax. Os autores associaram o sintoma a lesão secundária do nervo supraclavicular e/ou de seus ramos (LABROCINI, 2013).

Os distúrbios traumato-compressivos nos nervos periféricos somáticos (funcionalmente correspondentes ao sistema nervoso voluntário) são caracterizados por sintomatologia importante, abrangendo queixas de dor neuropática, causalgia (sensação de queimação), alodinia (dor neuropática sem sensibilidade superficial), insuficiência motora (paralisia parcial) e plegia (paralisia total) do grupo muscular inervado respectivo. O tipo de manifestação irá depender do nervo acometido, i.e., sensitivo, motor ou misto. O diagnóstico de uma neuropatia periférica traumato-compressiva é realizado através do quadro clínico, exames imagiológicos (tomografia computadorizada, ressonância magnética nuclear) e eletroneuromiografia (BIRCH, 2013; TATAGIBA, 2003).

As formas de terapia existentes na abordagem das neuropatias periféricas traumato-compressivas são diversas, e sua escolha irá depender do grau de severidade da lesão, queixas sintomáticas e prognóstico. São elas: (1) medicamentosas sintomáticas (antidepressivos, anticonvulsivantes, opióides), (2) fisioterapia sensitiva e motora, (3) cirurgia visando reconstrução do nervo periférico lesado e remoção do agente compressivo extrínseco e (4) neuroregeneradores periféricos (nucleotídeos pirimidínicos, gangliosídeos). Tais modalidades poderão ser adotadas de forma individual ou em associação (TATAGIBA, 2003).

1.2 Fisiologia das pirimidinas

Nucleotídeos e nucleosídeos são parte da fisiologia humana normal. Não obstante, diferentemente de xenobióticos, os quais destinam-se a ser eliminados do organismo, substâncias endógenas administradas exogenamente tendem a ser processadas como elementos que pertencem à fisiologia normal. Desta forma, mecanismos homeostáticos atuam não para excretá-las, mas para trazê-las de volta aos seus níveis 'normais' (DISSANAYAKE, 2010; MARZO, 1992). Portanto, faz-se

necessário compreender seu processamento biológico, antes de abordá-las como uma classe medicamentosa.

1.2.1 Origem bioquímica das pirimidinas

Os nucleotídeos pirimidínicos podem ser formados através de três mecanismos diferentes, porém correlacionados:

- *Síntese de novo*

A *síntese de novo* de nucleotídeos pirimidínicos ocorre a partir de precursores primários, tais como glutamina e bicarbonato. Apresenta 11 etapas enzimáticas, terminando com os nucleotídeos UTP e CTP, sendo metabolicamente custosa à célula (VOET, 2013).

- *Via de resgate*

Via metabólica responsável pelos seguintes fenômenos: (1) integração de nucleosídeos sanguíneos sintetizados e exportados para células periféricas especificamente para este propósito, (2) integração metabólica de pirimidinas absorvidas de fontes dietéticas e (3) reciclagem celular de pirimidinas pré-formadas catabolisadas. Por ser especialmente importante na compreensão da farmacologia de nucleotídeos pirimidínicos, detalhamos a via de resgate na Fig. 2.

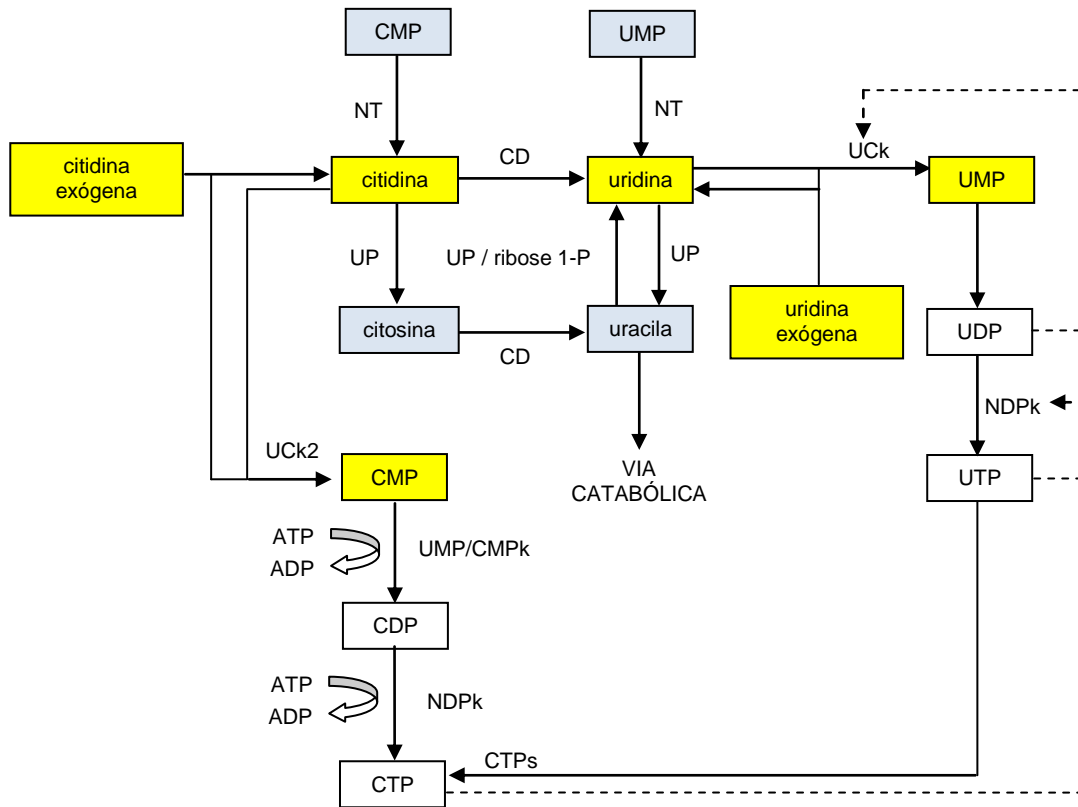


Fig. 2: Via de resgate de nucleosídeos pirimidínicos (caixas amarelas). Setas tracejadas representam inibição alostérica enzimática. As caixas brancas referem-se à via *de novo* pirimidínica; caixas azuis referem-se à via catabólica [BISSONNETTE, 1992; CARVER, 1985; MOYER, 1985(b); RUDOLPH, 1994; VOET, 2013; YAMAMOTO, 2011]. ADP: adenosina 5'-difosfato; ATP: adenosina 5'-trifosfato; CD: citidina deaminase; CMP: citidina 5'-monofosfato; CTPs: CTP sintetase; NDPk: nucleosídeo difosfato quinase; NT: 5'-nucleotidase; ribose 1-P: ribose 1-fosfato; UCK: uridina citidina quinase; UDP: uridina 5'-difosfato; UMP: uridina 5'-monofosfato; UMP/CMPk: UMP/CMP quinase; UP: uridina fosforilase.

- Interconversão entre diferentes nucleosídeos pirimidínicos
 Ocorre através da conversão de citidina em uridina pela citidina deaminase (CD), na via de resgate (Fig. 2).

As complexas relações entre estas diferentes fontes estão resumidas na Fig. 3.

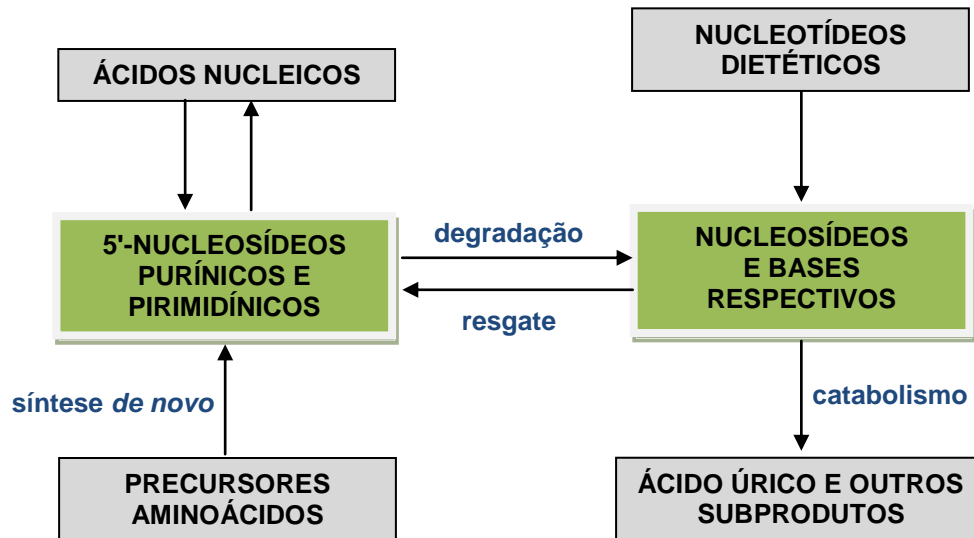


Fig. 3: Interrelação entre as diferentes fontes de nucleotídeos pirimidínicos (baseado em RUDOLPH, 1994).

1.2.2 Origem digestiva das pirimidinas

Ácidos nucleicos polinucleotídicos dietéticos são primeiramente dissociados por ribonucleases e desoxiribonucleases pancreáticas específicas em uma mistura de di-, tri e polinucleotídeos. Polinucleotidases ou fosfodiesterases intestinais complementam este processo reduzindo di- ou trinucleotídeos a mononucleotídeos os quais, por sua vez, são dissociados por 5'-nucleotidases e fosfatases alcalinas inespecíficas a mononucleosídeos e fosfato inorgânico (iP). Mononucleosídeos no intestino delgado proximal são destinados a absorção (CARVER, 1995; SANCHÉZ-POZO, 2002; WILSON, 1958). Alternativamente, nucleosídeos podem ser posteriormente catabolisados em base nitrogenada e ribose, ou em base nitrogenada e ribose-1P por uma nucleosidase (NuS) e uma pirimidino-nucleosídeo fosforilase, respectivamente (RUDOLPH, 1994; RUDOLPH, 1998).

1.2.3 Transporte sanguíneo de pirimidinas

Após absorvidas, pirimidinas são distribuídas através do sangue para as células periféricas. Neste ponto, as pirimidinas são captadas (i.e., resgatadas) para fosforilação em ácidos nucleicos pirimidínicos (YAMAMOTO, 2011). Sua concentração no plasma (3 a 5 μM) e em células é influenciada por: (1) equilíbrio entre síntese *de novo*, de resgate e de catabolismo de pirimidinas nos tecidos, (2) taxa de internalização de células periféricas para a via de resgate, (3) ingestão

dietética, (4) concentração eritrocitária, (5) síntese *de novo* de células sanguíneas nucleadas, (6) flora intestinal e (7) circadianismo. As pirimidinas plasmáticas são quase totalmente eliminadas em uma única passagem através do fígado, sendo substituídas de maneira regulada pela síntese hepática *de novo* de pirimidinas (CONNOLLY, 1999; DARNOWSKI, 1986; KARLE, 1980; MONKS, 1982; PIZZORNO, 2002; TRAUT, 1994; TSENG, 1971; YAMAMOTO, 2011).

1.2.4 Importância do suprimento fisiológico de pirimidinas prontas aos tecidos periféricos

A síntese *de novo* de pirimidinas é intensa em tecidos com taxas elevadas de *turnover* celular, tais como o epitélio intestinal, pele, sistema imune e medula óssea hematopoiética. Assumindo que a diminuição do custo metabólico deste tipo de síntese pode ser particularmente desejável à economia destas células, especialmente em condições de replicatividade acelerada (e.g., infecções, anemia aguda), compreende-se o motivo de estas populações celulares também serem capazes de incorporar pirimidinas providas por outras fontes (CARVER, 1995; HIGGINS, 2007; PIZZORNO, 2002; RUDOLPH, 1994; RUDOLPH, 1998; SÁNCHEZ-POZO, 2002, WEISSMAN, 1963). Tais fontes seriam representadas pela dieta e pela síntese *de novo* hepática (especialmente pela segunda - veja adiante), sendo as pirimidinas produzidas por essa última transportadas aos tecidos por via sanguínea e incorporadas através da via de resgate (RUDOLPH, 1994; RUDOLPH, 1998; WEISSMAN, 1963; YAMAMOTO, 2011).

No que tange a tecidos com baixo ou nenhum *turnover* replicativo, a síntese *de novo* pirimidínica própria não parece provê-las de forma suficiente, em seu estado basal (BALESTRI, 2007; CONNOLLY, 1999). Esta afirmativa se baseia na premissa de que tais células não devam 'investir' em um maquinário metabólico replicativo custoso, tal como aquele relacionado à síntese *de novo* de pirimidinas, suprindo-se destas substâncias também através da via de resgate (BALESTRI, 2007; FOG, 1992; SÁNCHEZ-POZO, 2002). No caso de neurônios, a proposição acima é apoiada pela existência de sistemas específicos de transporte de nucleosídeos, tanto na barreira hematoencefálica quanto na membrana celular neuronal (CORNFORD, 1975; FOG, 1992; JOHNSTON, 1989; SPECTOR, 1982; SPECTOR, 1985).

Como afirmado anteriormente, as necessidades nucleosídicas de diferentes tecidos podem ser satisfeitas tanto pela sua própria síntese *de novo* como pela integração metabólica de nucleosídeos pré-formados oriundos da circulação, através da via de resgate. Nesta última condição, o fígado deverá ser o principal fornecedor de nucleosídeos pirimidínicos pré-formados, sintetizados *de novo* para este propósito. Efetivamente, a maior parte das pirimidinas exportadas pelo fígado origina-se da síntese hepática *de novo*, sob condições fisiológicas. A elevada capacidade hepática para a síntese pirimidínica *de novo* pode ser exemplificada pela subregulação da síntese de transportador de concentração nucleosídico 1 que ocorre em hepatócitos, quando há uma diminuição da ingestão dietética de nucleosídeos: assumindo que uma diminuição do fornecimento externo destes últimos eventualmente prevalece, a síntese dos respectivos carreadores de membrana celular não seria mais necessária, devido ao fato de que a síntese *de novo* asseguraria plenamente o suprimento de pirimidinas. Entretanto, em uma afirmativa aparentemente conflitante, Sánchez-Pozo *et al.* relatam que os níveis de nucleotídeos pirimidínicos de hepatócitos em repouso são particularmente susceptíveis à restrição dietética (BERLIN, 1975; JONES, 1980; LEVINE, 1974; RUDOLPH, 1994; RUDOLPH, 1998; SÁNCHEZ-POZO, 2002).

Apesar de o catabolismo pirimidínico ocorrer em todas as células do corpo, o fígado é considerado como o sítio primário deste fenômeno. A dihidroxiuracil desidrogenase, uma enzima limitadora de velocidade neste processo, está presente principalmente neste órgão (GASSER, 1981; LEVINE, 1994; MONKS, 1982; MOYER, 1981). A degradação de diidroureicila a beta-alanina, catalizada pela dihidropirimidinase e beta-ureidopropionase, também ocorre mais intensamente no fígado (GASSER, 1981; RUDOLPH, 1998).

A liberação de nucleosídeos a partir do fígado ocorre em uma taxa constante, sendo não obstante influenciada pelos seguintes fatores: (1) concentração de nucleotídeos monofosfato em hepatócitos, (2) atividade hepatocitária fosforilante [e.g., uridina-citidina quinase (UCK)] e desfosforilante (e.g., 5'-nucleotidase), e (3) concentração plasmática de uridina (MONKS, 1982; MOYER, 1981). O controle homeostático de uridina plasmática parece estar centralizado neste órgão, de forma similar ao controle da glicemia (GASSER 1981; MONKS, 1982; PIZZORNO, 2002). Este controle seria exercido através dos seguintes mecanismos:

- atividade de UP

A influência da uridina fosforilase (UP) hepática sobre a concentração plasmática de uridina é demonstrada pelos resultados de dois experimentos: (1) os níveis de uridina hepático e plasmático em camundongos diminuíram de 1,53 a 0,08 μM , e de 6,45 μM a 0,5 μM , respectivamente, através de superexpressão da UP em 25 vezes (LE, 2013), e (2) os níveis plasmáticos e hepáticos de uridina aumentaram seis vezes e de duas a três vezes, respectivamente, em um modelo gênico UPase $-/-$ de camundongo (CAO, 2005).

- atividade de UCK

A atividade de UCK hepática se eleva com o aumento dos níveis de uridina neste órgão. Pode-se concluir que esta enzima influencia a concentração de uridina plasmática, juntamente com UP (CAO, 2005). Entretanto, a UP provalmente prevalece sobre UCK: enquanto esta última é sujeita à inibição alostérica por uridina 5'-difosfato (UDP), UTP e CTP, UP não é sujeita a controle alostérico (DARNOWSKI, 1986).

- circadianismo hepático

O circadianismo hepático é orquestrado por uma complexa relação entre os seguintes fatores: (1) ciclicização circadiana própria de células somáticas e hepatocitárias, (2) ciclos alimentares e (3) influência do núcleo supraquiasmático (SCN) sobre a função hepática, determinada pela luz ou pela ausência de luz. De acordo com Davidson *et al.*, os últimos dois fatores influenciam a taxa de transcrição genômica do fígado (DAVIDSON, 2004). Especificamente em relação ao SCN, a influência sobre a função hepática seria exercida por hormônios, metabólitos e modulação da temperatura corporal (KORNMAN, 2007). De forma interessante, a uridina administrada exogenamente foi associada a febre e calafrios em estudos farmacocinéticos humanos (LEYVA, 1984; VAN GROENINGEN, 1986; VAN GROENINGEN, 1991). O circadianismo de uridina em camundongos foi demonstrado por El Kouni *et al.* (EL KOUNI, 1990). Com o objetivo de medir a influência do ritmo circadiano sobre a atividade de UP hepática, estes autores alimentaram uma amostra de camundongos com uma dieta contendo $[2-^{14}\text{C}]$ uridina, mantendo-a durante esquemas de 12 h de luz (8:00 às 18:00 h)

e 12 h de escuridão (18:00 às 6:00 h). O pico de atividade de UP ocorreu às 21:00 h, com um nadir às 9:00 h. A concentração plasmática de uridina também mostrou um ritmo circadiano, com concentrações de pico (10 μM) às 8:00 h e de nadir (5 μM) às 20:00 h, valores inversamente proporcionais à atividade de UP.

1.3 Farmacodinâmica de pirimidinas em neuropatias periféricas

Os mecanismos de ação das pirimidinas uridina 5'-trifosfato dissódica (UTPd) e citidina 5'-monofosfato dissódica (CMPd) nas neuropatias traumato-compressivas se dão no âmbito do processo de degeneração walleriana. Basicamente seus derivados se integrariam a vias metabólicas de síntese neuronais e gliais, além de modificar a biologia destas células através do estímulo a receptores de membrana celular. Seus efeitos são, resumidamente:

- aumento da síntese protéica neuronal (CANSEV, 2005; FOG, 1992; NEARY, 1996; PIZZORNO, 2002; POOLER, 2005; SILEI, 2000; WANG, 2005)
- aumento da síntese de membrana celular neuronal [CANSEV, 2006; CANSEV, 2007; G-COVIELLA, 1992; NEARY, 1996; POOLER, 2005; WANG, 2005; WANG, 2007; WATKINS, 2012; WURTMAN, 2006(a); WURTMAN, 2006(b); WURTMAN, 2012]
- aumento da síntese da bainha de mielina da célula de Schwann [WATTIG, 1992(a)]
- aumento da síntese de proteínas de adesão da célula de Schwann-neurônio / reorganização do citoesqueleto da célula de Schwann (CANALES, 2011; MARTIÁÑEZ, 2012; MARTIÁÑEZ, 2013; NEARY, 1996)
- promoção da migração de célula de Schwann (DAMS, 2013; LAMARCA, 2014)

Como detalhado na Seção 1.2.4, a síntese *de novo* de pirimidinas em neurônios não os supriria de forma suficiente. Espera-se portanto que estas células apresentem compensatoriamente uma taxa de transporte de membrana celular elevada, bem como uma via de resgate para nucleosídeos pirimidínicos altamente funcional. Como visto na Seção 1.1, há efetivamente um aumento da incorporação de nucleosídeos exógenos pelo corpo neuronal após lesão no trajeto do nervo

periférico, representando uma possível exacerbação dos mecanismos de transporte e resgate citados acima. Este aumento reativo da captabilidade celular pirimidínica poderia portanto ser aproveitado pela suplementação medicamentosa com os derivados destas substâncias (i.e., uridina e citidina).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo desta dissertação é propor metodologias para a quantificação de UTPt e CMPd e derivados em matriz biológica, de acordo com informações da literatura.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar levantamento bibliográfico com palavras-chaves previamente identificadas;
- Classificar as informações obtidas a partir da revisão da literatura;
- Identificar técnica(s) para quantificar pirimidinas em matriz biológica
- Propor modelos de farmacocinética relacionados a administração oral de UTPd e CMPd.

3 METODOLOGIA

Uma revisão abrangente da literatura foi realizada, de acordo com os parâmetros enumerados a seguir.

3.1 Palavras-chave

As palavras-chave eleitas foram (com termos em Português correspondentes para as bases de dados brasileiras): ^{14}C , ^3H , *blood*, *capillary electrophoresis*, *chromatographic*, *chromatography*, CMP, CMPd, *cytidine monophosphate*, *cytidine*, HPLC, *liquid chromatography*, *mass spectrometry*, *nucleoside*, *nucleosides*, *peripheral nerve*, *pharmacokinetics*, *plasma*, *pyrimidine*, *pyrimidines*, *radioisotopes*,

radiolabelled, radiolabelling, radionuclides, serum, tritium, UMP, UMPd, uridine monophosphate disodium, uridine monophosphate, uridine triphosphate trisodium, uridine triphosphate, uridine, UTP e UTPd.

3.2 Configuração de pesquisa

A configuração de pesquisa adotada foi: (1) palavra-chave no título, (2) palavras-chave no título, em padrão combinatório, (3) palavras-chave no título e no sumário, em padrão combinatório e alternante, (4) nome do primeiro autor (trabalhos encontrados) e palavras-chave no título em padrão combinatório, (5) nome do último autor (trabalhos encontrados) e palavras-chave no título em padrão combinatório, (6) literatura em Inglês, Português, Alemão, Chinês e Russo (para os três últimos idiomas foram utilizados apenas os sumários), (7) sem limite de data de publicação e (8) espécies de mamífero.

3.3 Fontes de busca

As fontes pesquisadas foram: (1) Biblioteca Digital Brasileira de Teses e Dissertações, (2) *drug master file* (DMF) de CMPd, (3) DMF de uridina monofosfato dissódica (UMPd), (4) DMF de UTPt, (5) *European Patents Office*, (6) *Google Patents*, (7) *Google Scholar*, (8) Instituto Nacional de Propriedade Industrial, (9) Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde, (10) livrarias *online*, (11) *Networked Digital Library of Theses and Dissertations* (incluídas as bases BASE, DiVA, ETLOS, National ETD Portal, Trove, Repositório Científico de Acesso Aberto de Portugal e VTLS), (12) Pubmed, (13) referências de trabalhos selecionados, (14) Scifinder, (15) Thomson-Reuters Integrity, (16) *United States Patent and Trademark Office*, (17) *Web of Science*, (18) website da companhia Sigma-Aldrich, (19) *World Industrial Property Organization* e (20) websites .edu.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização do material de estudo

4.1.1 Fármacos contidos no Etna[®]

O medicamento objeto deste estudo foi o Etna[®], que é composto pelos nucleotídeos pirimidínicos uridina 5'-trifosfato trissódica (UTPt) e citidina 5'-monofosfato dissódica (CMPd).

4.1.1.1 Uridina 5'-trifosfato trissódica

UTPt pode tanto ser sintetizada quimicamente como extraída de colônias de levedura, apresentando o seguinte perfil químico - (1) *international non-proprietary name* (INN): *5'-uridine triphosphate trisodium salt*, (2) nomenclatura química: *trisodium 5'-O-[[[(hydroxyphosphinate)oxy]phosphinate]oxy]phosphinate] uridine*, (3) número de registro *Chemical Abstracts Service* (CAS): 19817-92-6, (4) fórmula molecular: $C_9H_{12}O_{15}N_2P_3Na_3$ e (5) peso molecular: 550,2 [SIGMA-ALDRICH, 2014(a); THE COMMON TECHNICAL DOCUMENT, 2013(a)]. A fórmula estrutural de UTPt está apresentada na Fig. 4.

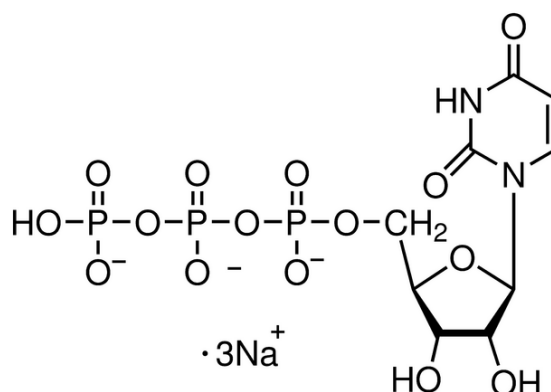


Fig. 4: Fórmula estrutural de uridina 5'-trifosfato trissódica [SIGMA-ALDRICH, 2014(a)].

Durante o seu processamento industrial até o encapsulamento, UTPt é progressivamente hidrolisada a uridina difosfato dissódica (UDPd) e finalmente UMPd. Assumindo que UTPt é rapidamente hidrolisada a uridina 5'-monofosfato (UMP) no tubo digestivo, antes da etapa de absorção, não se espera que haja diferenças entre UTPt e UMPd, sob o aspecto farmacológico. Há efetivamente um estudo farmacocinético em humanos com UMPd (WURTMAN, 2012), um DMF sobre

UMPd (FDA Drug Master File for UMPNa₂, 2010) e uma marca comercial espanhola (Nucleo CMP Forte) que contém UMPd em sua composição (MARTINDALE, 2011). UMPd será portanto também descrita nesta dissertação.

UMPd apresenta o seguinte perfil químico geral - (1) INN: *uridine-5'-monophosphate, disodium salt; disodium uridine-5'-monophosphate* (UMPNa₂), (2) fórmula molecular: C₉H₁₁N₂O₉PNa₂, (3) número de registro CAS: 3387-36-8 e (4) peso molecular: 368,15 (FDA Drug Master File for UMPNa₂, 2010). A fórmula estrutural de UMPd está apresentada na Fig. 5 [SIGMA-ALDRICH, 2014(b)].

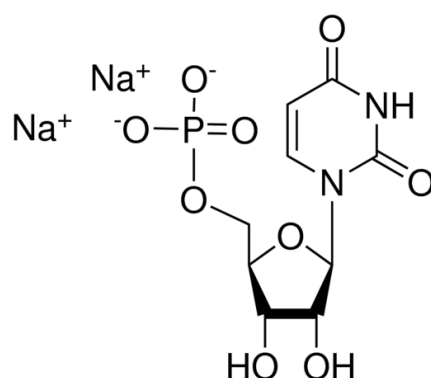


Fig. 5: Fórmula estrutural de uridina 5'-monofosfato dissódica [SIGMA-ALDRICH, 2014(b)].

4.1.1.2 Citidina 5'-monofosfato dissódica

CMPd é sintetizada quimicamente, apresentando o seguinte perfil químico geral - (1) INN: *cytidine 5'-monophosphate disodium salt*, (2) número de registro CAS: 6757-06-8, (3) fórmula molecular: C₉H₁₂N₃O₈PNa₂ e (4) peso molecular: 367,16 [SIGMA-ALDRICH, 2014(c); THE COMMON TECHNICAL DOCUMENT, 2013(b)]. A fórmula estrutural de CMPd está apresentada na Fig. 6.

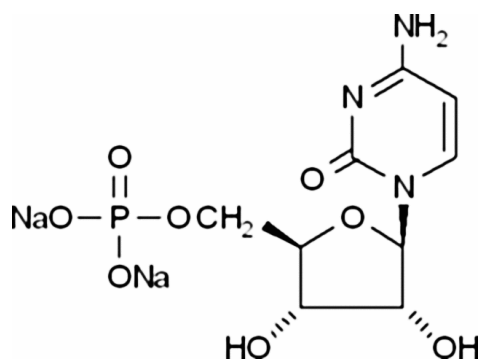


Fig. 6: Fórmula estrutural de citidina 5'-monofosfato dissódica [SIGMA-ALDRICH, 2014(c)].

4.1.2 Dosagens praticadas com pirimidinas medicamentosas administradas por via oral

A Tabela 1 resume algumas dosagens de pirimidinas medicamentosas administradas por via oral (v.o.), em diferentes contextos. Sabemos que existem estudos de farmacocinética propriamente dita bem sucedidos com pirimidinas administradas por v.o. (VAN GROENINGEN, 1991; YAMAMOTO, 2002; WURTMAN, 2012). Todavia, nota-se que a ampla faixa de concentrações adotadas [1,5 mg (UTPt) a 50.000 mg (uridina)], bem como a ausência de justificativa para as concentrações escolhidas, apontam para um conhecimento insuficiente acerca da farmacocinética destas substâncias em seres humanos.

Tabela 1: Dosagens de pirimidinas medicamentosas administradas por via oral, em diferentes contextos (cont.).

FONTE	FÁRMACO	DOSAGENS	CONTEXTO
GOLDBERG, 2009	UTPt e CMPd (tomada única)	3,0 mg e 5,0 mg, respectivamente	Estudo clínico
LAURETTI, 2002	UTPt e CMPd (tomada única)	1,5 mg e 2,5 mg, respectivamente	Estudo clínico
LAURETTI, 2004	UTPt e CMPd (tomada única)	1,5 mg e 2,5 mg, respectivamente	Estudo clínico
LAURETTI, 2005	UTPt e CMPd (tomada única)	1,5 mg e 2,5 mg, respectivamente	Estudo clínico
LIMA, 2009	UTPt e CMPd (tomada única)	1,5 mg e 2,5 mg, respectivamente	Estudo clínico
MIBIELLI, 2010	UTP e CMPd (tomada única)	3,0 mg e 5,0 mg, respectivamente	Estudo clínico
VAN GROENINGEN, 1991	Uridina (tomada única)	300 a 12.000 mg/m ²	Estudo farmacocinético
VAN GROENINGEN, 1993	Uridina (tomada única)	5 g/m ²	Estudo farmacocinético
WATKINS, 2012	Uridina; derivado metabólico ou precursor de uridina (dosagem diária)	5 mg a 5000 mg 5 mg a 50.000 mg 20 mg a 50.000 mg 50 mg a 30.000 mg 75 mg a 20.000 mg 100 mg a 20.000 mg 200 mg a 8000 mg 400 mg a 6000 mg 600 mg a 4000 mg 800 mg a 3000 mg 1.000 mg a 2500 mg 1.500 mg a 2000 mg	Patente de uridina como fármaco estimulador da produção de membranas celulares

Tabela 1 (cont.): Dosagens de pirimidinas medicamentosas administradas por via oral, em diferentes contextos.

FONTE	FÁRMACO	DOSAGENS	CONTEXTO
WEINBERG, 2011	Uridina (tomada única)	Dosagem equimolar a 580 mg de 2',3',5'-tri-O-acetiluridina	Estudo farmacocinético de um precursor de uridina (2',3',5'-tri-O-acetiluridina)
WURTMAN, 2012	Uridina derivada de UMP	10 mg a 1000 mg/dia 20 mg a 50.000 mg/dia 100 mg a 10.000 mg tomada única Dosagem que produza níveis sanguíneos ou cerebrais de citidina entre 0,1 μ M e 1 mM	Patente de uridina como fármaco potencialmente útil em melhora cognitiva
YAMAMOTO, 2002	Uridina (tomada única)	0,5 mg/kg	Estudo farmacocinético

4.2 Fontes literárias selecionadas

Os resultados da pesquisa literária realizada estão sumarizados na Tabela 2. Este levantamento foi iniciado em janeiro de 2013 e terminado em junho de 2015.

Tabela 2: Aspectos consolidados dos resultados da pesquisa bibliográfica.

TIPO DE FONTE	TEMA	RESULTADOS NUMÉRICOS
Artigos de revista	Biologia e fisiologia geral de pirimidinas	34
	Estudos clínicos	7
	Farmacologia de substâncias endógenas	2
	Farmacologia geral de pirimidinas	1
	Farmacologia humana de pirimidinas	11
	Farmacologia in vitro e experimental de pirimidinas	14
	Homeostasia de pirimidinas	8
	Métodos analíticos cromatográficos	35
	Métodos analíticos radioisotópicos	6
	Métodos de síntese radioisotópica de pirimidinas	8
Citações	Biologia e fisiologia geral de pirimidinas	1
	Métodos analíticos cromatográficos	3
DMF	CMPd	1
	UMPd	1
	UTPt	1
Informação pessoal	Metodologia radiocromatográfica para UTPt e CMPd	1
Eventos	Estudos clínicos com UTPt e CMPd	3
	Estudos experimentais com UTPt e CMPd	1
Livros-texto e capítulos de livro	Biologia e neuropatias de nervos periféricos	5
	Bioquímica e biologia molecular	2
	Compêndios de medicamentos	1
	Farmacologia de pirimidinas	2
	Farmacologia experimental de pirimidinas	1
	Farmacologia geral	1
	Métodos analíticos cromatográficos	2
	Métodos analíticos radioisotópicos	1
Patentes	Farmacologia de pirimidinas	3
	Métodos de síntese radioisotópica de pirimidinas	1
Teses	Biologia e fisiologia de pirimidinas	3
Websites	Biologia e fisiologia de pirimidinas	1
	Farmacologia geral de pirimidinas	4
TOTAL	-	165

4.3 O estudo da farmacocinética dos nucleotídeos deve ser dividido em condições fisiológicas e patológicas

Os dados da literatura sobre homeostasia dos níveis sanguíneos de uridina apontam para a possibilidade de que tal controle seria exercido diferentemente em condições fisiológicas e patológicas, de forma centralizada no fígado (JONES, 1980; LEVINE, 1974; RUDOLPH, 1994; SÁNCHEZ-POZO, 2002). Assumindo que uridina e citidina são substâncias endógenas, podemos propor que a compreensão dos mecanismos envolvidos em ambas as condições será importante para um melhor entendimento da farmacocinética dos derivados de UTPt e CMPd, detalhada na Seção 4.5.

4.3.1 Homeostasia de pirimidinas em condições fisiológicas

4.3.1.1 Destino metabólico de pirimidinas ingeridas por via oral

O destino metabólico da uridina ingerida por v.o., sob condições fisiológicas, pode ser resumido da seguinte forma: a uridina dietética é transportada do tubo digestivo através da veia porta ao fígado, onde é predominantemente catalisada. Já a uridina originada da síntese *de novo* hepática é transportada pelas veias hepáticas à circulação sistêmica, destinando-se na maior parte ao resgate pelas células periféricas. A uridina não-resgatada remanescente é transportada através da artéria hepática de volta ao fígado, predominantemente para o catabolismo. Um modelo esquemático detalhando a homeostasia de uridina em condições fisiológicas é representado na Fig. 7.

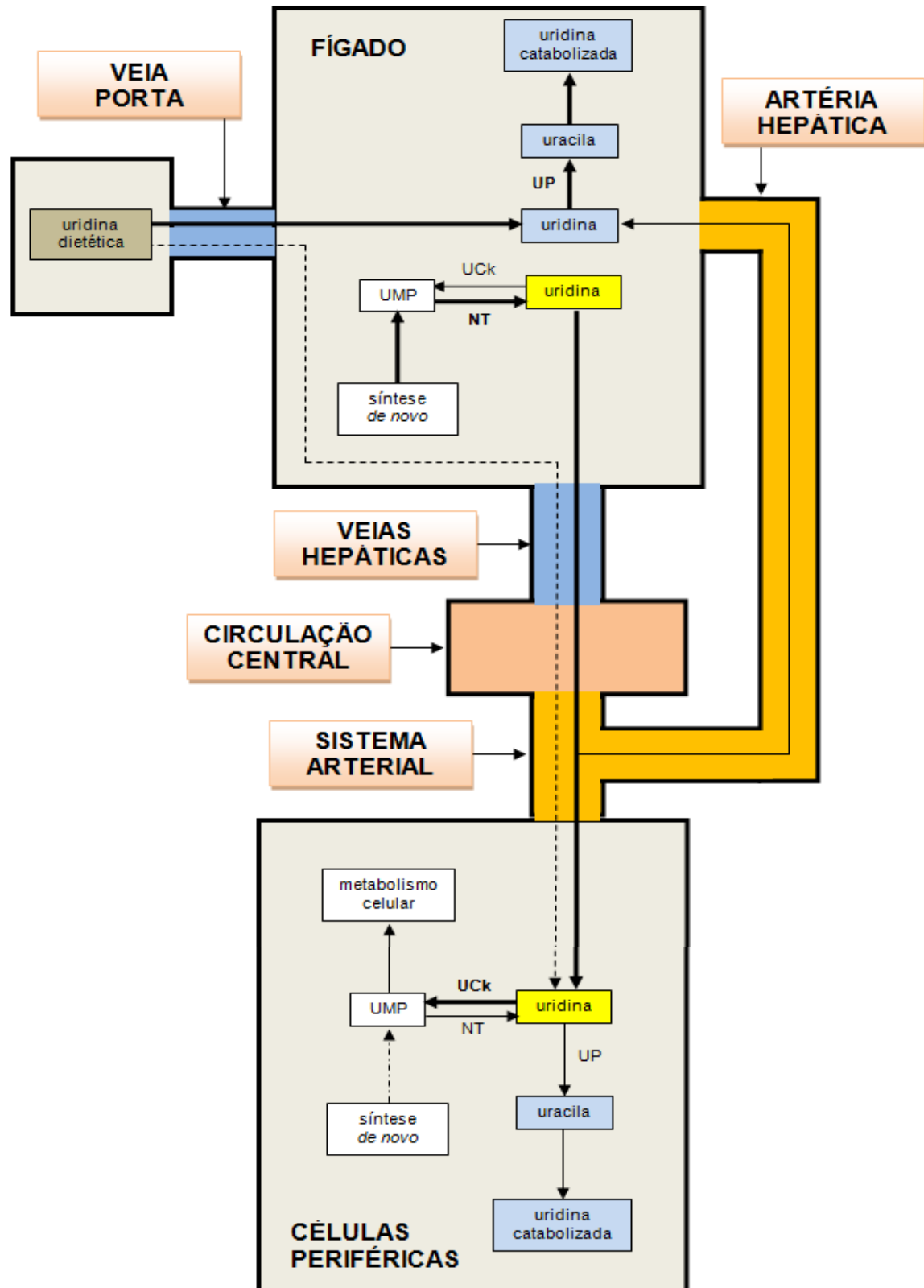


Fig. 7: Um modelo para a homeostase sanguínea de uridina sob condições fisiológicas (baseado em BALESTRI, 2007; CAO, 2005; CARVER, 1995; MONKS, 1982; MOYER, 1985(a); MOYER, 1985(b); PIZZORNO, 2002; SONODA, 1978; YAMAMOTO, 2011). As setas espessas representam predominância. Setas em padrão alternado (traço-ponto) representam pequena contribuição. NT: 5'-nucleotidase; UCK: uridina citidina quinase; UP: uridina fosforilase.

4.3.1.2 Controle dos níveis sanguíneos de pirimidinas

Os níveis sanguíneos de uridina são mantidos de forma estrita, não sendo influenciados pela dieta (TRAUT, 1994). Seus limites superiores seriam determinados por: (1) taxa de consumo em células periféricas através da via de resgate (atividade de Uck) e (2) uma taxa catabólica hepática elevada em geral (promovida pela UP em particular). Níveis mínimos seriam assegurados por: (1) uma síntese *de novo* hepática vigorosa e (2) possivelmente um controle por *biofeedback* hepático interno e/ou externo da taxa de transcrição genômica da UP. Em relação a este último aspecto, sabe-se que a taxa de transcrição genômica da UP é susceptível à modulação pelo produto do gene p53 e que o SCN é capaz de influenciar a função hepática por mecanismos endócrinos, metabólicos ou por modulação da temperatura corporal (KORNMANN, 2007; ZHANG, 2001). Ou seja, a combinação de um suprimento estável de uridina, modulado por uma atividade catabólica hepática de UP, asseguraria uma faixa estreita de níveis plasmáticos deste nucleosídeo.

A literatura consultada em geral sugere que os objetivos fisiológicos do controle dos níveis plasmáticos de uridina seriam: (1) fornecer nucleosídeos pirimidínicos para células periféricas em geral (especialmente células com taxa replicativa elevada e neurônios) (BALESTRI, 2007; CONNOLLY, 1999) e (2) controlar a razão de ribonucleotídeos e desoxiribonucleotídeos, purínicos e pirimidínicos, para a manutenção da estabilidade da informação genômica das células em geral (CAO, 2005). Assumindo que uridina é um metabólito seguro, mesmo em concentrações elevadas (LEYVA, 1984; RUDOLPH, 1998; VAN GROENINGEN, 1986; VAN GROENINGEN, 1991), nós descartamos o impedimento a níveis de uridina plasmáticos elevados por motivos de segurança como um dos papéis dos mecanismos de controle homeostático de uridina sanguínea. Diferenças entre taxas de incorporação de nucleosídeos pirimidínicos pelos diferentes tecidos podem ser explicadas pelos seguintes fatores: (1) taxa de fluxo sanguíneo local, (2) taxa de transporte de nucleosídeos através de membranas celulares, (3) atividade de Uck e (4) atividade de CD e de UP catabolizantes [MOYER, 1985(a)].

4.3.2 Homeostasia de pirimidinas em condições patológicas

Baseando-nos na informação compartilhada até aqui, propomos na Fig. 8 um modelo hipotético representando a modulação dos níveis plasmáticos de uridina, sob condições de estresse em tecidos periféricos que utilizam a via de resgate de uridina de forma significativa.

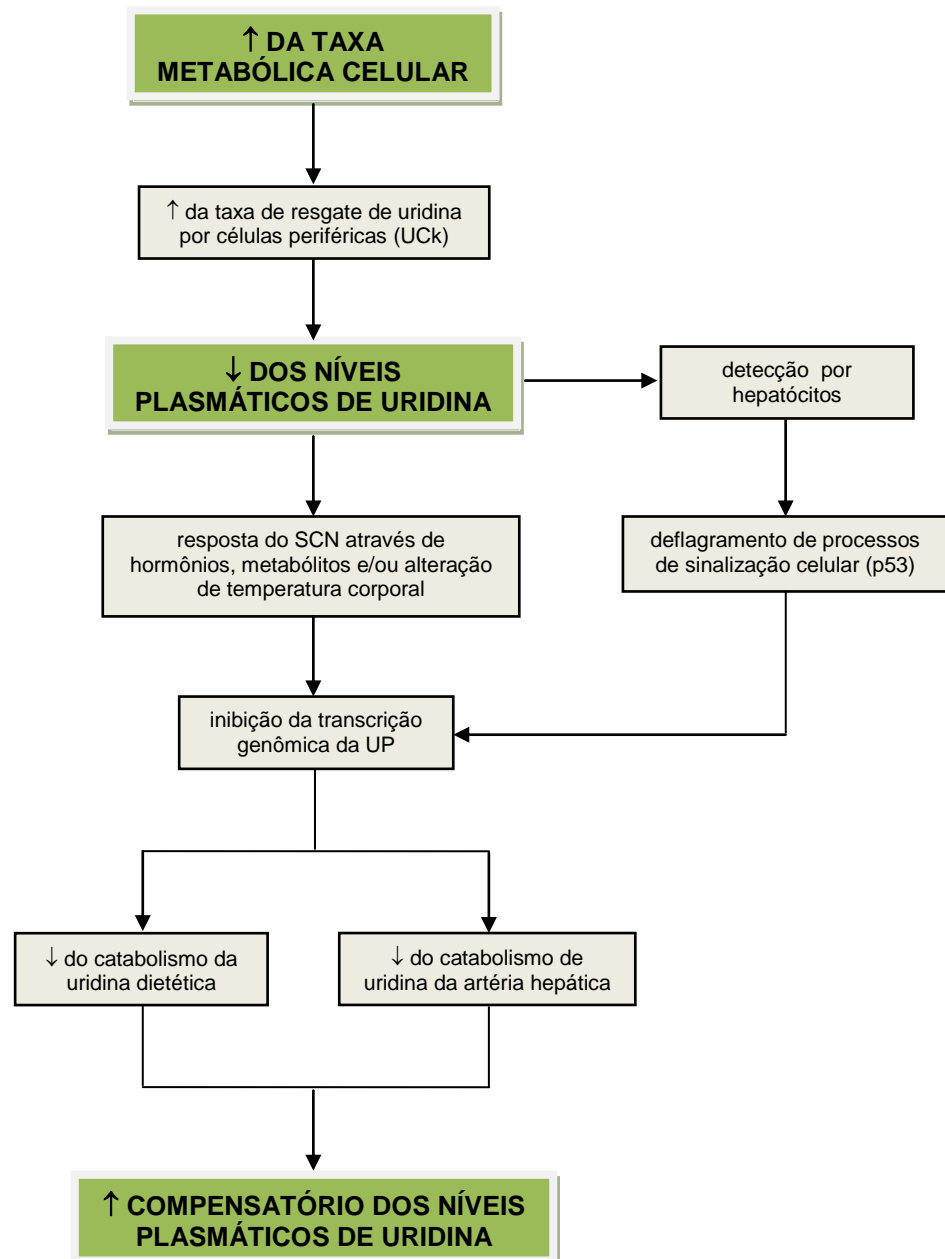


Fig. 8: Um modelo para a homeostase sanguínea de uridina sob condições de estresse tissular periférico, centrado no controle intrínseco hepático e controle sistêmico da taxa de transcrição genômica hepática da UP (baseado em KORNMANN, 2007; ZHANG, 2001). SCN: núcleo supraquiasmático; Uck: uridina citidina quinase; UP: uridina fosforilase.

A diminuição da atividade de UP hepática pouparia a uridina dietética e a uridina da artéria hepática do catabolismo, proporcionando um maior fornecimento de uridina para a circulação sistêmica. Não obstante, a quantidade de uridina da dieta é imprevisível, e aquela oriunda da uridina da artéria hepática provavelmente insignificante. Portanto, assumindo que a taxa de síntese hepática da uridina é estável, é plausível propor que uma maior disponibilidade de uridina de artéria hepática devido a uma diminuição da atividade de UP possivelmente não seria capaz de satisfazer as necessidades metabólicas das células periféricas que utilizam a via de resgate de forma significativa, sob condições orgânicas de estresse.

4.4 Achados de farmacocinética na literatura com pirimidinas administradas por via oral (v.o.)

YAMAMOTO, 2002 - Cinco homens adultos receberam uridina de cerveja sem álcool na concentração 0,5 mg/kg de peso corporal por v.o. Os autores concluíram que uridina derivada de cerveja administrada por v.o à dosagem de 0,5 mg/kg, elevou a concentração plasmática de uridina. Este achado sugere que UP e UCK intestinais e hepáticas não são suficientemente abundantes para convertê-la completamente a uracila e UMP, respectivamente, antes de o nucleosídeo acessar as veias hepáticas.

WURTMAN, 2012 - Foram administradas doses progressivamente crescentes de UMPd (500 mg, 1000 mg e 2000 mg) a oito indivíduos saudáveis

Resultados consolidados de estudos em farmacocinética com uridina administrada em dose única por v.o a humanos estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3: Resultados consolidados de estudos em farmacocinética com uridina administrada por via oral em dose única em humanos.

ESQUEMAS DE URIDINA	t_{0h} (μM)	C_{max} (μM)	t_{9h} (μM)	t_{max} (h)
0,5 mg (YAMAMOTO, 2002)	4,13	5,65	-	1
500 mg (WURTMAN, 2012)	~7	~14	-	~1
1000 mg (WURTMAN, 2012)	10	20	5	

2000 mg
(WURTMAN, 2012)

~24

~6

Em conjunto os dados sugerem que a pirimidinas administrada de forma oral atinge níveis plasmáticos máximos a partir da dose de 500 mg (LEYVA, 1984).

4.5 Modelos farmacocinéticos de uridina 5'-trifosfato trissódica e citidina 5'-monofosfato dissódica administradas por via oral em condições basais e de estresse tissular periférico

O objetivo desta Seção é estabelecer bases teóricas que possam no futuro auxiliar no delineamento de metodologias de estudo farmacocinético de UTPt e CMPd em mamíferos, baseados inclusive nas técnicas detalhadas nas Seções 4.6 e 4.7 desta Dissertação.

4.5.1 Modelos de uridina 5'-trifosfato trissódica

Sob condições basais, UTPt é rapidamente dissociada a UDP e UMP após contato com a água da luz gástrica. Deste ponto em diante, espera-se que UMP seja submetida às mesmas vias digestivas descritas para pirimidinas dietéticas (CARVER, 1995; RUDOLPH, 1998; SANCHÉZ-POZO, 2002; WILSON, 1958). Após a absorção intestinal, uridina é carregada ao fígado pela circulação porta-hepática. Assumindo que uma dosagem terapêutica de UMPd proporcione uridina em uma concentração superior à K_m (constante de Michaelis-Menten) de UP hepática catalisadora (LEYVA, 1984), a expectativa será a de que uridina acesse diretamente a circulação venosa hepática e daí a circulação sistêmica. Neste ponto haverá então uma elevação da concentração de uridina no sangue, seguida por uma queda à medida em que a primeira fosse clareada do plasma pelas células periféricas e pela UP hepática, durante o metabolismo de segunda passagem (MONKS, 1982; MOYER, 1981).

Sob condições de estresse UMPd será processada de forma semelhante à descrita no parágrafo anterior. Não obstante, a expectativa é de que uma menor atividade da UP hepática no metabolismo de primeira passagem (Fig. 7) levará a

uma elevação mais acentuada dos níveis sanguíneos de uridina, bem como a um decréscimo posterior mais lento associado ao metabolismo de segunda passagem.

4.5.2 Modelos de citidina 5'-monofosfato dissódica

Não encontramos na literatura informações acerca do processamento digestivo de citidina 5'-monofosfato (CMP) quanto acerca do de UMP. Por conseguinte, o modelo descrito a seguir seria menos robusto do que o anterior (UMPd).

Sob condições basais, CMPd é rapidamente dissociada a CMP após contacto com a água da luz gástrica. Após a absorção intestinal, citidina é carregada ao fígado pela circulação porta-hepática. Assumindo que uma dosagem terapêutica de CMPd proporcione citidina em uma concentração superior à K_m de UP catalisadora, a expectativa será a de que citidina acesse diretamente a circulação venosa hepática e daí a circulação sistêmica. Neste ponto haverá então uma elevação da concentração de citidina no sangue, seguida por uma queda à medida em que a primeira fosse eliminada do plasma pelas células periféricas e pela UP e CD hepáticas, durante o metabolismo de segunda passagem. Paralelamente, citidina seria progressivamente convertida a CMP pela ação da UCK2 hepática, bem como a uridina pela ação da UP, CD, e UP/ribose 1-P hepáticas (Fig. 2), aquele nucleosídeo surgindo mais tarde no sangue (CARVER, 1995; VOET, 2013; YAMAMOTO, 2011). Este aumento menos íngreme seria seguido por uma queda, à medida em que uridina fosse clareada do plasma pelas células periféricas e pela UP hepática, durante o metabolismo de segunda passagem (MONKS, 1982; MOYER, 1981).

Sob condições de estresse, a expectativa seria a de que CMPd fosse processada de forma semelhante à descrita no parágrafo anterior. Não obstante, uma menor atividade da UP e UP/ribose 1-P hepáticas durante o metabolismo de primeira passagem levaria a uma taxa ainda mais lenta de degradação de citidina e de sua conversão em uridina, com uma conseqüente elevação mais acentuada da primeira no sangue. Esta elevação seria seguida por uma queda, à medida em que a primeira fosse clareada do plasma pelas células periféricas e pela UP e CD hepáticas, durante o metabolismo de segunda passagem. Todavia, tal queda ocorreria de forma mais lenta devido à diminuição da atividade de UP, já citada. Paralelamente, citidina seria progressivamente convertida a uridina pela ação UP,

CD, e UP/ribose 1-P hepáticas (Fig. 2), esta última surgindo mais tarde no sangue. Este aumento, ainda menos íngreme do que em condições basais devido à diminuição da atividade da UP e UP/ribose 1-P, seria seguido por uma queda à medida em que uridina fosse clareada do plasma pelas células periféricas e pela UP hepática, durante o metabolismo de segunda passagem. Todavia, tal queda ocorreria de forma mais lenta, novamente devido à diminuição da atividade de UP.

4.5.3 Racionalidade da associação de dose fixa de uridina 5'-monofosfato dissódica e citidina 5'-monofosfato dissódica baseada nos modelos farmacocinéticos propostos

Devido às diferentes vias de metabolização hepática, UMPd e CMPd produziram uridina na circulação sanguínea em dois tempos, UMPd antes de CMPd. Tal padrão possibilitaria dois picos subsequentes de uridina, proporcionando níveis sanguíneos da substância mais consistentes em relação à administração de UMPd ou de CMPd isoladamente. A uridina é utilizada em associação com citidina em alguns países, provavelmente devido à falta de conhecimento de que citidina se converte em uridina pela ação da CD, especialmente em humanos (1966 *apud* MONTICONI; WATKINS, 2006). Portanto, esta associação poderia ser considerada como redundante. Não obstante, sabe-se que em ratos o $t_{1/2}$ da uridina é de ~3 min e o de citidina de ~25 min, e que a citidina é mais resgatada em células periféricas do que a uridina (GASSER, 1981).

Assim, defendemos que esta associação poderia ainda ser apoiada, baseando-nos em duas proposições: (1) citidina proveria uma exposição mais prolongada dos tecidos à uridina, agindo como uma pró-droga da uridina (PETERS, 1987) e (2) citidina propriamente dita proporcionaria níveis mais elevados de nucleotídeos pirimidínicos nas células periféricas. Mesmo assim, o benefício potencial de uridina exógena seria maior do que a citidina exógena, devido ao fato de que a primeira atravessa a barreira hematoencefálica (e possivelmente a barreira hematoneural) mais eficazmente do que a última (1975 *apud* CORNFORD; WATKINS, 2006).

4.6 Cromatografia líquida de alta performance e pirimidinas

A cromatografia líquida de alta performance (HPLC, do inglês, *high performance liquid chromatography*) foi a técnica não-radioisotópica identificada com maior frequência na literatura para identificação e quantificação de uridina e citidina em matriz biológica.

4.6.1 Características da cromatografia líquida de alta performance no estudo de pirimidinas

4.6.1.1 Princípios da técnica

O modo de HPLC mais comumente utilizado em separação cromatográfica de nucleosídeos é a cromatografia de fase reversa (RPC). Esta preferência se deve principalmente ao baixo potencial desta classe para a polarização forte. Esta característica se deve ao fato de nucleosídeos serem ácidos e bases fracos. Não obstante, estas substâncias podem também se comportar como substâncias neutras entre seu pK_{ab} e pK_{aa} (BROWN, 1984; ESMANS, 1998; ZAKARIA, 1981). Outro modo de separação utilizado é a cromatografia de troca iônica, técnica que permite a separação simultânea de componentes tanto no seu estado ionizado quanto não-ionizado. Esta característica geralmente prevalece em uma mistura de bases pirimidínicas e seus nucleotídeos e nucleosídeos correspondentes, sob pH compatível com o de matrizes biológicas (BROWN, 1984).

A retenção de nucleosídeos e bases nitrogenadas pirimidínicos e purínicos pela fase estacionária será diretamente proporcional à sua hidrofobicidade (solvofobicidade). Esta última propriedade parece ser o principal mecanismo determinante de sua retenção, sendo por sua vez manipulável através das seguintes medidas (BROWN, 1980; BROWN, 1984):

- modificação do pH da fase móvel
- adição de solventes orgânicos (e.g., acetonitrila v/v metanol) à fase móvel, para diminuição da solvofobicidade dos nucleosídeos e portanto de sua retenção

No que concerne a outros aspectos de desenvolvimento de métodos para cromatografia de nucleosídeos, podemos destacar os seguintes pontos:

(1) nucleosídeos não se ionizam fortemente na faixa de pH de fase móvel habitualmente adotada, (2) por não apresentarem grupamentos iônicos, nucleosídeos podem ser separados com partículas C₁₈ como fase estacionária, e fase móvel sem adição de tampões e (3) a separação isocrática é mais utilizada em amostras biológicas contendo nucleosídeos apenas [BROWN, 1980; HARTWICK, 1979(a); IP, 1985] (1977 *apud* HOFFMAN; REISS, 1984) (1978 *apud* McKEAG; REISS 1984). Não obstante, onde for necessário separar nucleosídeos de nucleotídeos (substâncias fortemente ácidas) e/ou de outros compostos ultravioleta (UV)-absorventes, pode ser necessário adotar técnicas complementares, tais como a cromatografia de troca iônica, tampões acrescidos à fase móvel e eluição por gradiente [HARTWICK, 1979(a); IP, 1985; PIMENOV, 1986].

A eventual presença simultânea de grupamentos ácidos e básicos, além de outros potencialmente ionizáveis, num mesmo derivado pirimidínico, pode incorrer em dificuldade de uma correlação cromatográfica entre o pH da fase móvel, por um lado, e por outro o estado de ionização deste derivado e seu *k*. Tal dificuldade reproduziu-se nos resultados desarmônicos de estudos do efeito da composição da fase móvel sobre a retenção de pirimidinas, e as proposições básicas da assim chamada teoria solvofóbica (esta última trata de padrões de retenção de substâncias ionogênicas por adsorventes hidrofóbicos) (GALUSHKO, 1988).

Assumindo que *t_R* (tempo de retenção) e co-cromatografia com padrões externos não são por si só técnicas capazes de fornecer uma identificação inequívoca dos picos de pirimidinas em um cromatograma, faz-se necessária a detecção com técnicas complementares (BROWN, 1983). Algumas delas são detalhados a seguir:

- Detecção por ultravioleta

Detectores UV têm sido os mais utilizados em HPLC de pirimidinas. (ZAKARIA, 1981). Os anéis aromáticos das bases nitrogenadas são os principais cromóforos das moléculas pirimidínicas. Estes exibem transições eletrônicas com máximo de absorção na faixa de 190 nm a 300 nm. O espectro de absorção depende do pH do meio, pois a protonação dos anéis heterocíclicos é capaz de interferir na distribuição de densidade de elétrons

destes anéis (BROWN, 1980; BROWN, 1974). O pH do solvente influenciará o comprimento de onda de absorção UV referente a citidina, da seguinte forma: (1) meio básico (pK_{ab}) 273 nm, (2) meio neutro (entre pK_{ab} e pK_{aa}) 270 nm e (3) meio ácido (pK_{aa}) 280 nm (BROWN, 1984). A técnica de UV é limitada pela semelhança de espectro de absorção entre certos compostos presentes em uma mesma mistura (KRSTULOVIC, 1977).

- Razão de absorbância e desvio enzimático de pico

Morris *et al.* comentam que uma razão de absorbância UV (254 nm e 280 nm) é útil na identificação de nucleosídeos pirimidínicos em fluidos biológicos (MORRIS, 1986). A técnica de desvio enzimático de pico também é útil na identificação de pirimidinas (BROWN, 1983). Efetivamente, o uso associado das técnicas de razão de absorbância e de detecção de desvio enzimático de pico é adequado à identificação de um pico nucleosídico. São razões de absorbância, respectivamente (254 nm/280 nm): (1) citidina 1,2 e (2) uridina 3,42 (BROWN, 1980; BROWN, 1984).

- Detecção por espectrometria de massa

A concentração de pirimidinas em matrizes biológicas complexas geralmente é baixa, o que pode dificultar sua identificação através da HPLC. Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS) permitiria a identificação destes compostos através da determinação de sua estrutura molecular, mesmo nestas baixas concentrações (ALDERWEIRELDT, 1985; ESMANS, 1998).

- Detecção por radioatividade

Técnicas de radiomarcção também têm sido empregadas no estudo cromatográfico de pirimidinas em matriz biológica (BROWN, 1984), e serão detalhadas na Seção 5.7.

4.6.1.2 Eluição isocrática e eluição por gradiente

Tanto eluição isocrática quanto por gradiente são aplicáveis à separação de nucleosídeos (ALDERWEIRELDT, 1985).

4.6.1.3 Desenvolvimento do método

Normalmente não há nucleotídeos no plasma e no soro. Todavia, nucleosídeos e bases nitrogenadas purínicos e pirimidínicos, estarão presentes (BROWN, 1984). Será portanto necessário desenvolver métodos que proporcionem uma separação adequada entre estas substâncias nestes tipos de matriz. Segundo alguns autores, fase estacionária com partículas de 5 μm a 10 μm e fase móvel com água:metanol eluída em gradiente, são parâmetros para obtenção de uma boa resolução na separação de nucleosídeos e bases nitrogenadas (BROWN, 1980).

Enumeramos a seguir trabalhos que descreveram diversas métodos desenvolvidos para separação cromatográfica de pirimidinas, dentre outras substâncias.

- Brown *et al.* (1974)

Estes autores desenvolveram um método para promoção da retenção de uridina em uma coluna com resina de troca iônica, através da elevação do pH da solução eluente. Sua proposição baseou-se no fato de que uridina não se ioniza em pH baixo, não podendo portanto ser retida pelas moléculas de troca iônica apenas. Os melhores resultados foram obtidos com o seguinte método: (1) matriz, hemáceas humanas, (2) coluna 250x2 mm com resina de núcleo poroso a 70 °C, (3) eluição por gradiente com solução de acetato de amônia (substância tamponadora) ajustada para pH 9,7, (4) taxa de fluxo 12 mL/h, (5) detecção UV por absorvância fixa (254 nm) e (6) co-eluição com nucleosídeos purínicos e bases nitrogenadas purínicas e pirimidínicas. Em relação à citidina, o método apresentou a limitação de não-separação entre este nucleosídeo e citosina.

- Galushko *et al.* (1988)

Estes autores estudaram os padrões de retenção de 13 compostos pirimidínicos (inclusive uridina e citidina). Seus objetivos foram: (1) tentar elucidar o desvio de comportamento cromatográfico de derivados pirimidínicos daquele previsto pela teoria solvofóbica (problema detalhado na Seção 5.6.1.1) e (2) determinar as condições cromatográficas ótimas destes compostos quando da utilização de adsorventes hidrofóbicos. Seu método consistiu nos seguintes parâmetros: (a) (coluna C₁₈ 150x1 mm com partículas de 15 µm eluída à taxa de 0,03 mL/min) ou (coluna C₁₈ 300x3,9 mm com partículas 10 µm eluída à taxa de 0,4 mL/min), (b) fase móvel de tampão fosfato (0,1 M) em solução de sulfato de amônia 0,1 a 2,5 M (este último um indutor de solvofobicidade para promover aumento do t_R) e (c) detecção UV por absorvância fixa (265 nm). Os autores reportaram os seguintes resultados: (i) o comportamento de compostos pirimidínicos corresponde àquele predito pela teoria solvofóbica para compostos ionogênicos, e é dependente de suas propriedades ácido-básicas [e.g., *k* de uridina e citidina diminuiu à medida em que o pH se elevou (a partir de aproximadamente 6,0)] e (ii) a faixa de pH ótimo para separação da mistura de nucleosídeos seria entre 5,3 e 5,5.

- Hartwick *et al.* [1979(a)]

Estes autores desenvolveram um método para detecção simultânea de 29 diferentes nucleosídeos (inclusive uridina e citidina), bases nitrogenadas e outros componentes UV-absorventes em soro humano. Seu método consistiu nos seguintes parâmetros: (1) eluição em gradiente com fase móvel tampão:metanol, (2) coluna C₁₈ 300x4,6 mm sob temperatura ambiente, (3) [solução eluente fosfato de potássio 0,02 mol/L (tamponador) de força de eluição baixa (pH 5,6)] e (solução de metanol:água 3:2 de força de eluição elevada, eluída em gradiente de 0 a 100%), (4) taxa de fluxo 1,5 mL/min (para ambos os tipos de solução eluente) e (5) detecção por razão de absorvância

UV (254 nm e 280 nm). t_R de uridina e citidina foram de 8,27 min e 5,85 min, respectivamente.

- Hartwick *et al.* [1979(b)]

Estes autores desenvolveram um método para detecção de nucleosídeos em soro humano, juntamente com bases nitrogenadas e outros compostos (total 12 substâncias, inclusive uridina), em quantidades de picomol. Seu método consistiu nos seguintes parâmetros: (1) modo, RPC, (2) coluna C_{18} 300x4,6 mm com partículas de 10 μm , sob temperatura ambiente, (3) detecção por razão de absorvância UV e por desvio enzimático de pico (reação de periodato para uridina), (4) [solução eluente de fosfato de potássio 0,02 M de força de eluição baixa (pH 5,6)] e (solução de 60% metanol:água de força de eluição elevada, eluída em gradiente de 0 a 100%) e (5) taxa de fluxo 1,5 mL/min (para ambos os tipos de solução eluente). Uridina não foi separada de xantina ao cromatograma, tendo ambas correspondido ao 5º pico ($t_R < 10$ min).

- Ip *et al.* (1985)

Estes autores estudaram os efeitos do acréscimo de acetato de trietilamônio (um tampão volátil) a uma fase móvel de acetonitrila, sobre a eficácia de separação de sete nucleosídeos (inclusive uridina e citidina) e cinco nucleosídeos monofosfato. Segundo estes autores, tampões voláteis não interfeririam com a detecção de nucleotídeos, por serem removidos após a separação. O restante do método constou dos seguintes parâmetros: (1) modo, RPC com separação isocrática, (2) coluna C_{18} 300x4 mm com partículas de 5 μm (3) pH de fase móvel 7,1, (4) detecção por razão de absorvância UV e (5) taxa de fluxo 0,5 mL/min. t_R de uridina e citidina foram 13,2 min e 10,4 min, respectivamente. Os autores concluíram que tampões voláteis comparam-se favoravelmente a tampões não-voláteis na separação de substâncias ionizáveis.

- *Keguang et al. (2011)*

Estes autores desenvolveram um método para determinação dos níveis de uridina em plasma humano, aplicável ao estudo de farmacocinética e bioequivalência de citicolina sódica (obs.: uridina é derivada de citicolina). Seu método consistiu nos seguintes parâmetros: (1) coluna C₁₈ 100x4,6 mm e partículas de 2,6 µm, (2) fase móvel de fosfato de potássio e metanol (pH 3,5), (3) taxa de fluxo 0,8 mL/min e (4) detecção UV por absorvância fixa (260 nm) e uso de padrão interno (amoxicilina). Os autores anotaram um t_R de 2,7 min para uridina.

- *Leyva et al. (1979)*

Buscando superar limitações das técnicas de RPC e de troca iônica para separação de pirimidinas (separação defectiva, necessidade de eluição por gradiente ao invés de isocrática), os autores testaram os seguintes métodos (ao todo 18 substâncias, inclusive uridina e citidina):

- sistema A: (1) coluna 250x3 mm com partículas de resina de troca iônica (5 a 9 µm) a 70 °C e (2) eluição isocrática com fase móvel contendo etanol 19% (pH 9,15)
- sistema B: (1) coluna 100x4,6 mm com partículas de resina de troca iônica (8 a 12 µm) a 60 °C e (2) eluição isocrática com fase móvel contendo etanol 28,5% (pH 8,35)

Parâmetros compartilhados foram: (1) matriz, soro, (2) taxa de fluxo 0,4 mL/min, (3) detecção UV por comprimento de onda variável (260 e 280 nm) ou fixo (254 ou 280 nm). Foram resultados, respectivamente:

- sistema A: (a) obtenção de boa estabilidade de coluna, atribuída ao etanol em menor concentração, (b) citidina eluída juntamente com citosina (t_R < 5 min) e (c) uridina eluída com boa R_s (t_R entre 7,5 e 14 min)
- sistema B: (a) citidina eluída juntamente com citosina e timidina (t_R < 5 min) e (b) uridina eluída juntamente com uracila (t_R 6 min)

- Morris *et al.* (1985)

Os autores desenvolveram um protocolo de eluição para RPC que proporcionasse uma determinação rápida e simultânea de purinas, pirimidinas (inclusive uridina) e compostos semelhantes (totalizando 26 substâncias) comumente encontrados em fluidos humanos. Seu método consistiu nos seguintes parâmetros: (1) matriz, plasma, (2) coluna com fase C₁₈ (ODS-5) 250x4,9 mm, (3) taxa de fluxo 1 mL/min e (4) detecção por razão de absorvância UV (254 nm e 280 nm). Como não foi possível eluir todos os componentes em uma única corrida, estes foram separados em quatro grupos (um deles incluindo a nucleosídeos e bases nitrogenadas pirimidínicas). Um método de eluição isocrática foi então desenvolvida para cada grupo individualmente, baseando-se na mistura de três solventes, e as separações realizadas como um sistema de gradiente contínuo comum único. As pirimidinas apresentaram um *k* baixo, tendo sido separadas de forma confiável com metanol e acetonitrila em baixa concentração (*t_R* de uridina foi 9,56 min).

- Morris *et al.* (1986)

Os autores propuseram um método para separação de nucleosídeos pirimidínicos (inclusive uridina) e mais 22 compostos relacionados em fluidos humanos, que constou dos seguintes parâmetros: (1) modo, RPC com eluição por gradiente, (2) coluna C₁₈ 250x4,9 mm com partículas de 5 µm a 25 °C (temperatura ideal), (3) fase móvel [40 mM de acetato de amônia (pH 5,0), ácido acético, metanol 1%] e [metanol, acetonitrila e tetrahydrofurano (80:10:10 v/v)], (4) taxa de fluxo 1,0 mL/min e (5) detecção por razão de absorvância UV (254 nm e 280 nm). Os autores acrescentaram que pacientes cujos fluidos orgânicos forem analisados por HPLC devem estar sob uma dieta livre de cafeína (obs.: cafeína é uma base nitrogenada purínica).

- Nissinen, 1980

Buscando desenvolver um método que permitisse estudar simultaneamente todas as bases nitrogenadas purínicas e pirimidínicas, ribonucleosídeos e ribonucleotídeos naturalmente existentes, Nissinen propôs um método para separação e quantificação de 32 bases nitrogenadas pirimidínicas, ribonucleosídeos (inclusive uridina e citidina) e ribonucleotídeos (inclusive CMP e UMP). Seu método consistiu nos seguintes parâmetros ótimos: (1) coluna 700x1,8 mm com partículas de 17,5 μm (fase estacionária de resina de troca iônica) a 65 °C, (2) eluição por gradiente com fase móvel de borato de sódio (tamponador)/cloreto de amônio (pH 9,15), (3) taxa de fluxo 0,5 mL/min, (4) identificação por t_R e co-cromatografia com padrão externo (analitos radiomarcados) e (5) detecção UV por absorvância fixa (254 nm). Foram t_R anotados: (a) uridina 46,78 min, (b) citidina 7,15 min, (c) CMP 81,63 min e (d) UMP 103,26 min.

- Pimenov *et al.* (1986)

Estes autores estudaram os efeitos da variação da concentração de tetrabutilamônio fosfato (TBA) e de acetonitrila na fase móvel sobre a eluição de 12 nucleosídeos (inclusive uridina e citidina), nucleotídeos e bases nitrogenadas em extratos biológicos. Seu método consistiu nos seguintes parâmetros: (1) modo, RPC com eluição isocrática (inicialmente), (2) cromatografia de troca iônica, (3) coluna C_{18} de compressão radial com partículas de 10 μm sob temperatura ambiente, (4) fase móvel, acetonitrila e TBA e (5) eluição por gradiente à taxa de fluxo de 2 mL/min. A identificação foi feita segundo t_R relativos, detecção por razão de absorvância UV (254 nm e 280 nm) e padrões internos. Eluição de gradiente foi utilizada quando foi necessário separar nucleotídeos mono-, di- e trifosfato. No que concerne a uridina e citidina, os autores previsivelmente constataram uma diminuição do t_R inversamente proporcional à elevação da concentração de acetonitrila.

- Reiss *et al.* (1984)

Muito embora RPC proporcione maior sensibilidade na separação de nucleotídeos do que a cromatografia de troca iônica, a primeira carece da seletividade necessária à análise de nucleotídeos derivados de extratos tissulares, proximoamente relacionados. Buscando desenvolver um método que compensasse esta limitação, estes autores desenvolveram o seguinte método para a separação de 20 substâncias (inclusive UMP): (1) matriz, tecido hepático, (2) coluna de compressão radial 100x8 mm com partículas de resina de troca iônica, a temperatura ambiente, (3) taxa de fluxo 5 mL/min, (4) detecção UV por absorvância fixa (254 nm) e uso de padrão externo e (5) três tipos de fase móvel [fosfato sódico 5 mM (pH 4,0); fosfato sódico 0,25 M (pH 4,75); cloreto de sódio (sem ajuste de pH)]. A separação bem sucedida de UMP das outras substâncias foi obtida com todos os três tipos de fase móvel.

- Rivera *et al.* (1991)

Os autores desenvolveram um método para avaliação de metabólitos purínicos e pirimidínicos (inclusive uridina) em plasma humano, totalizando 20 substâncias. Seu método consistiu nos seguintes parâmetros: (1) separação em RPC por gradiente, (2) coluna 250x4 mm com partículas C₈ (RP Select B) de 5 µm a 25 °C, (3) fase móvel [fosfato de potássio 0,01 M (pH 5,0)] ou [fosfato de potássio 0,02 M e metanol (pH 5,87) (50:50 v/v)], (4) taxa de fluxo inicial 0,7 mL, depois 1,4 mL e de volta a 0,7 mL e (5) detecção por razão de absorvância UV (254 e 280 nm).

- Romavoná *et al.* (1996)

Estes autores estudaram os efeitos da concentração de metanol, pH, taxa de fluxo e temperatura da coluna sobre a retenção de citidina, dentre outras substâncias. Seu método consistiu nos seguintes parâmetros: (1) modo, RPC, (2) coluna 250x5 mm, fase estacionária C₁₈ com partículas de

5 μm , (3) fase móvel composta de fosfato de potássio 0,01 M e metanol (0, 3, 5 e 8% v/v) e (4) detecção UV por absorvância fixa (275 nm). k de todos os compostos diminuiu com a elevação da concentração de metanol e com a diminuição do pH na fase móvel. Concluíram que o pH foi o parâmetro que mais influenciou k . Paralelamente, os autores citam que: (a) nucleosídeos e bases nitrogenadas são separáveis por RPC, com fase móvel composta de fosfato de potássio e metanol e pH na faixa de 4,0 a 6,0 e (b) a eluição destes compostos diminui com a elevação da concentração do solvente (metanol ou acetoneitrila) na fase móvel (1993 *apud* GRUNE; ROMANOVÁ, 1996).

- Rustum, 1978

Rustum desenvolveu um método para separação de 20 diferentes ribonucleosídeos (inclusive uridina e citidina), desoxiribunucleosídeos e bases nitrogenadas. Seu método consistiu nos seguintes parâmetros: (1) matriz, sangue, (2) eluição isocrática em RPC [coluna C_{18} (ZORBAX ODS)], (3) fase móvel [fosfato de potássio 2,5 mM com metanol 2,5% (pH 6,9 ou 3,0)] ou [fase móvel de borato de sódio (tamponador) (pH 9,0)], (4) taxa de fluxo 46 mL/h e (5) detecção UV por absorvância fixa (254 nm). t_R anotados foram os seguintes (tampão fosfato):

- uridina: 7,8 min e 7,5 min para pH 6,9 e 3,0, respectivamente
- citidina: 5,7 min para pH 6,9 e 3,0

O autor observou que t_R pode ser alterado modificando-se a taxa de fluxo, o pH do eluente ou o tipo de tampão (separação excelente de ribonucleosídeos e bases nitrogenadas com tampão borato). Ele também comenta que a principal vantagem de seu método é permitir a eluição isocrática, mais simples, no lugar da eluição por gradiente.

- Ryba *et al.* (1981)

Baseados na observação de que colunas contendo partículas de gel sílica foram usadas de forma bem sucedida em alguns métodos de RPC, Ryba *et al.* desenvolveram um método para co-eluição de mais de 50 compostos (inclusive uridina e citidina), que consistiu nos seguintes

parâmetros: (1) coluna 250x4,2 mm contendo partículas de gel sílica de 5 μm , (2) detecção UV por absorvância fixa (254 nm) e (3) fosfato de amônia como fase aquosa das fases móveis. Os resultados de k para uridina e citidina variaram de acordo com o tipo de fase móvel e pH, como detalhado na Tabela 4 (o pH foi ajustado com ácido fórmico 2,65 M, 1,22 M e 0,2 M para os valores de pH 2,5, 3,0 e 4,2, respectivamente).

Tabela 4: Resultados de k para uridina e citidina, segundo o tipo de fase e pH respectivo.

NUCLEOSÍDEO	TIPO DE FASE MÓVEL COM VALORES DE pH							
	A1			A2	B1			B2
	2,5	3,0	4,2	3,0	2,5	3,0	4,2	3,0
Uridina	1,66	2,15	2,90	0,60	2,92	3,13	3,85	0,80
Citidina	4,57	5,75	7,12	1,58	9,20	9,52	11,1	2,63

Eluente A1 (ppv): diclorometano 75; metanol 22; solução aquosa 3.

Eluente A2 (ppv): diclorometano 70; metanol 27; solução aquosa 3.

Eluente B1 (ppv): diclorometano 80; metanol 18; solução aquosa 2.

Eluente B2 (ppv): diclorometano 73; metanol 25; solução aquosa 2.

Assumindo k ideal como $1 < k < 10$, então os tipos de fase móvel A1 e B1 (pH 2,5 e 3,0) seriam adequados para a cromatografia uridina e citidina, na configuração proposta. Não obstante, observa-se que, para estes tipos de fase móvel, k se eleva à medida em que o pH da fase móvel torna-se menos ácido. Com citidina, mais retida, os autores apontam A2 e B2 como tipos de fase móvel particularmente úteis.

- Shi *et al.* (2008)

Estes autores desenvolveram um método para separação de CMP, citidina 5'-difosfato e CTP (biosintetizada a partir de CMP). Seu método consistiu dos seguintes parâmetros: (1) fase móvel, fosfato de potássio 480 mM (pH 5,0), (2) taxa de fluxo, 1 mL/min, (3) detecção UV por absorvância fixa (260 nm - para detecção de CMP) e uso de padrão externo e (4) colunas (a 25 °C):

- para separação: 201x7 mm, com partículas de resina de troca iônica
 - para detecção de CMP: 50x4 mm, com partículas de 5 μm de sílica com trocador aniônico
- t_R de CMP foi 43 s.

- Simmonds *et al.* (1981)

Observando uma limitação de métodos disponíveis para separação em RPC de nucleosídeos e bases nitrogenadas, sob a forma de necessidade de eluição em gradiente e de sensibilidade limitada para bases nitrogenadas e nucleosídeos, Simmonds *et al.* desenvolveram o seguinte método para separação de 16 substâncias (inclusive uridina e citidina) presentes em fluidos extracelulares e células: (1) eluição isocrática, (2) coluna com partículas de sílica de 3 a 5 μm , com temperatura variando de 21 °C a 55 °C, (3) fase móvel com metanol 0,9% a 1% e fosfato de potássio 0,001 M a 0,05 M (pH 3,5 a 6,75, segundo acréscimo de hidróxido de sódio ou ácido ortofosfórico 10 M) e (4) detecção por razão de absorvância UV (254 nm e 280 nm), t_R e desvio enzimático de pico (obs.: os três métodos não foram utilizados em conjunto para uridina e citidina). Foi obtida boa R_s . Demais dados: (a) citidina teve seu t_R alterado pelo pH da fase móvel e (b) uridina não teve seu formato de pico no cromatograma alterado pelo pH da fase móvel.

- Toguzov *et al.* (1987)

Os autores desenvolveram um método para determinação da concentração de ribonucleotídeos e bases nitrogenadas purínicos e pirimidínicos em sangue humano. Seu método consistiu dos seguintes parâmetros: (1) separação em RPC, (2) cromatografia de troca iônica, (3) coluna C_{18} de compressão radial e (4) fase móvel, acetonitrila e TBA.

- Toshchakov *et al.* (1998)

Toshchakov *et al.* desenvolveram um método em RPC para co-eluição de uridina, citidina mais seis purinas em líquido de perfusão hepática murino, que consistiu inicialmente nos seguintes parâmetros: (1) eluição isocrática, (2) coluna C₁₈ 250x4 mm com partículas de 5 µm, (3) fase móvel de acetonitrila, ácido cítrico (tamponador) e cloreto de potássio (ajuste de pH), (4) taxa de fluxo 0,7 mL/min, (5) detector UV por absorvância fixa (254 nm) e (6) identificação segundo padrão interno e desvio enzimático de pico. t_R de uridina e citidina foram 9,8 min e 6,8 min, respectivamente. Problemas encontrados referentes a uridina e citidina foram os seguintes, com soluções respectivas:

- separação de xantina e uridina: pH de fase móvel adotado de 6,25
- separação de uridina e adenosina 5'-monofosfato (AMP) sob pH 6,25 e acetonitrila 1% como fase móvel: acréscimo de tetrametilamônio (um reagente de pareamento iônico), com elevação do t_R de AMP

- Wung *et al.* (1980)

Os autores desenvolveram um método para separação simultânea de sete purinas e pirimidinas (inclusive uridina) em soro e plasma humano. Seu método consistiu dos seguintes parâmetros: (1) modo, RPC com eluição isocrática, (2) coluna C₁₈ 250x2,9 mm eluída com tampão fosfato 12,5 mM a 50 mM (pH 4,6), (3) taxa de fluxo 1,5 mL/min e (4) detecção por razão de absorvância UV (254 nm e 280 nm), t_R, co-eluição com padrões externos e desvio enzimático de pico.

- Xu *et al.* (2000)

Estes autores desenvolveram um método para detecção de uridina e citidina derivadas de RNA de transferência em soro humano, co-eluídas com 14 outros nucleosídeos normais e modificados (indivíduos normais) ou com 13 outros nucleosídeos normais e modificados (indivíduos com câncer) (obs.: nucleosídeos modificados são nucleosídeos derivados do processamento de RNA pós-transcricional). Seu método consistiu nos seguintes parâmetros: (1) separação RPC em gradiente, (2) coluna C₁₈ 250x4 mm com partículas de

gel, eluída com solução de fosfato de potássio 25 mM (pH 4,65 a 4,70) e metanol 60% em água e (3) detecção UV por comprimento de onda variável (260 e 280 nm), t_R e uso de padrão interno. t_R foram < 7 min e < 5 min para uridina e citidina, respectivamente.

- Yoshida *et al.* (1986)

A análise direta de nucleosídeos séricos pode ser um procedimento de difícil execução, devido aos seus níveis extremamente baixos no sangue humano normal e à interferência de outros componentes presentes neste tecido. Buscando superar esta limitação, os autores desenvolveram um método de marcação fluorimétrica de nucleosídeos pirimidínicos com 4-bromometil-7-metoxicumarina (Mmc), para uso em HPLC. Seu método consistiu nos seguintes parâmetros: (1) matriz, soro, (2) modo, RPC, (3) coluna C_{18} sob temperatura ambiente, (4) fase móvel de metanol:acetonitrila:água (29:5:66 v/v), (5) taxa de fluxo 0,6 mL/min, (6) detecção com fluorimetria por UV (comprimentos de onda de excitação e de emissão), uso de padrão interno (clorodeoksiuridina) e t_R e (7) co-eluição com sete outras substâncias. Foram resultados: (a) limite de detecção de 150 pg para uridina e (b) nível de excitação máxima e de emissão máxima para Mmc-uridina, 330 e 396 nm, respectivamente.

- Zilly *et al.* (2004)

Estes autores desenvolveram um método para determinação de uridina em soro humano. Seu método consistiu nos seguintes parâmetros: (1) eluição isocrática, (2) coluna C_{18} com partículas de 5 μ m a 30 °C, (3) fase móvel de fosfato de potássio 0,67 M e ácido fosfórico:acetonitrila (98:2 v/v) (ajuste de pH) (pH 4,0), (4) taxa de fluxo 0,2 mL/min e (5) detecção UV por absorbância fixa (260 nm) com oxipurinol como padrão interno. t_R de uridina foi 9,5 min.

Apesar da variabilidade de circunstâncias prevalente nos estudos de desenvolvimento de métodos detalhados nesta Seção, buscamos através de sua

tabulação alguns padrões cromatográficos especialmente influentes sobre k e R_s de uridina e citidina (Tabela 5).

Tabela 5: Aspectos consolidados em desenvolvimento de métodos cromatográficos, com enfoque em efeitos de parâmetros selecionados sobre k e R_s de uridina e citidina (cont.).

FONTE	MATRIZ	MODO DE CROMATOGRAFIA	ELUIÇÃO	INFLUÊNCIA DO pH DA FASE MÓVEL	INFLUÊNCIA DA COMPOSIÇÃO DA FASE MÓVEL
Brown <i>et al.</i> (1974)	Hemáceas humanas	Troca iônica	Gradiente	-	-
Galushko <i>et al.</i> (1988)	Matriz química	-	-	Uridina e citidina: diminuição de k associada a aumento do pH (> 6,0)	-
Hartwick <i>et al.</i> [1979(a)]	Soro	-	Gradiente	-	-
Ip <i>et al.</i> (1985)	Matriz química	-	Isocrática	-	-
Leyva <i>et al.</i> (1979)	Soro	Troca iônica	Isocrática substituída por gradiente	-	-
Morris <i>et al.</i> (1985)	Plasma	-	Isocrática (as substâncias analisadas foram divididas em quatro grupos para possibilitar eluição isocrática)	-	-
Morris <i>et al.</i> (1986)	Fluidos humanos	-	Gradiente	-	-
Nissinen (1980)	Matriz química	Troca iônica	Gradiente	-	-
Pimenov <i>et al.</i> (1986)	Extratos biológicos	Troca iônica	Gradiente	-	Aumento da concentração de acetonitrila associado a diminuição de t_R de uridina e citidina
Reiss <i>et al.</i> (1984)	Tecido hepático	Troca iônica	-	-	-
Rivera <i>et al.</i> (1991)	Plasma	-	Gradiente	-	-
Romanová <i>et al.</i> (1996)	Matriz química	-	-	Citidina: diminuição de k associada a diminuição do pH	Aumento da concentração de metanol associado a diminuição de t_R de citidina

Tabela 5 (cont.): Aspectos consolidados em desenvolvimento de métodos cromatográficos, com enfoque em efeitos de parâmetros selecionados sobre k e R_s de uridina e citidina.

FONTES	MATRIZ	MODO DE CROMATOGRAFIA	ELUIÇÃO	INFLUÊNCIA DO pH DA FASE MÓVEL	INFLUÊNCIA DA COMPOSIÇÃO DA FASE MÓVEL
Rustum (1978)	Sangue	-	Isocrática	Uridina: efeito diretamente proporcional sobre valores de k Citidina: sem influência sobre k	-
Ryba <i>et al.</i> (1981)	Matriz química	-	-	Uridina e citidina: aumento de k associado a aumento do pH	-
Shi <i>et al.</i> (2008)	Matriz química	Troca iônica	-	-	-
Simmonds <i>et al.</i> (1981)	Fluidos extracelulares e células	-	Isocrática	Uridina: t_R inalterado Citidina: t_R alterado	-
Toshchakov <i>et al.</i> (1998)	Líquido de perfusão hepática	Acréscimo de reagente de troca iônica para separação de uridina de AMP	Isocrática	-	-
Wung <i>et al.</i> (1980)	Soro e plasma	-	Isocrática	-	-
Zylly <i>et al.</i> (2004)	Soro	-	Isocrática	-	-

Observam-se os seguintes aspectos gerais, depreendidos do conteúdo da Tabela 5: (1) há uma tendência para o uso de recursos que aumentam k e R_s nos estudos que envolveram separação de uridina e citidina, tais como cromatografia de troca iônica e eluição em gradiente e (2) mudanças de pH são capazes de influenciar k de uridina e citidina (mudanças de conteúdo de solventes também tiveram influência, porém de forma menos marcante).

4.6.2 Cromatografia líquida de alta performance em estudos em geral envolvendo separação de pirimidinas em matriz biológica

Nesta Seção enumeramos trabalhos em geral que incluíram métodos cromatográficos já desenvolvidos.

- Bennett *et al.* (1984)

Contexto: uso de HPLC para análise de 22 nucleosídeos e bases nitrogenadas purínicas e pirimidínicas (inclusive uridina e citidina) em plasma humano. Método: (1) modo, RPC com eluição isocrática, (2) coluna C_{18} , (3) taxa de fluxo 1,0 mL/min e (4) detecção por razão de absorvância UV (254 nm e 280 nm), co-cromatografia com padrões externos e comparação com t_R de padrões externos. t_R de uridina e de citidina estiveram na faixa de 18 e 19 min e 17 e 18 min, respectivamente.

- Eells *et al.* (1983)

Contexto: determinação da concentração plasmática de 15 ribonucleosídeos (inclusive uridina e citidina) em soro de coelho. Método: (1) coluna (Sephadex G-10) a temperatura ambiente, eluída com (fosfato de potássio 97,5% + metanol 2,5%) ou (fosfato de potássio 90% + metanol 10%) (obs.: fosfato de potássio 50 mM, pH 4,0), (2) taxa de fluxo 1,5 mL/min e (3) detecção segundo t_R , co-eluição com padrão externo, razão de absorvância UV (254 nm e 280 nm) e clivagem de ribonucleosídeos com periodato (equivalente a desvio de pico enzimático). t_R de uridina e citidina foram 4,26 min e 2,93 min, respectivamente.

- Kang (2012)

Contexto: determinação quantitativa de uridina em plasma de coelho. Método: HPLC associada a MS em parelha. A concentração plasmática de uridina foi determinada por MS.

- Karle *et al.* (1980)

Contexto: determinação da concentração plasmática e sérica de uridina em humano, rato e camundongo. Método: (1) modo, RPC, (2) coluna C₁₈, (3) taxa de fluxo 1,5 mL/min e (4) detecção por razão de absorvância UV (254 nm e 280 nm) e co-eluição com padrão externo (5-metilcitidina). t_R de uridina ficou entre 8 e 10 min.

- Kim *et al.* (2013)

Contexto: estudo de farmacocinética de uridina em coelhos. Método: (1) matriz, plasma, (2) modo, RPC com eluição isocrática, (3) coluna C₁₈ 100x2,1 mm com partículas de 3 µm, eluída com metanol e ácido fórmico aquoso 0,1% (4:1 v/v), (4) taxa de fluxo 0,2 mL/min e (5) detecção por LC-MS/MS com uso de padrão interno (metaqualona).

- Klubes *et al.* (1986)

Contexto: biodisponibilidade relativa (oral x subcutânea) de uridina em camundongos. Método: (1) matriz, plasma, (2) modo, RPC, (3) coluna C₁₈ eluída com tampão acetato (acetato de sódio 10 mM mais ácido acético 10 mM) contendo trietilamina 0,05% (supressor iônico) (pH 4,5), (4) taxa de fluxo 1,5 mL/min e (5) detecção por razão de absorvância UV (254 e 280 nm). t_R de uridina foi 11 min.

- Krstulovic *et al.* (1977)

Contexto: identificação de nucleosídeos (inclusive uridina e citidina) e bases em soro e plasma humano por RPC. Método: (1) eluição por gradiente, (2) coluna C₁₈ sob temperatura ambiente, (3) fase móvel de metanol:água e fosfato de potássio (60:40 v/v) (pH 5,5), (4) taxa de fluxo 1,5 mL/min e (5) detecção por desvio enzimático de pico e detecção UV por comprimento de onda variável e por razão de absorbância (254 e 280 nm) (métodos utilizados isolada ou associadamente). Razões de absorbância UV para uridina e citidina (padrões externos) foram 3,42 e 1,2, respectivamente.

- Leyva *et al.* (1984)

Contexto: estudo de farmacocinética de uridina como terapia de resgate para 5-fluorouracila em humano. Método: (1) matriz, soro, (2) modo, RPC, (3) coluna 250x4,6 mm eluída com metanol 5% e fosfato de amônia 0,01 M (pH 5,0), (4) taxa de fluxo 1,0 mL/min e (5) detecção segundo t_R, co-eluição com padrão externo, área de pico, e razão de absorbância UV inicialmente (254 e 280 nm) e posteriormente absorbância fixa (254 nm). t_R de uridina foi 7 min.

- Martin *et al.* (1989)

Contexto: uso de uridina oral como substituto para uridina parenteral em terapia de resgate de 5-fluorouracila em humano. Método: (1) matriz, plasma e (2) coluna C₁₈ eluída com fosfato de potássio 0,05 M a 8 °C (pH 6,75).

- Weinberg *et al.* (2007)

Contexto: estudo de farmacocinética de um preparado oral de uridina em humano. Método: (1) matriz, plasma, (2) modo, RPC e (3) detecção por UV.

- Williams *et al.* (2003)

Contexto: estudo para determinação de níveis plasmáticos de uridina em rato. Método: (1) modo RPC, (2) coluna C₁₈ 100x2 mm eluída com ácido acético 0,1% em água, (3) taxa de fluxo 0,3 mL/min e (4) detecção por MS com mensuração de concentração com uso de padrão interno. t_R de uridina e citidina foram 4 e 3 min, respectivamente.

- Yamamoto *et al.* (2002)

Contexto: estudo farmacocinético de uridina de cerveja em humano. Método: (1) matriz, plasma, (2) cromatografia por troca de colunas [ambas 250x4,6 mm e eluídas com fosfato de potássio 20 mM (primeira coluna pH 4,70, segunda coluna pH 2,20)], (3) taxa de fluxo 1 mL/min e (4) detecção UV por absorbância fixa (254 nm).

Apesar da variabilidade de circunstâncias prevalente nos estudos apresentados nesta Seção, onde diferentes métodos cromatográficos foram adotados na separação de pirimidinas, buscamos através de sua tabulação alguns padrões cromatográficos especialmente influentes sobre k e R_s de uridina e citidina (Tabela 6).

Tabela 6: Aspectos consolidados de métodos adotados em estudos de separação cromatográfica envolvendo pirimidinas.

ESTUDO	MODO	COLUNA	TIPO DE ELUIÇÃO	ELUENTE	TAXA DE FLUXO	MÉTODO DE DETECÇÃO	ESPÉCIE	MATRIZ BIOLÓGICA
Bennett <i>et al.</i> (1984)	RPC	NI	isocrática	NI	1,0 mL/min	razão de absorbância UV	humano	plasma
Eells <i>et al.</i> (1983)	NI	NI	NI	fosfato de potássio e metanol	1,5 mL/min	<ul style="list-style-type: none"> • t_R • co-eluição com padrão externo • razão de absorbância UV • clivagem de ribonucleosídeos 	coelho	soro
Kang (2012)	NI	NI	NI	NI	NI	MS em parelha	coelho	plasma
Karle <i>et al.</i> (1980)	RPC	NI	NI	NI	1,5 mL/min	<ul style="list-style-type: none"> • co-eluição com padrão externo • razão de absorbância UV 	<ul style="list-style-type: none"> • humano • rato • camundongo 	<ul style="list-style-type: none"> • plasma • soro
Kim <i>et al.</i> (2013)	RPC	100x2,1 mm com partículas 3 μ m	isocrática	metanol e ácido fórmico aquoso	0,2 mL/min	LC-MS/MS	coelho	plasma
Klubes <i>et al.</i> (1986)	RPC	C ₁₈	NI	tampão acetato (pH 4,5)	1,5 mL/min	razão de absorbância UV	camundongo	plasma
Krstulovic <i>et al.</i> (1977)	RPC	C ₁₈	gradiente	metanol:água e fosfato de potássio (pH 5,5)	1,5 mL/min	<ul style="list-style-type: none"> • comprimento de onda variável e razão de absorbância UV • desvio enzimático de pico 	humano	<ul style="list-style-type: none"> • plasma • soro
Leyva <i>et al.</i> (1984)	RPC	250x4,6 mm	NI	metanol e fosfato de amônia (pH 5,0)	1,0 mL/min	<ul style="list-style-type: none"> • t_R • razão de absorbância UV/absorbância fixa • co-eluição com padrão externo • área de pico 	humano	soro
Martin <i>et al.</i> (1989)	NI	C ₁₈	NI	fosfato de potássio (pH 6,75)	NI	NI	humano	plasma
Weinberg <i>et al.</i> (2007)	RPC	NI	NI	NI	NI	UV	humano	plasma
Williams <i>et al.</i> (2003)	RPC	<ul style="list-style-type: none"> • 100x2 mm • C₁₈ 	NI	ácido acético em água	0,3 mL/min	<ul style="list-style-type: none"> • t_R (com padrão interno) • MS 	rato	plasma
Yamamoto <i>et al.</i>	cromatografia com troca de colunas	<ul style="list-style-type: none"> • coluna 1: 250x4,6 mm • coluna 2: 250x4,6 mm 	NI	<ul style="list-style-type: none"> • coluna 1: fosfato de potássio (pH 4,70) • coluna 2: fosfato de potássio (pH 2,20) 	1,0 mL/min	UV com absorbância fixa (254 nm)	humano	plasma

NI: não informado

Observam-se os seguintes aspectos gerais, depreendidos do conteúdo da Tabela 5: (1) o modo mais comumente empregado de HPLC foi a RPC, (2) partículas C₁₈ foram as mais empregadas, (3) *k* adequado foi obtido através de uso de solventes orgânicos, (4) 1,0 mL/min foi a mediana da taxa de fluxo, (5) técnicas de detecção UV foram amplamente utilizadas e (5) em todos os estudos foram obtidos resultados positivos com plasma e soro de mamíferos.

4.7 Técnicas radioisotópicas e pirimidinas

Nesta Seção detalharemos técnicas de marcação radioisotópica no estudo de pirimidinas em particular.

4.7.1 Características das técnicas radioisotópicas no estudo de pirimidinas

4.7.1.1 Princípios da técnica

Bases pirimidínicas triciadas são aquelas nas quais um ou mais átomos de hidrogênio são substituídos por trício (³H) na sua posição 5 e/ou 6, como indicado na Fig. 10 (EVANS, 1970).

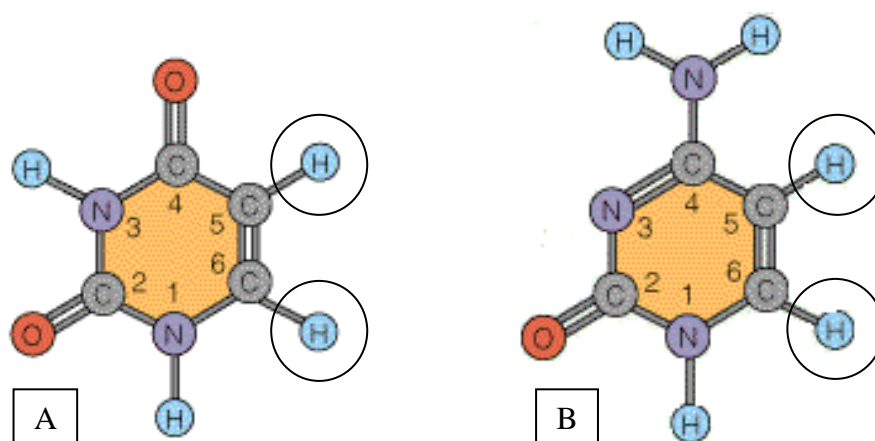


Fig. 10: Bases nitrogenadas de uracila (A) e citosina (B), com respectivas especificidades de marcação por [³H] assinaladas (imagens retiradas de WILLIAMS, 2015).

Pode-se propor três categorias de [³H], sob o aspecto de estabilidade de ligação a posições (i.e., átomos) de moléculas de nucleosídeos e nucleotídeos

pirimidínicos, submetidas a diferentes condições químicas (pH) e biológicas (EVANS, 1970):

- [^3H] lábil
[^3H] prontamente cambiável por hidrogênio, ligado a átomos de N, O ou S. Este tipo de [^3H] tem utilidade limitada como radiomarcador.
- [^3H] não-lábil
[^3H] não-cambiável, sob todas as condições de pH e temperatura. Não obstante, em solventes hidroxílicos pode haver troca por hidrogênio à presença de um catalisador de transferência de hidrogênio.
- [^3H] 'ácido-lábil' ou 'álcali-lábil'
[^3H] não-lábil que, não obstante, é sujeito a troca por hidrogênio em solventes hidroxílicos, sob certas condições de pH. Trata-se do tipo de [^3H] do qual derivam os maiores problemas em termos de potenciais mudanças de atividade específica (a.e.) molar do composto marcado.

A ligação do [^3H] ao anel de ribose ocorre mais comumente com técnicas de reação de troca catalisada por metal (veja adiante) ou trítio gasoso. No caso de marcação neste grupamento, espera-se uma taxa de 5% a 20% de atividade de [^3H], em relação ao total de [^3H] aplicado (EVANS, 1970). Decaiimento tipo beta (um elétron + um antineutrino) é o de ocorrência mais frequente com os radioisótopos comumente utilizados em marcação de pirimidinas ([^3H] e [^{14}C]) (LAPPIN, 2006).

4.7.1.2 Técnicas de radiomarcação

Reações de hidrogenação catalítica, reações de troca (e.g. troca halogênio-trítio) e métodos enzimáticos bioquímicos são as técnicas mais comumente utilizadas para o preparo de nucleosídeos e nucleotídeos triciados. O método e as respectivas condições de reação determinarão tanto a especificidade de marcação (i.e., a posição específica do [^3H] na molécula) como a estabilidade do composto marcado. Enumeramos a seguir alguns exemplos de técnicas de preparação de pirimidinas radioisotópicas, segundo descrição da literatura:

- Reações de troca

$[^3\text{H}]$ uracila e $[^3\text{H}]$ uridina foram preparadas simultaneamente, a partir de seus respectivos análogos halogenados (5-bromouracil e 5-bromouridina), através de processo de troca halógeno-trício, como demonstrado na Fig. 11.

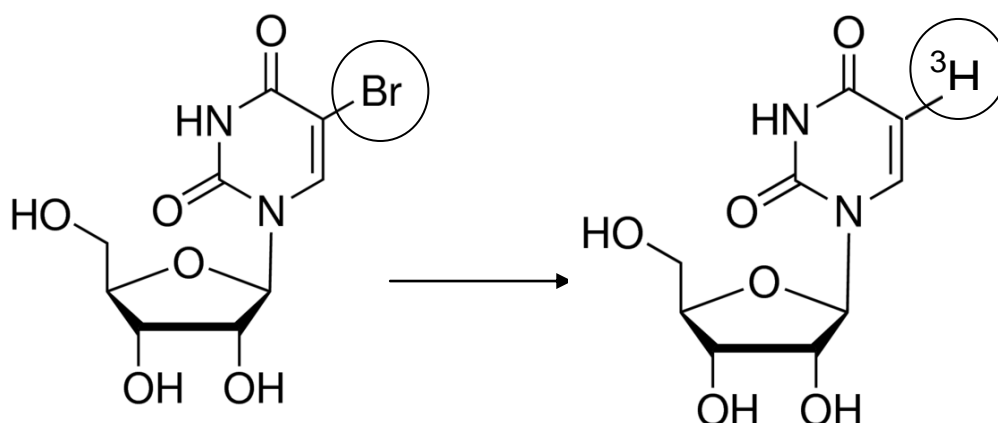


Fig. 11: O átomo de Br na base nitrogenada pirimidínica de 5-bromouridina (SIGMA-ALDRICH, 2015) é trocado por $[^3\text{H}]$ (ambos assinalados) (DEVKA, 2006).

Os produtos finais triciados - $[^3\text{H}]$ uracila e $[^3\text{H}]$ uridina - apresentaram a.e. de 0,962 TBq/mmol e 1,036 TBq/mmol, respectivamente (DEVKA, 2006). Gordeeva *et al.* radiomarcaram um sal sódico de UTP brominado com $[^3\text{H}]$ gasoso na posição 5 de sua base nitrogenada, através de processo de dealogenização, com um rendimento de 70%. A a.e. do produto final ($[5\text{-}^3\text{H}]$ UTP) foi de 630 TBq/mol (GORDEEVA, 1984). Pirimidinas marcadas com $[^3\text{H}]$ foram preparadas a partir de processo de troca hidrogênio-deutério (hidrogênio na posição 5 das bases nitrogenadas). Os autores obtiveram os seguintes resultados para uracila: (1) rendimento, 81,5% (2) a.e., 0,61 mCi/mmol e (3) pureza radioquímica, 88,6% (DRACÍNSKÝ, 2011).

- Técnicas enzimáticas bioquímicas

Marcadores $[^3\text{H}]$ foram inseridos na base nitrogenada e no anel ribose de nucleotídeos trifosfato (inclusive UTP), com o auxílio de enzimas de *Escherichia coli*. Complementarmente, estes nucleotídeos puderam ser convertidos em nucleosídeos radiomarcados correspondentes, através de tratamento com fosfatase alcalina ou nucleotídeo quinases

(SNETKOVA, 1988). Cory *et al.* desenvolveram um procedimento para a síntese enzimática de [^{14}C]UDP a partir de [^{14}C]UMP, através da nucleosídeo monofosfato quinase. Seu objetivo foi o uso de [^{14}C]UDP no estudo da ribonucleotídeo redutase. Utilizando técnicas cromatográficas, os autores puderam recuperar o nucleotídeo radiomarcado com $\geq 80\%$ de rendimento (CORY, 1984). Frank-Kamenetskaya *et al.* descreveram uma técnica de marcação dupla de desoxiribonucleotídeos, através de incubação de células de *E. coli* com [5, 6- $^3\text{H}_2$]CTP. Com esta técnica, os autores lograram produzir [5, 6- $^3\text{H}_2$]desoxicitidina-5'-mono-, di- e trifosfato com a.e. ≥ 58 Ci/mmol e rendimento de 70% a 90% (FRANK-KAMENETSKAYA, 1985).

- Hidrogenação catalítica

Sidorov *et al.* sintetizaram bases nitrogenadas triciadas (inclusive uracila) através de processo de hidrogenação (inserção de [^3H] através de ligação a átomo de C) catalítica de estado sólido. Para tanto, utilizaram Pd/BaSO₄ (paládio/sulfato de bário) com o catalisador. Um grau de substituição isotópica (ligações C-[^3H] realizadas) relatado foi de 84% (SIDOROV, 1994). Vaalburg *et al.* desenvolveram um procedimento catalítico para síntese de [5- ^3H]citidina, através do qual pudessem estabelecer o grau de pureza química e radioquímica do produto. Seu método consistiu nas seguintes etapas: (1) purificação cromatográfica de 5-iodocitidina, (2) dealogenização catalítica de 5-iodocitidina, produzindo [5- ^3H]citidina e (3) isolamento cromatográfico de [5- ^3H]citidina, seguido de determinação do seu grau de pureza radioquímica por radiocromatografia (no caso, $> 99\%$) (VAALBURG, 1968).

- Técnicas de aquecimento

O aquecimento de uma mistura equimolar de [^{14}C]uridina ou [^3H]uridina e de iP radioativo ou não-radioativo (destinado à fosforilação das primeiras), resultou em uma mistura separável de nucleotídeos de uridina marcados, com rendimento de 60% (MORAVEK, 1966). Kopecký *et al.* desenvolveram um método para a marcação com [^3H] de derivados pirimidínicos (inclusive uridina

e citidina), que consistiu no aquecimento de 5-iodopirimidinas em dimetilsulfóxido e água, como demonstrado na Fig. 12. Acrescentaram que a a.e. obtida por este método é comparável àquela descrita com reações catalíticas (16,5 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$ e 16,4 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$ para [5- ^3H]uridina e [5- ^3H]citidina, respectivamente) (KOPECKÝ, 1972).

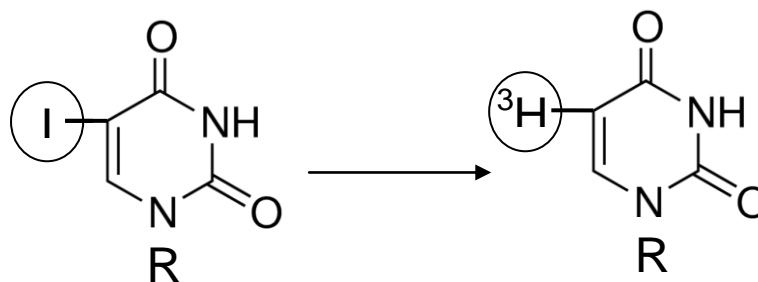


Fig. 12: Substituição do radical de iodo na molécula de uma 5-iodopirimidina (no exemplo, uma uracila) por [^3H], através de aquecimento. Há a provável participação de hidrogênio e radical hidroxila na troca (não ilustrada) (KOPECKÝ, 1972).

4.7.1.3 Limitações das técnicas de radiomarcação

São limitações inerentes à marcação com [^3H] de pirimidinas:

- Formação de hidratos

Hidratos podem ser formados em soluções estocadas de uridina triciada, decorrentes da auto-radiólise desta substância. São os seguintes os dados de estabilidade de compostos contendo bases pirimidínicas radiomarcadas com [^3H], estocados em solução aquosa (pH neutro, +2 $^{\circ}\text{C}$): 5% em um ano para a posição 5 e < 1% para a posição 6. Em condições de hidrólise ácida ou alcalina vigorosa sob temperaturas > 50 $^{\circ}\text{C}$, perdas de [^3H] situado na posição 5 são mais esperadas do que aquelas na posição 6 (EVANS, 1970). 5- ^3H -uridina (i.e., marcada na posição 5) de a.e. molar elevada (23 Ci/mmol) e estocada em solução aquosa (1 mCi/mL) a 2 $^{\circ}\text{C}$, exibiu sinais cromatográficos sugestivos de hidratação, i.e., substituição do [^3H] por hidrogênio derivado da água. Devido a estes achados, Evans *et al.* recomendam soluções alcoólicas e baixa temperatura para estocar 5- ^3H -uridina. De forma geral, os autores consideram 6- ^3H -uridina menos susceptível à hidratação do que 5- ^3H -uridina (EVANS, 1970).

- Especificidade de marcação

Diferenças de proporção de posicionamento de [³H] em diferentes átomos de C de uma base nitrogenada pirimidínica radiomarcada podem gerar dificuldades de interpretação de dados experimentais, acaso tais bases sofram modificação metabólica durante a biosíntese de pseudouridina em sistemas biológicos. Buscando abordar tal problema, Kusama determinou como 2% a 4% a proporção de [³H] presente no C6, em relação ao total de átomos de [³H] presentes na base nitrogenada de um preparado comercial de [5, 6-³H]uridina (KUSAMA, 1968).

- Auto-radiólise

Nucleotídeos pirimidínicos trifosfato triciados são mais sensíveis à auto-radiólise do que os correspondentes di- e monofosfatos. Além disto, sob estocagem em soluções aquosas, decompõem-se inicialmente em uma mistura de nucleotídeos di- e monofosfato (com predominância dos primeiros). Estes, por sua vez, decompõem-se em uma taxa mais lenta a nucleosídeos e bases nitrogenadas (EVANS, 1970).

4.7.1.4 Desenvolvimento de métodos cromatográficos para estudo de pirimidinas radiomarcadas

Nesta Seção enumeramos trabalhos em geral que incluíram métodos cromatográficos já desenvolvidos para separação de pirimidinas radiomarcadas.

- Kudelin *et al.* (1992)

Estes autores desenvolveram um método cromatográfico para diferentes formas isotópicas de nucleosídeos triciados (inclusive uridina), com o objetivo de separá-las de acordo com a magnitude de suas a.e. molares. Seu método consistiu nos seguintes parâmetros: (1) modo, RPC, (2) coluna 250x4 mm com partículas de 5 µm, eluída com três tipos de fase móvel,

incluindo a B (etanol 3% em água), (3) número N de pratos 14.000, (4) detecção UV por absorvância fixa (254 nm) e por contagem de cintilação líquida. As duas formas isotópicas de uridina detectadas - [5, 5', 4'-³H]uridina e [5, 5'-³H]uridina - foram melhor separadas com a fase móvel B. [5, 5', 4'-³H]uridina foi separada em três diferentes frações, com atividade total de pico e a.e. respectivas: (a) 8% / 60 Ci/mmol, (b) 80% / 56,8 Ci/mmol e (c) 12% / 32,7 Ci/mmol. O autor acrescenta que os resultados apresentados são compatíveis com o conceito de que compostos radiomarcados são mais polares do que aqueles não-radiomarcados, sendo portanto eluídos mais rapidamente em condições de RPC.

- Olivares *et al.* (1988)

Estes autores desenvolveram um método para estudar o destino metabólico de seis purinas e pirimidinas (inclusive uridina e citidina) em plasma, através da administração de precursores radiomarcados. Seu método consistiu nos seguintes parâmetros: (1) HPLC isocrática, (2) espécies, rato, coelho, cobaia, cão e humano, (3) coluna CH-18 250x4 mm com partículas de 5 µm, a temperatura ambiente, (4) fase móvel de fosfato de potássio 0,01 M (ácido pirofosfórico ou hidróxido de potássio para ajuste de pH) (pH 2,5), (5) taxa de fluxo 1 mL/min, (6) a.e. de 393 mCi/mmol e 300 mCi/mmol para [U-¹⁴C]uridina e [U-¹⁴C]citidina, respectivamente e (7) detecção UV por comprimento de onda variável (260 e 280 nm) com uso de padrão interno, e co-cromatografia com padrões externos. Espectrometria de cintilação líquida foi realizada com [U-¹⁴C]uridina e [U-¹⁴C]citidina pós-eluídas. t_R foram 12,8 min e 7,3 min para uridina e citidina, respectivamente (ratos).

4.7.2 Métodos cromatográficos em estudos em geral envolvendo pirimidinas radiomarcadas

Nesta Seção enumeramos trabalhos em geral que incluíram métodos cromatográficos já desenvolvidos para separação de pirimidinas radiomarcadas [obs.: o estudo Ro *et al.* (1964) não envolveu técnica cromatográfica].

- Chan *et al.* (1988)

Contexto: estudo farmacocinético de uridina em pacientes com câncer. Método: (1) HPLC, (2) matriz, plasma, (3) [5, 6-³H]uridina (a.e. 40 a 60 Ci/mmol), (4) coluna C₁₈ sob eluição isocrática com fosfato de potássio 50 mM (pH 3,75), (5) taxa de fluxo 9,7 mL/min, (6) detecção por razão de absorvância UV (254 e 280 nm) e uso de padrão externo e (7) contagem da fração [5, 6-³H]uridina separada, com contador de cintilação líquida (co-cromatografia com padrão externo). t_R de [5, 6-³H]uridina foi 9,7 min.

- Cory *et al.* (1984)

Contexto: desenvolvimento de um procedimento para a separação de [¹⁴C]UDP. Método: (1) HPLC, (2) coluna 250x4,6 mm eluída por gradiente com fosfato de amônia 0,01 M (pH 2,77) e fosfato de amônia 0,5 M (pH 4,82) e (3) taxa de fluxo 1 mL/min (eluição simultânea com [¹⁴C]UMP, ADP e ATP). Obs.: trabalho descrito também na Seção 5.7.1.2 (CORY, 1984).

- Dahnke *et al.* (1975)

Contexto: estudo do metabolismo de nucleosídeos pirimidínicos em rato. Método: (1) matriz, plasma, (2) [5-³H]uridina, [2-¹⁴C]uridina e [5-³H]citidina (a.e. 50 mCi/mmol, 57 mCi/mmol e 50 mCi/mmol, respectivamente) e (3) método analítico, cromatografia.

- Etrychová *et al.* (1975)

Contexto: estudo radiocromatográfico em cérebro, fígado, músculo e sangue de camundongo, de derivados de [5-³H]uridina (i.e., UMP e uracila) injetada por via subcutânea. Método: (1) a.e. de [5-³H]uridina, 13,55 Ci/mmol (95% de pureza), (2) extração das pirimidinas radiomarcadas dos tecidos com ácido tricloroacético, (3) análise das frações tissulares em cromatografia de papel (acetato de amônia e etanol como solvente) e (4) localização das

frações pirimidínicas radiomarcadas no papel por UV, seguida de leitura das frações de papel correspondentes em contador de cintilação líquida.

- Moyer *et al.* (1981)

Contexto: estudo do padrão de resgate de nucleosídeos pirimidínicos circulantes (uridina e citidina) em rato. Métodos:

- [5-³H]uridina: (1) coluna 250x4,6 mm com resina de troca aniônica eluída com ácido acético 0,3 M e amônia a 50 °C (pH 9,7) e (2) taxa de fluxo 1 mL/min. t_R 22 min.
- [5-³H]citidina: (1) coluna 250x4,6 mm com resina de troca catiônica eluída com ácido fórmico 0,3 M a 50 °C (pH 4,0) e (2) taxa de fluxo 1,5 mL/min. t_R 24 min
- [5-³H]uridina e [5-³H]citidina: (1) modo, RPC, (2) coluna com partículas de 5 μ m eluída com fosfato de sódio 0,2 M (pH 6,4) a 25 °C e (3) taxa de fluxo 1 mL/min. t_R foram 14 min e 8,5 min para [5-³H]uridina e [5-³H]citidina, respectivamente

Deteção por razão de absorbância UV (254 e 280 nm). Radioatividade determinada por espectrometria de cintilação.

- Moyer *et al.* [1985(a)]

Contexto: estudo dos padrões de resgate de uridina e citidina em tecidos de camundongo. Foram utilizados [5-³H]uridina e [5-³H]citidina (a.e. 20 Ci/mmol e 22 Ci/mmol, respectivamente). Métodos (ambas em RPC, plasma como matriz e uso de coluna C₁₈ 150x38 mm com partículas de 5 μ m):

- sistema 1: (1) fase móvel de fosfato de potássio 0,2 M (pH 5,1) e (2) taxa de fluxo 1,5 mL/min. t_R de [5-³H]uridina foi 5,1 min.
- sistema 2: (1) fase móvel de fosfato de potássio 20 mM e ácido heptanesulfônico 30 μ M (pH 3,3) e (2) taxa de fluxo 1 mL/min. t_R de [5-³H]uridina e [5-³H]citidina foram 5,3 e 6,2 min, respectivamente

Deteção de [5-³H]uridina por cromatografia de camada fina, seguida de análise por UV e em contador de cintilação líquida.

- Ro *et al.* (1964)

Contexto: estudo da origem molecular nucleica de RNA nucleolar, através de sua marcação com [2-¹⁴C]UTP (11,3 mCi/mmol). A contagem radioativa foi realizada através de um contador de fluxo gasoso.

- Tseng *et al.* (1971)

Contexto: estudo das taxas de formação de uridina e citidina em cães.
Métodos: (1) matriz, plasma, (2) [6-³H]uridina e [2-¹⁴C]citidina (a.e. 9,3 Ci/mmol e 17,7 mCi/mmol, respectivamente) e (3) cromatografias realizadas em série:

- primeira cromatografia: coluna C-1 (taxas de recuperação 50% e 60% para [6-³H]uridina e [2-¹⁴C]citidina, respectivamente)
- primeira recromatografia: coluna C-2 e coluna C-3 para [6-³H]uridina e [2-¹⁴C]citidina, respectivamente (taxas de recuperação 37% e 50%, respectivamente)
- cromatografias subsequentes ([2-¹⁴C]citidina): colunas C-4, P-3 e P-2

As a.e. de [6-³H]uridina e [2-¹⁴C]citidina foram medidas por procedimento de duplo-isótopo (método baseado na razão ³H/¹⁴C, detalhado no estudo original) ou por método espectrofotométrico por UV em comprimento de onda variável (260 ou 280 nm). [³H] e [¹⁴C] foram contados simultaneamente em contador de cintilação líquida.

5 CONCLUSÃO

Concluimos que radiomarcção de UTPt/UMPd e CMPd, seguida de separação cromatográfica e detecção por UV e cintilografia líquida, seria uma metodologia factível para estudos de detecção e quantificação de derivados de UTPt e CMPd em matriz biológica (como plasma).

6 REFERÊNCIAS

ALBERTS, B. (Coord.). Molecular Biology of the Cell. 5th edition. New York : Garland Science, 2008. p. 195-262.

ALDERWEIRELDT F.C.; ESMANS E.L.; GEBOES, P. HPLC and LC-MS of Nucleosides. Nucleosides Nucleotides, New York, v. 4, n. 1&2, p. 135-137, 1985.

BALESTRI, F.; BARSOTTI, C.; LUTZEMBERGER, L. *et al.* Key role of uridine kinase and uridine phosphorylase in the homeostatic regulation of purine and pyrimidine salvage in brain. Neurochem Int, Oxford, v. 51, n. 8, p. 517-523, Dec. 2007.

BARROS, A.B.; CARDOSO, VN. Informação pessoal. 2015.

BENNETT, M.J.; CARPENTER, K.H. Experience with a simple high-performance liquid chromatography method for the analysis of purine and pyrimidine nucleosides and bases in biological fluids. Ann Clin Biochem, London, v. 21, p. 131-136, Mar. 1984.

BERLIN, R.D.; OLIVER, J.M. Membrane transport of purine and pyrimidine bases and nucleosides in animal cells. Int Rev Cytol, New York, v.42, p.287-336, 1975.

BIRCH, R. Peripheral Nerve Injuries. London : Springer, 2013. p. 69-193.

BISSONNETTE, R. The *de novo* and salvage pathways for the synthesis of pyrimidine residues of RNA predominate in different locations within the mouse duodenal epithelium. Cell Tissue Res, Berlin, v. 267, n. 1, p. 131-137, Jan. 1992.

BROWN, P.R. (Coord.). HPLC in Nucleic Acid Research. Methods and Applications. New York : Dekker, 1984. 403 p.

BROWN, P.R.; BOBICK, S.; HANLEY, F.L. The analysis of purine and pyrimidine bases and their nucleosides by high-pressure liquid chromatography. J Chromatogr, Amsterdam, v. 99, n. 0, p. 586-595, Nov. 1974.

BROWN, P.R. Current high performance liquid chromatographic methodology in analysis of nucleotides, nucleosides, and their bases. II. Cancer Invest, New York, v. 1, n. 6, p. 527-536, 1983.

BROWN, P.R.; KRSTULOVIC, A.M.; HARTWICK, R.A. Current state of the art in the HPLC analyses of free nucleotides, nucleosides, and bases in biological fluids. Adv Chromatogr, New York, v. 18, p. 101-138, 1980.

BRUNTON, L. (Coord.). Goodman & Gilman's. The Pharmacological Basis of Therapeutics. 12th edition. New York: McGraw Hill, 2011. p. 1597, 1695.

CANALES, T.M. Estudio del fármaco CMP Forte y del nucleótido UTP en células de Schwann. 251 p. Tesis Doctorales en Universitat Internacional de Catalunya. Departament de Medicina. Barcelona. 2011.

CANSEV, M. Uridine and cytidine in the brain: their transport and utilization. Br Res Rev, Amsterdam, v. 52, p. 389-97, Sep. 2006.

CANSEV, M.; WURTMAN, R.J. Chronic administration of docosahexaenoic acid or eicosapentaenoic acid, but not arachidonic acid, alone or in combination with uridine, increases brain phosphatide and synaptic protein levels in gerbils. Neuroscience, Oxford, v. 148, p. 421-431, Aug. 2007.

CANSEV, M.; WATKINS, C.J.; VAN DER BEEK, E.M. *et al.* Oral uridine-5'-monophosphate (UMP) increases brain CDP-choline levels in gerbils. Brain Res, Amsterdam, v. 1058, n. 1-2, p. 101-108, Oct. 2005.

CAO, D.; LEFFERT, J.J.; McCABE J. *et al.* Abnormalities in uridine homeostatic regulation and pyrimidine nucleotide metabolism as a consequence of the deletion of the uridine phosphorylase gene. J Biol Chem, Baltimore, v. 280, n. 22, p. 21169-21175, Jun. 2005.

CARVER, J.D.; WALKER, W.A. The role of nucleotides in human nutrition. J Nutr Biochem, Stoneham, v. 6, n. 2, p. 58-72, Feb. 1995.

CHAN, T.C.K.; MARKMAN, M.; PFEIFLE, C.E. *et al.* Uridine pharmacokinetics in cancer patients. Cancer Chemother Pharmacol, Berlin, v. 22, p. 83-86, 1988.

CONNOLLY, G.P.; DULEY J.A. Uridine and its nucleotides: biological actions, therapeutic potentials. Trends Pharmacol Sciences, Amsterdam, v. 20, p. 218-225, May 1999.

CORNFORD, E.M.; OLDENFORD, W.H. Independent blood-brain barrier transport systems for nucleic acid precursors. Biochim Biophys Acta, Amsterdam, v. 394, p. 211-219, 1975.

CORNFORD, E.M.; OLDENFORD, W.H. Independent blood-brain barrier transport systems for nucleic acid precursors. Biochim Biophys Acta, Amsterdam, v. 394, p. 211-219, 1975. *Apud* WATKINS, C; WURTMAN, R.J. Methods for increasing blood cytidine and/or uridine levels and treating cytidine-dependent human diseases. United States Patent 6,989,376. USPTO Patent Full-Text and Image Database. Jan. 2006.

CORY, J.G; BACON, P.E. Preparation of [¹⁴C]uridine 5'-diphosphate and [¹⁴C]guanosine 5'-diphosphate. Prepar Biochem, New York, v. 14, n. 3, p. 231-237, Aug. 1984.

DAHNIKE, H.G.; MOSEBACH, K.O. In vivo studies on the metabolism of pyrimidine nucleosides. Hoppe Seylers Z Physiol Chem, Berlin, v. 356, n. 10, p. 1565-1574, Oct. 1975.

DAMS, A.L. Extracellular UTP signalling in Schwann cell migration: a novel role of the P2Y₂ receptor. 316 p. Dissertation (Doctor of Philosophy in the Department of Cell and Molecular Biology). Universitat Internacional de Catalunya. St Cugat de Vallés. 2013.

DARNOWSKI, J.W.; HANDSCHUMACHER, R.E. Tissue uridine pools: evidence in vivo of a concentrative mechanism for uridine uptake. Cancer Res, Chicago, v. 46, n. 7, p. 3490-3494, Jul. 1986.

DAVIDSON A.J.; CASTAÑÓN-CERVANTES O.; STEPHAN F.K. Daily oscillations in liver function: diurnal vs circadian rhythmicity. Liver Int, Oxford, v.24, n.3, p.179-186, Jun. 2004.

DEVIKA, K.; CHANDRIKA, R.; MUKHERJEE, S. *et al.* Simultaneous preparation of tritiated uracil and uridine. J Radioanal and Nucl Chem, Budapest, v. 267, n. 3, p. 581-583, 2006.

DISSANAYAKE S. Assessing the bioequivalence of analogues of endogenous substances ('endogenous drugs'): considerations to optimize study design. Br J Clin Pharmacol. London, v. 69, n. 3, p. 238-344, Mar. 2010.

DRACÍNSKÝ, M.; JANSA, P.; ELBERT, T. Isotope exchange reactions on the hydrogen H-5 of selected pyrimidine derivatives and the preparation of tritium-labeled pyrimidines. Collect Czech Chem Commun, v. 76, n. 12, p. 1567-1577, 2011.

EELLS, J.T.; SPECTOR, R. Determination of ribonucleosides, deoxyribonucleosides, and purine and pyrimidine bases in adult rabbit cerebrospinal fluid and plasma. Neurochem Res, New York, v. 8, n. 10, p. 1307-1320, Oct. 1983.

EL KOUNI, M.H.; NAGUID, F.N.; PARK, K.S. *et al.* Circadian rhythm of hepatic uridine phosphorylase activity and plasma concentration of uridine in mice. Biochem Pharmacol, Oxford, v.40, n.11, p.2479-2485, Dec. 1990.

ESMANS, E.L; BROES, D.; HOES I. *et al.* Liquid chromatography–mass spectrometry in nucleoside, nucleotide and modified nucleotide characterization. J Chromat, Amsterdam, v. 794, n. 1-2, p. 109-127, Jan. 1998.

ETRYCHOVÁ, J.; JAKOUBEK, B. Radiochromatography of 5-³H-uridine derivatives found in trichloroacetic and soluble fractions of mouse brain, liver, muscle and blood. Physiol Bohemoslov, Prague, v. 24, n. 5, p. 385-388, Sep. 1975.

EVANS, E.A.; SHEPPARD, H.C.; TURNER, J.C. Validity of tritium tracers. Stability of tritium atoms in purines, pyrimidines, nucleosides and nucleotides. J Labelled Compd, London, v. 6, n. 1, p. 76-87, Jan.-Mar. 1970.

FDA Drug Master File for UMPNa₂. Shangai Oripharm Co., Ltd. Jul. 2010.

FOG, R. Neuronal uridine metabolism. Acta Neurol Scand, Copenhagen, v. 137, p. 45-47, 1992.

FRANK-KAMENETSKAYA, M.D.; MYASOEDOV, N.F. Method for preparation of desoxy-(5,6-³H₂)-cytidine-5'-mono-, di- and triphosphates labelled with tritium. Patente depositada em 20 Jun. 1985. Disponível em:

http://www.iaea.org/inis/collection/NCLCollectionStore/_Public/23/046/23046588.pdf. Acesso em 5 jan. 2015.

GALUSHKO, S.V.; SHISHKINA, I.P.; PILIPENKO, A.T. Reversed-phase high-performance liquid chromatography of pyrimidine bases and nucleosides. Application of solvophobic theory. J Chromatogr, Amsterdam, v. 443, n. 1, p. 59-70, Jul. 1988.

GASSER, T.; MOYER, J.D.; HANDSCHUMACHER, J.D. Novel single-pass exchange of circulating uridine in rat liver. Science, New York, v. 213, p. 777-778, Aug. 1981.

G-COVIELLA, I.L.; WURTMAN, R.J. Enhancement by cytidine of membrane phospholipid synthesis. J Neurochem, New York, v. 59, p. 338-343, Jul. 1992.

GOLDBERG, H.; JÚNIOR, A.B.S.; COHEN, J.C. *et al.* Neural compression-induced neuralgias: clinical evaluation of the effect of nucleotides associated with vitamin B12. Rev Bras Med, São Paulo, v. 66, n. 11, p. 380-385, Nov. 2009.

GORDEEVA, L.S.; KAMINSKII Yu.L.; RUMYANTSEVA, L.N. *et al.* Synthesis of tritium-labeled nucleosides 5'-triphosphates and nucleosides 5'-diphosphates. Chem Natur Comp, New York, v. 20, n. 6, p. 729-733, 1984.

GRUNE, T.; SIEMS, W.G. Reversed-phase high-performance liquid chromatography of purine compounds for investigation of biomedical problems: application to different tissues and body fluids. J Chromatogr, Amsterdam, v. 618, n. 1-2, p. 15-40, Aug. 1993. *Apud* ROMANOVÁ, D.; NOVOTNÝ, L. Chromatographic properties of cytosine, cytidine and their synthetic analogues. J Chromatogr B Biomed Appl, Amsterdam, v. 12, n. 1, p. 9-15, Jan. 1996.

HARTWICK, R.A.; ASSENZA, S.P.; BROWN, P.R. Identification and quantitation of nucleosides, bases and other UV-absorbing compounds in serum, using reversed-phase high-performance liquid chromatography. I. Chromatographic methodology. J Chromatogr, Amsterdam, v. 186, p. 647-658, Dec. 1979(a).

HARTWICK, R.A.; KRSTULOVIC A.M.; BROWN, P.R. Identification and quantitation of nucleosides, bases and other UV-absorbing compounds in serum, using reversed-phase high-performance liquid chromatography. II. Evaluation of human sera. J Chromatogr, Amsterdam, v. 186, p. 659-676, Dec. 1979(b).

HIGGINS, J.M. Regulation of human cytidine triphosphate synthetase 1 by phosphorylation and interacting proteins. 155 p. Dissertation. Doctor of Philosophy in the Department of Pharmacology. University of North Carolina at Chapel Hill. Chapel Hill. 2007.

HOFFMAN, N.E.; LIAO, J.C. Reversed phase high performance liquid chromatographic separations of nucleotides in the presence of solvophobic ions. Anal Chem, Washington, n. 49, v. 14, p. 2231-2234, Dec. 1977. *Apud*

REISS, P.D.; ZUURENDONK, P.F.; VEECH, R.L. Measurement of tissue purine, pyrimidine, and other nucleotides by radial compression high-performance liquid chromatography. Anal Biochem, Orlando, v. 140, n. 1, Jul. 1984.

IP, C.Y.; HA, D.; MORRIS, P.W. *et al.* Separation of nucleosides and nucleotides by reversed-phase high-performance liquid chromatography with volatile buffers allowing sample recovery. Anal Biochem, New York, v. 147, n. 1, p. 180-185, May 1985.

JOHNSTON, M.E., GEIGER, J.D. Sodium-dependent uptake of nucleosides by dissociated brain cells from the rat. J Neurochem, New York, v. 52, n. 1, p. 75-81, Jan. 1989.

JONES, M.E. Pyrimidine nucleotide biosynthesis in animals: genes, enzymes, and regulation of UMP biosynthesis. Annu Rev Biochem, Palo Alto, v. 49, p. 253-79, 1980.

KANG, W. Quantitative determination of uridine in rabbit plasma and urine by liquid chromatography coupled to a tandem mass spectrometry. Biomed Chromatogr, London, v. 26, n. 4, p. 541-544, Apr. 2012.

KARLE, J.M.; ANDERSON, L.W.; DIETRICK, D.D. *et al.* Determination of serum and plasma uridine levels in mice, rats, and humans by high-pressure liquid chromatography. Anal Biochem, New York, v. 109, p. 41-46, 1980.

KAYE, P.L.; GUNNING, P.W.; AUSTIN, L. In vivo synthesis of stable RNA within the rat nodose ganglia following vagotomy. J Neurochem, Oxford, v. 28, p. 1241-1243, Jun. 1977.

KEGUANG, C.; XIAOYAN, L.; CHUNMIN, W. *et al.* Determination of uridine in human plasma by HPLC and its application in citicoline sodium pharmacokinetics and bioequivalence studies. J Bioequiv Availab, v. 3, n. 4, p. 72-76, 2011.

KIM, E.; KANG, W. Pharmacokinetics of uridine following ocular, oral and intravenous administration in rabbits. Biomol Ther, Seoul, v. 21, n. 2, p. 170-172, Mar. 2013.

KLUBES, P.; GEFFEN, D.B.; CYSYK, R.L. Comparison of the bioavailability of uridine in mice after oral or parenteral administration. Cancer Chemother Pharmacol, Berlin, v. 17, p. 236-240, 1986.

KOPECKÝ, J.J.; PAVLU, B. Labelling with tritium of certain pyrimidine derivatives by deiodination. Collect Czech Chem Commun, v. 37, p. 2039-2042, 1972.

KORNMANN, B.; SCHAAD, O.; REINKE, H. *et al.* Regulation of circadian gene expression in liver by systemic signals and hepatocyte oscillators. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, Cold Spring Harbor, v. 72, p. 319-30, 2007.

KRSTULOVIC, A.M.; BROWN, P.R.; ROSIE, D.M. Identification of nucleosides and bases in serum and plasma samples by reverse-phase high performance liquid chromatography. Anal Chem, Washington, v. 49, n. 14, p. 2237-2241, Dec. 1977.

KUDELIN, B.K.; GAVRILINA, L.V.; KAMINSKI, Yu.L. Use of HPLC for increasing the molar specific activities of tritium-labelled nucleosides. J Label Comp and Radiopharm, v. 31, n. 9, p. 723-728, Sep. 1992.

KUSAMA, K. Determination of tritium distribution in uracil and uridine. I. J Biochem, Tokyo, v. 63, n. 5, p. 561-565, May 1968.

LABROCINI, P.J.; SEGALL, F.S.; MARTINS, B.A. *et al.* Clavicle fractures - incidence of supraclavicular nerve injury. Rev Bras Ortop, Sociedade Brasileira de Ortopedia e Traumatologia, v. 48, p. 317-321, 2013.

LACANNA, S.N. Recuperação motora após neurotmeze e anastomose do nervo isquiático em ratos Wistar com uso de uma associação de nucleotídeos (CMP e UTP) e vitamina B12 (hidroxocobalamina). XXIX Congresso Brasileiro de Neurocirurgia, Rio de Janeiro, mini-conferência 136, 2012.

LAMARCA, A.; GELLA, A.; MARTIÁÑEZ, T. *et al.* Uridine 5'-triphosphate promotes in vitro Schwannoma cell migration through matrix metalloproteinase-2 activation. PLoS One, San Francisco, v. 6, n. 9(6), e: 98998, Jun. 2014.

LANGFORD, C.J.; SCHEFFER J.W.; JEFFREY P.L. *et al.* The in vitro synthesis of RNA within rat nodose ganglion following vagotomy. J Neurochem, Oxford, v. 34, n. 3, p. 531-539, 1980.

LAPPIN, G. Radiotracers in Drug Development. Boca Raton : Taylor & Francis, 2006. p. 71.

LAURETTI, G.C.; OMALS, M.; PEREIRA, A.C. *et al.* Avaliação clínica do efeito analgésico do complexo citidina-uridina-hidroxocobalamina como coadjuvante no tratamento da dor lombar crônica neuropática. Coluna, São Paulo, v. 3, n. 2, p. 73-76, Jun. 2004.

LAURETTI, G.R.; DELFINO, H.L.A., LIMA, I.C.P.R. *et al.* Efeito analgésico do complexo citidina-uridina-hidroxocobalamina, como coadjuvante no tratamento da dor lombar crônica. 5º Congresso Brasileiro de Dor (Sociedade Brasileira para o Estudo da Dor), Porto de Galinhas, poster 24, 2002.

LAURETTI, G.R.; TREVELIN, W.R.; FRADE, L.C.P. Neuroplastia por via caudal em pacientes portadores de dor lombar pós-laminectomia. Coluna, São Paulo, v. 4, n. 1, p. 27-30, Jan./Fev./Mar. 2005.

LE T.T.; ZIEMBA A.; URASAKI Y., *et al.* Disruption of uridine homeostasis links liver pyrimidine metabolism to lipid accumulation. J Lipid Res. Bethesda, v.54; n.4, p.1044-1057, Apr. 2013.

LEVINE, R.L.; HOOGENRAAD, N.J.; KRETCHMER, N.A. A review: biological and clinical aspects of pyrimidine metabolism. Pediatr Res, Basel, v. 8, n. 7, p. 724-734, Jul. 1974.

LEYVA, A.; VAN GROENINGEN, C.J.; KRAAL, I. *et al.* Phase I and pharmacokinetic studies of high-dose uridine intended for rescue from 5-fluorouracil toxicity. Cancer Res, Chicago, v. 44, p. 5926-5933, Dec. 1984.

LEYVA, A.; SCHORNAGEL, J.; PINEDO, H.M. High performance liquid chromatography of plasma pyrimidines and purines and its application in cancer chemotherapy. Adv Exp Med Biol, New York, v. 122B, p. 389-394, 1979.

LIMA, I.C.P.R.; LAURETTI, G.R.; OLIVEIRA, R. Complexo citidina-uridina-hidroxocobalamina como coadjuvante no tratamento da dor neuropática de membros inferiores em pacientes portadores de polineuropatia diabética. 9º SIMBIDOR. São Paulo, TL 53, 2009.

MARTIÁÑEZ, T.; CARRASCAL, M.; LAMARCA, A. *et al.* UTP affects the Schwannoma cell line proteome through P2Y receptors leading to cytoskeletal reorganisation. Proteomics, Weinheim, v. 12, p. 145-156, Jan. 2012.

MARTIÁÑEZ, T.; LAMARCA, A., CASALS, N. *et al.* N-cadherin expression is regulated by UTP in schwannoma cells. Purinergic Signal, Dordrecht, v. 9, p. 259-270, Jun. 2013.

MARTIN, D.S.; STOLFI, R.L.; SAWYER, R.C. Use of oral uridine as a substitute for parenteral uridine rescue of 5-fluorouracil therapy, with and without the uridine phosphorylase inhibitor 5-benzylacetyluridine. Cancer Chemother Pharmacol, Berlin, v. 24, n. 1, p. 9-14, 1989.

MARTINDALE. The Complete Drug Reference. 37th edition. London : Pharmaceutical Press, 2011, p. 3237.

MARZO, A. Pharmacokinetics of endogenous substances. Boll Chim Farm, Milano, v. 131, n. 5, p. 465-470, May 1992.

McKEAG, M.; BROWN, P.R. Modification of high-performance liquid chromatographic nucleotide analysis. J Chromatogr A, Amsterdam, v. 152, n. 1, p. 253-254, May 1978. *Apud* REISS, P.D.; ZUURENDONK, P.F.; VEECH, R.L. Measurement of tissue purine, pyrimidine, and other nucleotides by radial compression high-performance liquid chromatography. Anal Biochem, Orlando, v. 140, n. 1, Jul. 1984.

MESCHER A.L. Junqueira's Basic Histology. 13th edition. McGraw Hill, 2013. p. 185.

MIBIELLI, M.A.; NUNES, C.P., COHEN, J.C. *et al.* Symptomatic improvement in an acute, non-traumatic spine pain model with a combination of uridine triphosphate,

cytidine monophosphate, and hydroxocobalamin. Pain Studies and Treatment, Delaware, v. 2, n. 1, p. 6-10, 2014.

MIBIELLI, M.A.; NUNES, C.P.; COHEN, J.C., *et al.* Treatment of acute, non-traumatic pain using a combination of diclofenac-cholestyramine, uridine triphosphate, cytidine monophosphate, and hydroxycobalamin. Proc West Pharmacol Soc, Seattle, v. 53, p. 5-12, 2010.

MONKS, A.; CYSYK, R.L. Uridine regulation by the isolated rat liver: perfusion with an artificial oxygen carrier. Am J Physiol, Washington, v. 242, n. 5, p. R465-470, May 1982.

MONTICONE, G.F.; BERGAMASCO, B.; COGNAZZO, A. On the therapeutic use of the nucleosides, cytidine and uridine, in some neurologic diseases. Minerva Med, Torino, v. 57, n. 101, p. 4348-4352, 1966. *Apud* WATKINS, C.; WURTMAN, R.J. Methods for increasing blood cytidine and/or uridine levels and treating cytidinedependent human diseases. USPTO Patent Full-Text and Image Database. United States Patent 6,989,376, Jan. 2006.

MORAVEK, J.; SKODA, J. A simple method for preparation of nucleotides and oligonucleotides labelled with ^{14}C , ^3H and/or ^{32}P by thermic reaction of nucleosides with inorganic phosphate. Conference of preparing and storing labelled compounds, 1966.

MORRIS, G.S.; SIMMONDS, H.A. Use of a fundamental elution protocol for the development of reversed-phase high-performance liquid chromatography enabling rapid simultaneous determination of purines, pyrimidines and allied compounds commonly found in human biological fluids. J Chromatogr, Amsterdam, v. 8, n. 344, p. 101-143, Nov. 1985.

MORRIS, G.S.; SIMMONDS, H.A. A single system for the evaluation of purine and pyrimidine nucleosides and bases together with their analogues in biological fluids. Adv Exp Med Biol, New York, v. 195, p. 593-599, 1986.

MOYER, J.D.; MALINOWSKI, N.; AYERS, O. Salvage of circulating pyrimidine nucleosides by tissues of the mouse. J Biol Chem, Baltimore, v. 260, n. 5, p. 2812-2818, Mar. 1985(a).

MOYER, J.D.; HENDERSON, J.F. Salvage of uridine in the mouse. Effect of uridine phosphorylase pretreatment. Biochem Pharmacol, Oxford, v. 1, n. 34, p. 101-105, Jan. 1985(b).

MOYER, J.D.; OLIVER, J.T.; HANDSCHUMACHER, R.E. Salvage of circulating pyrimidine nucleosides in the rat. Cancer Res, Chicago, v. 41, p. 3010-3017, Aug. 1981.

NEARY, J.T.; RATHBONE, M.P.; CATTABENI, F. *et al.* Trophic actions of extracellular nucleotides and nucleosides on glial and neuronal cells. Trends Neurosci, Amsterdam, v. 19; p. 13-18, 1996.

NISSINEN, E. Analysis of purine and pyrimidine bases, ribonucleosides, and ribonucleotides by high-pressure liquid chromatography. Anal Biochem, Orlando, v. 106, n. 2, p. 497-505, Aug. 1980.

OLIVARES, J.; VERDYS, M. Isocratic high-performance liquid chromatographic method for studying the metabolism of blood plasma pyrimidine nucleosides and bases: concentration and radioactivity measurements. J Chromatogr, Amsterdam, v. 432, n. 1, p. 111-121, Dec. 1988.

PETERS, G.J.; VAN GROENINGEN, C.J.; LAURENSSE, E. *et al.* Effect of pyrimidine nucleosides on body temperatures of man and rabbit in relation to pharmacokinetic data. Pharm Res, Stuttgart, v. 4, n. 2, p. 113-119, Apr. 1987.

PIMENOV, A.M.; TIKHONOV, Yu.V.; MEISNER, I.S. *et al.* Simultaneous separation of ribonucleotides, nucleosides and nitrogen bases by ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography on columns with radial compression. J Chromatogr, Amsterdam, v. 365, p. 221-227, Sep. 1986.

PIZZORNO, G.; PIZZORNO, G.; CAO, D.C. *et al.* Homeostatic control of uridine and the role of uridine phosphorylase: a biological and clinical update. Biochim Biophys Acta, Amsterdam, v. 1587, p. 133-44, Jul. 2002.

POOLER, A.M.; GUEZ, D.H.; BENEDICTUS, R. *et al.* Uridine enhances neurite outgrowth in nerve growth factor-differentiated pheochromocytoma cells. Neuroscience, Oxford, v.134, p.207-214, 2005.

REISS, P.D.; ZUURENDONK, P.F.; VEECH, R.L. Measurement of tissue purine, pyrimidine, and other nucleotides by radial compression high-performance liquid chromatography. Anal Biochem, Orlando, v. 140, n. 1, Jul. 1984.

RIVERA, I.A.; TAVARES DE ALMEIDA, I.; SILVEIRA, C. A single HPLC system for the evaluation of purine and pyrimidine metabolites in body fluids. Adv Exp Med Biol, New York, v. 390B, p. 11-14, 1991.

RO, T.S.; MURAMATSU, M.; BUSCH, H. Labeling of RNA of isolated nucleoli with UTP-¹⁴C. Biochem Biophys Res Commun, New York, v. 14, p. 149-155, 1964.

ROMANOVÁ, D.; NOVOTNÝ, L. Chromatographic properties of cytosine, cytidine and their synthetic analogues. J Chromatogr B Biomed Appl, Amsterdam, v. 12, n. 1, p. 9-15, Jan. 1996.

RUDOLPH, F.B. The biochemistry and physiology of nucleotides. J Nutr, Rockville, v. 124, n. 124, p. 124S-127S, Jan. 1994.

RUDOLPH, F.B.; VAN BUREN, C.T. The metabolic effects of enterally administered ribonucleic acids. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, London, v. 1, n. 6, p. 527-530, Nov. 1998.

RUSTUM, Y.M. High-pressure liquid chromatography. I. Quantitative separation of purine and pyrimidine nucleosides and bases. Anal Biochem, New York, v. 19, n. 1, p. 289-299, Oct. 1978.

RYBA, M; BERÁNEK, J. Liquid chromatographic separation of purines, pyrimidines and their nucleosides on silica gel columns. J Chromatogr A, Amsterdam, v. 211, n. 3, p. 337-346, Jul. 1981.

SÁNCHEZ-POZO, A.; GIL, A. Nucleotides as semiessential nutritional components. Br J Nutr, Cambridge, v. 1, p. S135-137, Jan. 2002.

SANTOS, T.S.; LUDGERO, A.L.; MELO, A.F.M. *et al.* Estudo experimental do Núcleo C.M.P na regeneração nervosa. Rev Cir Traumatol Buco-Maxilo-Fac, v. 9, n. 4, p. 93-98, Dec. 2009.

SHI, L.E.; YING, G.Q.; TANG, Z.X. *et al.* Separation of cytidine 5'-triphosphate biosynthesized from cytidine 5'-monophosphate on ion-exchange resin and HPLC analysis of cytidine compounds. Appl Biochem Biotechnol, Clifton, v. 144, n. 1, p. 1-14, Jan. 2008.

SIDOROV, G.V.; MYASOEDOV, N.F. The solid-state synthesis of tritium labelled heterocyclic bases. J Label Compd and Radiopharm, v. 34, n. 4, p. 353-358, Apr. 1994.

SIGMA-ALDRICH. Disponível em:
<<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/u6750?lang=en®ion=US>>.
Acesso em: 25 ago. 2014(a).

SIGMA-ALDRICH. Disponível em:
<<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/u6375?lang=en®ion=US>>.
Acesso em: 25 ago. 2014(b).

SIGMA-ALDRICH. Disponível em:
<<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search?interface=All&term=cytidine+monophosphate+disodium&N=0&mode=match%20partialmax&focus=product&lang=en®ion=US>>. Acesso em: 25 ago. 2014(c).

SIGMA-ALDRICH. Disponível em:
<<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/850187?lang=pt®ion=BR>>.
Acesso em: 8 jan. 2015.

SILEI, V.; POLITI, V.; LAURO, G.M. Uridine induces differentiation in human neuroblastoma cells via protein kinase C epsilon. J Neurosci Res, New York, v. 61, p. 206-211, Jul. 2000.

SIMMONDS, R.J.; HARKNESS, R.A. High-performance liquid chromatographic methods for base and nucleoside analysis in extracellular fluids and in cells. J Chromatogr, Amsterdam, v. 222, n. 2, p. 369-381, Dec. 1981.

SJÖRBERG J.; KANJE M. Incorporation of [³²P]phosphate into nucleotides of the dorsal root ganglia of regenerating rat sciatic nerve. Brain Res, Amsterdam, v. 415, p. 270-274, Jul. 1987.

SNETKOVA, E.V.; KAMINSKII Yu.L.; AKULOV, G.P. *et al.* Enzymatic synthesis of multiple tritium-labeled nucleosides and nucleotides from nitrogen bases and ribose. Chem Natur Comp, v. 24, n. 2, p. 221-226, Mar.-Apr. 1988.

SNYDER, L.R. (Coord.). Introduction to Modern Liquid Chromatography. 3rd edition. New Jersey : Wiley, 2010. p. 1-438.

SOLINO, J.L.; MELO, M.F.F.V.; SILVA, D.H. *et al.* Traumatismos da coluna vertebral: avaliação da etiologia, incidência e frequência. Rev Bras Ortop, Sociedade Brasileira de Ortopedia e Traumatologia, v. 25, n. 6, p. 185-90, 1990.

SONODA, T.; TATIBANA, M. Metabolic fate of pyrimidines and purines in dietary nucleic acids ingested by mice. Biochim Biophys Acta, Amsterdam, v. 521, p. 55-56, 1978.

SPECTOR, R. Nucleoside transport in choroid plexus: mechanism and specificity. Arch Biochem Biophys, New York, v. 216, n. 2, p. 693-703, Jul. 1982.

SPECTOR, R. Uridine transport and metabolism in the central nervous system. J Neurochem, New York, v. 45, p. 1411-1418, Nov. 1985.

SUNDERLAND, S. Nerves and Nerve Injuries. 2nd edition. Edingburgh: Churchill Livingstone, 1978. cap.6-8, p. 70-132.

TATAGIBA, M. (Coord.). Nervos Periféricos. Diagnóstico e Tratamento Clínico e Cirúrgico. Rio de Janeiro : Revinter, 2003. 223 p.

THE COMMON TECHNICAL DOCUMENT - DMF. Cytidine 5'-Monophosphate Disodium Salt. Oct., 2013(b).

THE COMMON TECHNICAL DOCUMENT - DMF. Uridine Triphosphate Trisodium Salt. Aug., 2013(a).

TOGUZOV, R.T.; TIKHONOV, I.U.V.; PIMENOV, A.M. *et al.* Determination of purine and pyrimidine derivatives in acid-soluble fractions of organs and tissues using high-performance reverse-phase ion-pair chromatography. Vopr Med Khim, Moscow, v. 33, n. 1, p. 133-138, Jan.-Feb. 1987.

TOSHCHAKOV, V.Y.; BASHKINA, L.V.; ONISHCHENKO, N.A. *et al.* An isocratic, reversed-phase HPLC method for the determination of postischemic efflux of purines and pyrimidines during reperfusion of isolated liver. Biochemistry, Moscow, v. 63, n. 2, p. 219-223, Feb. 1998.

TOWNSEND, L.B. Chemistry of nucleosides and nucleotides (vol. 3). New York : Plenum Press, 1994. 549 p.

TRAUT, T.W. Physiological concentrations of purines and pyrimidines. Mol Cell Biochem, The Hague, v. 140, p. 1-22, 1994.

TSENG, J.; BARELKOVSki, J.; GURPIDE, E. Rates of formation of blood-borne uridine and cytidine in dogs. Am J Physiol, Washington, v. 221, n. 3, p. 869-78, Sep. 1971.

VAALBURG, W.; VAN ZANTEN, B.; BUIJZE, C. A rapid procedure for the preparation of [5-³H]cytidine. Recu Trav Chim Pays-B, v. 87, n. 7, p. 827-832, 1968.

VAN GROENINGEN, C.J.; LEYVA, A.; KRAAL, I. *et al.* Clinical and pharmacokinetic studies of prolonged administration of high-dose uridine intended for rescue from 5-FU toxicity. Cancer Treat Rep, Silver Spring, v. 70, p. 745-750, 1986.

VAN GROENINGEN, C.J.; PETERS, G.J., NADAL, J.C. *et al.* Clinical and pharmacologic study of orally administered uridine. J Natl Cancer Inst, Bethesda, v. 83, n. 6, p. 437-441, Mar. 1991.

VAN GROENINGEN, C.J.; PETERS, G.J.; PINEDO, H.M. Reversal of 5-fluorouracil-induced toxicity by oral administration of uridine. Ann Oncol, London, v. 4, n. 4, p. 317-320, Apr. 1993.

VOET, D.; VOET J.G.; PRATT C.W. Fundamentals of Biochemistry. Danvers : Wiley, 2013. cap. 3, p. 40-73, p. 800-803.

WANG, L.; ALBRECHT, M.A.; WURTMAN, R.J. Dietary supplementation with uridine-5'-monophosphate (UMP), a membrane phosphatide precursor, increases acetylcholine level and release in striatum of aged rat. Brain Res, v. 1133, n. 1, p. 42-8, Feb. 2007.

WANG, L.; POOLER, A.M.; ALBRECHT, M.A. *et al.* Dietary uridine-5'-monophosphate supplementation increases potassium-evoked dopamine release and promotes neurite outgrowth in aged rats. J Mol Neurosci, Boston, v. 27, p. 137-145, 2005.

WATKINS, C.; WURTMAN, R.J. Methods for increasing blood cytidine and/or uridine levels and treating cytidine dependent human diseases. USPTO Patent Full-Text and Image Database. United States Patent 6,989,376, Jan. 2006.

WATKINS, C.; WURTMAN, R.J. Uridine administration stimulates membrane production. USPTO Patent Full-Text and Image Database. United States Patent 8,314,064 B2, Nov. 2012.

WATTIG, B.; SCHALOW, G.; HEYDENREICH, F. *et al.* Enhancement of nerve fibre regeneration by nucleotides after peripheral nerve crush damage. Electrophysiologic and morphometric investigations. Arzneim-Forsch/Drug Res, Aulendorf, v. 42, n. 9, p. 1075-1078, Sep. 1992(a).

WATTIG, B.; SCHALOW, G.; HEYDENREICH, F. *et al.* Nucleotide beschleunigen die nervenregeneration (*tradução: Nucleotídeos aceleram a regeneração neural*). Z Klin Med, v. 46, p. 1371-1373, 1991.

WATTIG, B.; SCHALOW, G.; MADAUSS, M., *et al.* Acceleration of nerve and muscle regeneration by administration of nucleotides - electrophysiological and morphometrical investigations. Acta Histochemica, Germany, Suppl.-Band XLII, s333-339, 1992(b).

WEINBERG, M.E.; ROMAN, M.C.; JACOB, P. *et al.* Enhanced uridine bioavailability following administration of a triacetyluridine-rich supplement. PLoS One, San Francisco, v. 17, n. 2, p. e14709, Feb. 2011.

WEINBERG, M.E.; ROMAN, M.C.; JACOB, P. *et al.* Single dose and cumulative pharmacokinetics of the food supplement NucleomaxX and mechanism for enhanced bioavailability of uridine. 9th International Workshop on Adverse Drug Reactions and Lipodistrophy in HIV, Sydney, Abstract P-06, 2007.

WEISSMAN, S.M.; LEWIS, M.; KARON, W. The metabolism of isotopically labeled uracil and uridine in man. Metabolism, New York, v. 12, p. 60-67, Jan. 1963.

WILLIAMS, M.G.; PALANDRA, J.; SHOBE, E.M. Rapid determination of rat plasma uridine levels by HPLC-ESI-MS utilizing the Captiva plates for sample preparation. Biomed Chromatogr, London, v. 17, n. 4, p. 215-218, Jun. 2003.

WILLIAMS, T. Disponível em:

<http://drtedwilliams.net/kb/index.php?pagename=BB%20491%20Nucleic%20Acid%20Anabolism>. Acesso em: 5 jan. 2015.

WILSON, T.H.; WILSON, D.W. Studies in vitro of digestion and absorption of pyrimidine nucleotides by the intestine. J Biol Chem, Baltimore, v. 233, n. 6, p. 1544-1547, Dec. 1958.

WUNG, W.E.; HOWELL, S.B. Simultaneous liquid chromatography of 5-fluorouracil, uridine, hypoxanthine, xanthine, uric acid, allopurinol, and oxipurinol in plasma. Clin Chem, Baltimore, v. 26, n. 12, p. 1704-1708, Nov. 1980.

WURTMAN, R.J. Uridine administration improves phosphatide synthesis, synaptic transmission and cognitive function. USPTO Patent Full-Text and Image Database. United States Patent 8,143,234, Mar. 2012.

WURTMAN, R.J.; CANSEV, M.; ULUS, I.H. Handbook of Neurochemistry. Berlin : Springer-Verlag, 2006(b). p. 1-40.

WURTMAN, R.J.; ULUS, I.H.; CANSEV, M. *et al.* Synaptic proteins and phospholipids are increased in gerbil brain by administering uridine plus docosahexaenoic acid orally. Brain Res, Amsterdam, v. 1088, p. 83-92, 2006(a).

XU, G; ENDERLE, H; LIEBICH, H. *et al.* Study of normal and modified nucleosides in serum by RP-HPLC. Chromatographia, Braunschweig, v. 52, n. 3, p. 152-158, Aug. 2000.

YAMAMOTO, T.; KOYAMA, H.; KURAJOH, M. *et al.* Biochemistry of uridine in plasma. Clin Chim Acta, Amsterdam, v. 412, n. 19-20, p. 1712-1724, Sep. 2011.

YAMAMOTO, T.; MORIWAKI, Y.; TAKAHASHI, S. *et al.* Effect of beer on the plasma concentrations of uridine and purine bases. Metabolism, New York, v. 51, n. 10, p. 1317-1323, Oct. 2002.

YOSHIDA, S.; HIROSE, S.; IWAMOTO, M. Use of 4-bromomethyl-7-methoxycoumarin for derivatization of pyrimidine compounds in serum analysed by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. J Chromatogr, Amsterdam, v. 383, n. 1, p. 61-68, Nov. 1986.

ZAKARIA, M.; BROWN, P.R. High-performance liquid chromatography of nucleotides, nucleosides and bases. J Chromatogr, Amsterdam, v.226, n. 2, p. 267-290, Dec. 1981.

ZHANG, D.; CAO, D.; RUSSEL, R. *et al.* p53-Dependent suppression of uridine phosphorylase gene expression through direct promoter interaction. Cancer Res, Chicago, v. 61, p. 18, p. 6899-6905, Sep. 2001.

ZILLY, M.; LANGMANN, P.; WINZER, R. *et al.* Liquid chromatographic method for the determination of uridine in human serum. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, Amsterdam, v. 803, n. 2, p. 345-351, Apr. 2004.