

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA

**O Fenômeno de Lente Térmica em amostras
de DNA Livre Circulante de Pacientes com
Malignidade e Sãos, Investigado por meio da
Técnica de Varredura-Z.**

Luiz Henrique da Silva

Orientador: Prof. Dr. Antônio Martins Figueiredo Neto

Co-Orientadora: Profa. Dra. Sarah I. P. M. N. Alves

Dissertação de mestrado apresentada ao Instituto de Física para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Antônio Martins Figueiredo Neto (Orientador), IFUSP.

Profa. Dra. Lígia Ferreira Gomes , FCF/USP.

Profa. Dra. Lígia Ajaime Azzalis , UNIFESP.

São Paulo

2017

FICHA CATALOGRÁFICA
Preparada pelo Serviço de Biblioteca e Informação
do Instituto de Física da Universidade de São Paulo

Silva, Luiz Henrique da

O fenômeno de lente térmica em amostras de DNA livre circulante de pacientes com malignidade e sãos, investigado por meio da técnica de varredura-Z. São Paulo, 2017.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Física. Depto. de Física Experimental

Orientador: Prof. Dr. Antonio Martins Figueiredo Neto

Área de Concentração: Física

Unitermos: 1. Óptica não linear; 2. Varredura Z; 3. Biomarcador tumoral; 4. DNA livre circulante.

USP/IF/SBI-014/2017

Aos meus pais, que sempre apoiaram e incentivaram.

Agradecimentos

Agradeço à Francielle Sezotzki pelo carinho, pelo apoio e por sempre acreditar, por se ter doado incondicionalmente e inúmeros momentos felizes, obrigado, Fran, por ser a pessoa que é, pelo fato de ensinar a lição mais valiosa que jamais poderia apreender!

Minha mais profunda gratidão à Prof. Dr^a. Sarah Alves, minha coorientadora por acreditar quando eu mesmo duvidei, pelo incentivo e carinho sem medida, obrigado, Sarah, por despertar o potencial de realização em minha vida!

Agradeço ao Prof. Dr. Antônio Martins Figueiredo Neto, meu orientador, a quem tenho profundo carinho, admiração e respeito pela pessoa e pelo profissional que é, grande exemplo de pesquisador e líder! Obrigado, Professor!

Agradeço ao Prof. Dr. Fernando Luiz Affonso Fonseca, quem muito colaborou para o estudo fornecendo as amostras investigadas e pelas discussões que contribuíram para o aprofundamento das mesmas, obrigado Fernando, pelo incentivo e motivação durante o estudo!

Aos amigos queridos do Grupo de Fluidos Complexos: Fernando Bataglioto, Eduardo Sell Gonçalves, André Sehen, Maximillian, Eva, Paulo, Aline Sanchez, Gadher, Arnaldo Oliveira, Daniel Espinosa, Dennys Reis, Odair Gime-nes, Igino, Ellen, Juliana, Bárbara, Pedro, Renata Naporando, Társis Ger-mano, pelos cafés, conversas e abraços, essa jornada sem o apoio de vocês não seria possível.

Aos amigos queridos que os corredores da vida me trouxeram: Fernanda Lopes Guarnieri, Aluísio Ramos, Bruna Bertolucci Miraya, Martha Costa, Paulo Junior, Nathália do Vale, Bruna de Jesus, Adriana, Camila Gervaz, Antonio Góes, Raffaella de Rosa, Natasha Hoff, Bruna Patrícia, Anderson Lima, Ana Paula, Oswaldo, Caio Pimentel, Gerson Pessoto, Andressa Regina, Angélica Koga, Lorena Mazzo, Alana Patrícia, Karina Oliveira, André Luiz, Glaucia, Ricardo Cesar Duarte, Thadeu Luiz Fayão, Carlos Hermando, Willian Conti, Augusto Cesar Ferreira Guiçardi, Fausto Spinazola do Prado, Fernando Domingues Mamut, Aniel Carlos Teixeira. Pedro Ishida, Rafael Hiratsuca Pie-roni, Reuel Martinez. Obrigado por me lembrarem que a nossa vida só faz

sentido em meio a outras vidas.

Agradeço aos amigos queridos do IFUSP (Diogo Soga, Rita, Celso Luiz Risi, Cassio Alves, Priscila Santos, Emerson, Vivian, Alexsander Ramos Duarte), Crusp, Forró e Gafeira IO, Psico Salsa Cubana, Projete e Liberdade Capoeira, e aos guerreiros do Rugby: Demônios de Maxwell, tenho orgulho de fazer parte dessa "se anama itá". E aos tantos que se não recentirem pela gratidão não expressa de seus nomes.

Agradeço aos amigos lá da pequena Altinópolis - SP. Minha cidadezinha, as pessoas que cresceram comigo, muito obrigado por serem sempre presentes em minha vida.

Sou grato à minha família que sempre ofereceu calor e acolhimento nos momentos mais frios e nas maiores tempestades existenciais, obrigado família, por ser assim... tão grande!

Agradeço às minhas sobrinhas: Maria Luiza e Gabriela, à minha querida irmã Cristhiane Márcia pelo amor gigantesco, pelos momentos felizes que compartilhamos, e aos meus amados pais: Luiz Carlos e Tereza Bárbara, eu me orgulho de ser seu filho! Obrigado, simplesmente, por tudo!

Conteúdo

1	Introdução	1
1.1	Técnica de Varredura Z	7
1.2	O Modelo de Lente Térmica Aberrante	9
1.3	Objetivos	10
1.3.1	Gerais	10
1.3.2	Específicos	11
2	Descrição Experimental	12
2.1	Varredura Z	12
2.2	Material de Estudo e preparação de amostras	13
2.2.1	Extração de DNA Plasmático	14
2.2.2	Preparação	15
3	Resultados e Análise de Dados	16
3.1	Teste de Estabilidade: Repetição ao Longo do Tempo e Estabilidade Pós Preparo	17
3.2	Teste de Reprodutibilidade	20
3.3	Medidas de Varredura Z de DNA Livre Circulante	20
3.3.1	Medidas de Absorvância	22
3.3.2	Teste de Proporção	23
3.3.3	Avaliação Final	24
4	Considerações Finais	29
A	Valores das Amplitudes Térmicas das amostras de DNA LC.	34

A.1	Dados Experimentais das amostras do Grupo Controle e da Solução de Fundo medidas pelo Z-Scan.	35
A.2	Dados Experimentais do Grupo de Estudo medidas pelo Z-Scan.	36

Lista de Figuras

1.1	Apresentação esquemática dos vários caminhos através dos quais os ácidos nucleicos são libertados para a circulação. *Outros incluem células nucleadas, células T, etc; Adaptado de [16].	5
1.2	Esquema experimental básico da técnica de Varredura Z	7
1.3	Curva característica da transmitância normalizada do experimento de Varredura Z. A presença de um vale seguido por um pico caracteriza o comportamento de lente convergente	8
2.1	Esquema da montagem de Varredura Z para estudo de efeitos térmicos. L1, L2 e L3: lentes; OB: o obturador mecânico; DF: divisor de feixe; D1 e D2: fotodetectores	13
3.1	Curva de Varredura Z para solução de DNA em água Milli-Q.	16
3.2	Curva de Varredura Z para solução de fundo (Brometo de Etídio em água Milli-Q 1:1000).	17
3.3	Curva característica de varredura Z para uma amostras de paciente oncológico. A curva em vermelho representa a média de 10 corridas e a curva em preto representa uma corrida com 10 aquisições por posição.	19
3.4	Curva característica de Varredura Z em função do tempo de preparo da amostra	19
3.5	Curva de Varredura Z de 3 amostras de DNA de um mesmo paciente.	20
3.6	Curva característica de Varredura Z da amostra D4 - Grupo Controle	21
3.7	Curva característica de Varredura Z da amostra B6 - Grupo de Estudo	21
3.8	Espectro de Absorvância da Solução - Brometo de Etídio e água Milli-Q (Fundo), de uma amostra Grupo Controle (Amostra GC) e de uma amostra do Grupo de Estudo (Amostra GE).	22

3.9	θ em função da proporção de DNA dos grupos controle e de estudo.	23
3.10	θ em função da concentração de DNA.	24
3.11	Distribuição de θ ajustados pelo Modelo de Lente Térmica Aberrante dos Grupos de Controle (GC) e de Estudo (GE).	25
3.12	Distribuição da razão de θ pela concentração de DNA dos Grupos de Controle (GC) e de Estudo (GE).	25

Lista de Tabelas

3.1	Associação dos pacientes com câncer e sem câncer segundo os métodos de diagnóstico.	26
3.2	Associação dos pacientes com câncer e sem câncer segundo os métodos de diagnóstico.	27
3.3	Concordância de Lin e Coeficiente de concordância de Bland & Altman para mensuração do Método 2, Z-scan entre os métodos de análise laboratorial e Método 1.	27
A.1	Dados Experimentais do G.C. e da S1	35
A.2	Dados Experimentais do G.E.	36

Resumo

No presente estudo investigou-se amostras de plasma com DNA livre circulante (DNA LC) por meio da técnica Varredura Z. Esta é uma técnica eficiente na determinação de parâmetros de diferentes materiais, tais como cristais líquidos, ferrofluidos e compostos biológicos. Esta experiência é realizada através da focalização de um feixe laser de perfil gaussiano numa amostra. Na medida em que a amostra se aproxima do foco da lente, a intensidade do feixe aumenta e alcança seu valor máximo no ponto focal, então diminui para pontos distantes do foco. Na região próxima ao ponto focal se amplificam os fenômenos não-lineares. Recentemente foi demonstrado que níveis elevados de DNA LC no plasma ocorrem com frequência em pacientes com vários tipos de câncer, podendo ser utilizados para discriminar pacientes com malignidade de pessoas saudáveis. As amostras de DNA LC, submetidas ao experimento Varredura Z, forneceram respostas ópticas devido ao fenômeno de lente térmica. Os resultados revelaram que a amplitude de lente térmica das amostras extraídas do plasma de pacientes com malignidade difere daquela de doadores sãos. A técnica Varredura Z se mostrou mais vantajosa em relação a outras biológicas porque revelou uma maior diferença entre os grupos estudados e tem o caráter de detectar mudanças estruturais no DNA LC.

Palavras Chave. óptica não - linear, lente térmica, varredura z, DNA livre circulante, biomarcador tumoral.

Abstract

In the present study plasma samples with cell-free DNA were investigated by means of the Z-Scan technique. This is a powerful technique in determining parameters of different materials, such as liquid crystals, ferrofluids and biological compounds. This experiment is performed by focusing a Gaussian profile laser beam on a sample. As the sample approaches the focus of the lens, the intensity of the beam increases and reaches its maximum value at the focal point, then decreases to points distant from the focus. In the region near the focal point non-linear phenomena are amplified. It has recently been demonstrated that high levels of plasma cell-free DNA occur frequently in patients with various cancers and can be used to discriminate patients with malignancy from healthy donors. The cell-free DNA samples, submitted to the Z-Scan experiment, provided optical responses due to the thermal lens phenomenon. The results revealed that the thermal lens amplitude of samples extracted from the plasma of patients with malignancy differs from that of healthy donors. The Z-Scan technique was more advantageous than other biological ones because it revealed a greater difference between the studied groups and has the character of detecting structural changes in cell-free DNA.

Keywords. nonlinear optics, thermal lens, Z - Scan, cell free DNA, cancer biomarker.

Capítulo 1

Introdução

O contínuo crescimento populacional, aliado ao seu envelhecimento, afetará de forma significativa o impacto do câncer no mundo, principalmente, os países de baixo e médio desenvolvimento. [1] Em 2016, a IARC/OMS (Agência Internacional para Pesquisa em Câncer) estimou 14,1 milhões de casos novos, 13% de todas as mortes no mundo a cada ano e 8,2 milhões de óbitos por câncer no mundo. Os principais tipos de câncer com maior mortalidade foram: pulmão (1,31 milhões de óbitos), estômago (780 mil óbitos) e fígado (699 mil óbitos). [1]

Para o Brasil, o INCA (Instituto Nacional do Câncer) estima que haverá 596.070 novos casos de câncer em 2016. Segundo dados do INCA, pele, próstata e mama serão os cânceres mais incidentes na população. O tipo de câncer mais incidente em ambos os sexos será o de pele não melanoma (175.760 casos novos a cada ano, sendo 80.850 em homens e 94.910 em mulheres), que corresponde a 29% do total estimado. Entre os homens a estimativa serão próstata (61.200 novos casos/ano), pulmão (17.330), cólon e reto (16.660), estômago (12.920), cavidade oral (11.140), esôfago (7.950), bexiga (7.200), laringe (6.360) e leucemias (5.540). Entre as mulheres, serão de mama (57.960), cólon e reto (17.620), colo do útero (16.340), pulmão (10.860), estômago (7.600), corpo do útero (6.950), ovário (6.150), glândula tireoide (5.870) e linfoma não-Hodgkin (5.030).

O câncer é o nome dado a um conjunto de doenças que compartilham o fato de possuírem um crescimento desordenado (maligno) de células que invadem os tecidos e órgãos, há a possibilidade dessas células se espalharem (metástase) para outros órgãos/sistemas do organismo. [1]

Há vários tipos de cânceres, provenientes de vários tipos de célula, podendo ser clas-

sificados como: cânceres sólido, os carcinomas (esse câncer possui seu início em tecido epitelial, como a pele) e sarcomas (que iniciam-se em tecidos conjuntivos, como os ossos e músculos); e não sólido, a leucemia (as células da medula óssea se tornam anormais e passam a substituir e afetar a produção das plaquetas, hemácias e glóbulos brancos) e o linfoma (tem seu desenvolvimento nos gânglios linfáticos, o glóbulo branco passa a ser uma célula maligna e cresce desordenadamente). [1]

A partir do avanço na expectativa de vida na população mundial, constata-se o desenvolvimento de vários tumores pois as células ao longo dos anos são expostas de maneira prolongada e acumulada a fatores de risco que acarretarão a oncogenese, fatores esses que alteram a estrutura genética (DNA) das células. O desenvolvimento do câncer de pulmão é diretamente proporcional a quantidade de cigarros consumidos por dia ao longo dos anos, um fato interessante é a relação íntima entre o tabagismo e o câncer de bexiga, esse câncer é desenvolvido em uma parcela adulta e é mais expressiva em fumantes, já crianças não possuem câncer de bexiga. Estudos apontam evidências que relacionam o excesso de peso ao desenvolvimento de alguns tipos de câncer, como os de cólon e reto, mama (na pós-menopausa), ovário, próstata, esôfago e endométrio. [1]

Pelo fato do câncer ser uma doença multifatorial e diversos fatores concorrerem e se sobrepõem para o seu favorecimento, a hereditariedade exerce um importante papel na oncogenese. Determinados grupos étnicos possuem maior propensão ou menor para o desenvolvimento de um tumor, a leucemia linfocítica é rara em asiáticos, já o sarcoma de Ewing é raro em população negra. [1]

O surgimento do câncer no paciente relaciona-se ao seu histórico familiar, através do núcleo celular, esse histórico é arquivado no gene, o DNA fornece instruções para a organização, estruturação e o funcionamento celular, logo, o funcionamento natural do organismo. Ao ser exposto a fatores de risco ou mesmo quando se ocorre alterações ao longo dos anos no material genético, essas informações passam a serem executadas erroneamente comprometendo o bom funcionamento da atividade celular, ocasionando a cancerização das células normais [1]. Nesse contexto, investigar os fragmentos de DNA pode ser um promissor indicativo no acompanhamento do quadro clínico, ou ainda, na regressão do tumor frente a um tratamento.

O diagnóstico do câncer, de maneira geral, envolve várias estratégias que perfaz desde a detecção precoce a partir de métodos de prevenção específicos para cada câncer até os

métodos efetivos de confirmação diagnóstica como anátomo-patológico, exames de imagem e avaliações laboratoriais diversas.

Dentre as avaliações laboratoriais, os marcadores tumorais, vêm sendo amplamente investigados. Esses marcadores tumorais são macromoléculas produzidas por um tumor ou pelo indivíduo em resposta à presença de um tumor.

Esses marcadores classificadamente podem ser proteínas, antígenos onco-fetais, hormônios, genes ou receptores. Alguns são característicos de um determinado tecido, enquanto outros, são associados à diversos tecidos. A interpretação dos níveis de marcadores tumorais quando elevados pode indicar não somente o câncer mas também outros processos como doenças inflamatórias e tumores benignos. Para uso diagnóstico, o marcador tumoral ideal deve ser sensível o suficiente para detectar a doença nos estágios iniciais, além de específico para um determinado tipo de câncer. Por esse motivo, seu principal uso na clínica é a avaliação da progressão da doença e monitoramento após início do tratamento. [2]

Além disso, outro uso atribuído aos marcadores tumorais é o acompanhamento das dosagens séricas de marcadores tumorais em pacientes em remissão oncológica quando se trata de recidivas: a recorrência do câncer pode ser detectada precocemente, de forma que o paciente receba tratamento de forma rápida e assertiva. A detecção da recorrência pode definir mudanças no protocolo terapêutico utilizado. É nesse contexto que a detecção de DNA livre circulante pode ser inserida uma vez que o seu estudo parece corroborar para sugerir a presença de tumores diversos e ainda acompanhar os pacientes em relação ao tratamento proposto. [3]

Em pacientes portadores de câncer o DNA LC também demonstra variáveis qualitativas nas características dos tumores. Alguns autores relatam que especificamente pequenos fragmentos de DNA LC de origem primária apoptótica estão aumentados em pacientes portadores de câncer. Entretanto, há também autores que descrevem grandes fragmentos de DNA que aparentemente provém da necrose celular, como fator discriminante entre pacientes portadores de câncer (que possuem esse DNA LC elevado) e pacientes saudáveis. Esses resultados implicam que o aumento do nível de DNA LC pode ser causado por apoptose ou necrose sendo essa origem dependente das características do tumor.

O DNA Livre Circulante foi primeiramente descrito em 1948 por Mandel e Métasis. [4] Somente em 1960 novas pesquisas envolvendo o DNA LC foram realizadas. Um maior

interesse nessa área surgiu na década de 1970 com a detecção do aumento da concentração de DNA LC no soro de pacientes com câncer, mas a origem desse DNA LC ainda era desconhecida.[5]

No final da década de 70, o aumento de DNA Livre Circulante (DNA LC) foi detectado no plasma de muitos pacientes portadores de câncer. Mais recentemente, foi demonstrado que níveis elevados de DNA LC no plasma ocorrem frequentemente em vários tipos de cânceres e pode ser usado para discriminar pacientes portadores de neoplasias malignas de pacientes saudáveis e portadores de neoplasias benignas, a observação do aumento no nível de fragmentos grandes (necróticos) de DNA LC foi associado a um estágio mais avançado de tumor em pacientes com câncer respiratório. [6]

Até agora, nível de fragmentos de DNA LC e seu respectivo tamanho não foram muito estudados em pacientes com tumores sólidos. Estudos demonstram que mudanças na metilação do DNA LC estão envolvidas em neoplasias iniciais e na progressão do tumor. A metilação do DNA controla várias funções do genoma e são de fundamental importância durante a morfogênese, para o desenvolvimento celular de maneira normal a metilação controla a recombinação durante a meiose, a replicação, estabiliza e mantém a expressão gênica, regulariza e diferencia a célula e inativa o cromossomo X. Ao se observar aberrações no padrão de metilação, que são atuantes no gene, constata-se a perda da função desse gene, esse quadro é mais frequente que uma mutação genética [7]. O interesse no campo da metilação do DNA LC foi originalmente estimulado pela observação de que tumores tinham frequentemente uma hipometilação comparado ao tecido normal. Autores sugerem que tal hipometilação possa levar a uma instabilidade genômica e contribuir com o fenótipo do tumor como também no prognóstico [8]. Devido a esses fatos são necessários mais estudos que comprovem a eficiência da contribuição do fragmento de DNA LC no diagnóstico e prognóstico do câncer, tendo em vista sua indicativa de sensibilidade para tal patologia.

O mecanismo pelo qual os ácidos nucléicos tumorais são lançados na circulação ainda não foi totalmente elucidado, alguns autores propõem que essas moléculas são oriundas da necrose de células tumorais. O processo necrótico liberaria para a circulação moléculas de DNA mais íntegras. Já o DNA oriundo de células normais seria liberado para a circulação como resultado do seu processo apoptótico natural e, conseqüentemente, consistiria de fragmentos de DNA resultantes do processo apoptótico. [9, 10] Portanto, os fragmentos

de DNA lançados por tecidos normais seriam menores e uniformes, resultado da sua condensação no processo de apoptose, já o DNA lançado na circulação pelo tumor, por necrose de suas células, seria mais íntegro e nesse material seria, por conseguinte, mais adequado para se estudar as alterações genéticas pertinentes. [10]

Em 1994 dois grupos de pesquisas confirmaram a hipótese levantada por Stroun e colaboradores [11] de que o DNA LC detectado em pacientes com câncer apresentavam características do DNA LC do tumor. [12, 13]

Mas as pesquisas envolvendo o DNA LC só começaram a aumentar após o ano de 1996 quando dois grupos reportaram a presença de tumor associado a alterações de microssatélites no plasma e soro de pacientes com câncer. [14, 15]

O mecanismo exato pelo qual o DNA LC é liberado no plasma ainda não é tão compreendido, Vishnu e Rajeswari [16] desenharam uma apresentação esquemática dos vários caminhos possíveis pelos quais o DNA é liberado na circulação (Figura 1.1).

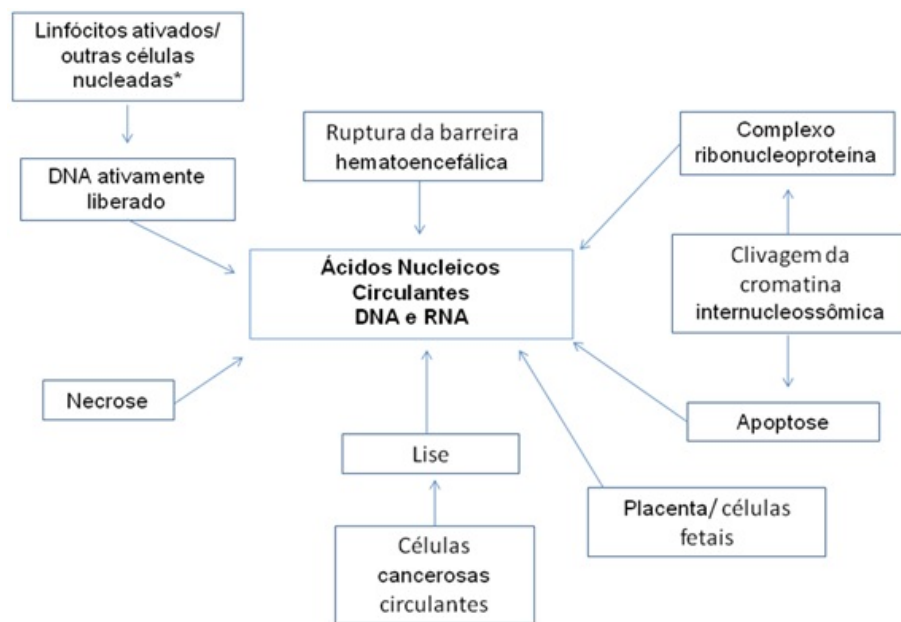


Figura 1.1: Apresentação esquemática dos vários caminhos através dos quais os ácidos nucleicos são libertados para a circulação. *Outros incluem células nucleadas, células T, etc; Adaptado de [16].

Sabine e colaboradores [17] sugeriram que o DNA LC poderia principalmente ser de origem de células apoptóticas ou necróticas, e que o tamanho desse DNA LC distribuído poderia ser usado para determinar a origem do DNA LC. Os fragmentos de DNA LC encontrado no plasma de pessoas saudáveis têm como principal origem as células apoptóticas, e que resultam na produção de pequenos e uniformes fragmentos de DNA LC. [10] O DNA LC liberado de células malignas pode ser originado por necrose, autofagia, catástrofe mitótica e apoptose, processos nos quais geram fragmentos maiores do que os de origem apoptóticas devido a incompleta digestão do DNA LC genômico por um variedade de dessorribonucleases. [18] Atualmente vários grupos de pesquisas estudam o DNA LC em várias patologias, entre elas o câncer, com o propósito de tornar esse DNA LC um biomarcador. [19, 20] Entretanto, sabe-se que talvez os métodos de detecção podem não detectar tais fragmentos. A espectrofotometria é um exemplo disso. [21]

Desse modo, alternativas metodológicas que possam contribuir conferindo limites de detecção sensíveis pode ser uma maneira de associar a detecção desses fragmentos com os parâmetros clínicos e laboratoriais já existentes e utilizados na prática oncológica. O método de Varredura Z (Z-Scan) aplicado a detecção do DNA LC pode ser uma alternativa metodológica inovadora e suficiente para conferir sensibilidade a essas detecções.

Nos últimos anos, a técnica de Varredura Z [22, 23] é utilizada para o estudo do processo de estresse oxidativo de lipoproteínas humanas [24, 25, 26, 27], e para relacionar a aterosclerose com a doença periodontal [28], para quantificar os níveis de colesterol total [29], triglicérides [29], proteína [30], albumina [30], e glicose [31] no sangue.

Em 2004, Gomez e colaboradores [26] aplicaram a técnica de Varredura Z na caracterização de soluções de lipoproteínas humanas de modo a verificar sua assinatura não linear. As lipoproteínas estavam em seus estados: nativo e oxidado, este último obtido por meio da introdução de compostos de cobre e por meio de sonicação da solução (a sonicação promove o surgimento de radicais livres OH^- que agem no sentido de induzir modificações controladas nas lipoproteínas). Gomez mostrou que a assinatura não linear depende do nível de oxidação das lipoproteínas.

Em especial, a técnica de Varredura Z apresentou-se como uma boa ferramenta de análise para quantificar o nível de peroxidação lipídica, visto que o processo de peroxidação lipídica [27] ocorre por diversos mecanismos, incluindo aqueles nos quais estão envolvidos os radicais livres e os controlados enzimaticamente.

Monteiro [28] em 2009 estudou os fatores de risco associados com a aterosclerose em pacientes com periodontite. Nesse estudo foi comparada a resposta não linear das lipoproteínas de pacientes sem doença periodontal, com pacientes com diferentes estágios da doença e verificou-se que pacientes com a doença periodontal apresentam uma resposta não linear de suas lipoproteínas menor que os pacientes saudáveis.

Dhinaa [29, 30, 31] mostrou que a técnica de Varredura Z é uma boa ferramenta para quantificar os níveis de colesterol total, triglicérides, proteína, albumina e glicose no sangue de pacientes. Os resultados obtidos por Dhinaa com a técnica de Varredura Z apresentaram ótima concordância com os resultados obtidos através do método enzimático-colorimétrico usados na prática clínica laboratorial.

1.1 Técnica de Varredura Z

A técnica de Varredura Z é amplamente utilizada no estudo das propriedades óptica não lineares de vários materiais. Essa técnica foi desenvolvida por Sheik Bahae e colaboradores [22, 23] para estudar o índice de refração não linear n_2 de um material causado por um campo óptico intenso. Nessa técnica é considerado a relação entre a transmitância de um feixe laser ao passar pelo material, observada em um campo distante, e a distorção de fase induzida no feixe laser ao passar pelo material e consiste em deslocar uma amostra do material em estudo ao longo da direção de propagação (eixo Z) de um feixe laser com perfil gaussiano focalizado, na proximidade da região focal $z = 0$ (Figura 1.2).

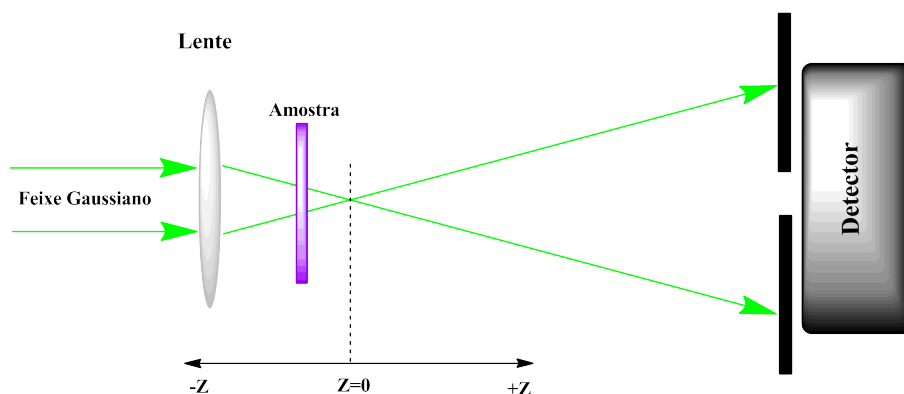


Figura 1.2: Esquema experimental básico da técnica de Varredura Z

Um fotodetector é posicionado atrás de uma íris e ambos estão localizados em um ponto distante da região focal. O fotodetector medirá a variação de intensidade do feixe

transmitida pela amostra ($I(z)$), em função da posição da amostra. A variação de intensidade ($I(z)$) é dividida pela intensidade transmitida pela amostra situada em um ponto distante do foco ($I(z \rightarrow \infty)$), onde a amostra não apresenta efeitos não lineares, pois a intensidade é baixa. [22, 23]. A razão entre $I(z)$ e a intensidade em um ponto distante $I(z \rightarrow \infty)$ é denominada transmitância normalizada ($\Gamma_N(z)$).

$$\Gamma_N(z) = \frac{I(z)}{I(z \rightarrow \infty)} \quad (1.1)$$

O efeito causado na amostra durante a realização de medida de varredura Z é o de focalização ou de desfocalização dependendo do sinal do índice de refração não linear. A figura 1.3 ilustra a curva característica de varredura Z de uma amostra com índice de refração não linear positivo, e o efeito observado na curva é o efeito de autofocalização, que causa uma diminuição da intensidade sobre o detector quando a amostra estiver antes do foco, e um aumento da intensidade quando a amostra estiver depois do foco. Se a amostras possuir índice de refração não linear negativo será observado um comportamento inverso.

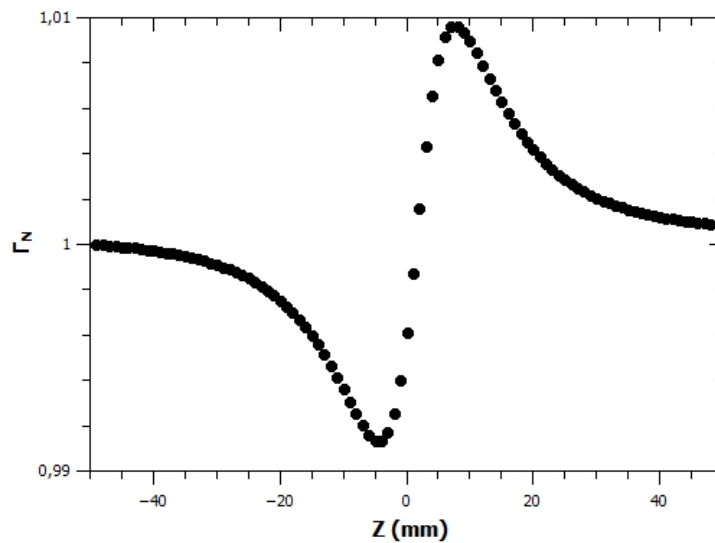


Figura 1.3: Curva característica da transmitância normalizada do experimento de Varredura Z . A presença de um vale seguido por um pico caracteriza o comportamento de lente convergente

O índice de refração não linear pode ter diferentes origens, tais como: eletrônica, térmica, reorientação, entre outras. No caso do efeito não linear ser de origem térmica, a amostra quando interagir com o feixe laser, a região iluminada é aquecida devido a absorção de parte da energia do feixe e depois a amostra perde calor para o ambiente

quando deixa de ser iluminada. Como o feixe laser tem um perfil gaussiano, teremos um gradiente de temperatura ΔT que será responsável pela variação do índice de refração (equação 1.2). E essa variação do índice de refração fará com que a amostra se comporte como uma lente (convergente ou divergente).

$$n = n_0 + \frac{dn}{dT}\Delta T \quad (1.2)$$

Para estudar este efeito de origem térmica é usado a técnica de varredura Z resolvida no tempo, onde um obturador mecânico é utilizado para gerar ondas quadradas em intervalos de tempos regulares da ordem de dezenas de milissegundos (Δt). Durante o intervalo Δt de iluminação, efeito térmico causará uma variação na transmitância associada ao fato de que a luz absorvida pela amostra é convertida em calor, gerando mudança no índice de refração e no intervalo subsequente quando a amostra não está iluminada, a amostra volta ao seu estado inicial.

A intensidade medida pelo detector apresenta uma variação com o tempo. Para o tempo inicial $t = 0$ de iluminação apenas efeitos lineares estão presentes e em $t = t_1$, o efeito térmico já teve tempo suficiente de estabilizar e a transmitância normalizada (equação 1.3) será dada pela razão entre as intensidade no tempo $t = 0$ e $t = t_1$, eliminando assim contribuições devido à efeitos lineares. Onde:

$$\Gamma_N(z, t) = \frac{I(z, t_1)}{I(z, t = 0)} \quad (1.3)$$

Existem diversos modelos teóricos para análise da curva de transmitância normalizada dependendo da origem do efeito não linear. Nesse trabalho, os efeitos não lineares são de origem térmica e adotaremos como modelo teórico o Modelo de Lente Térmica Aberrante.

1.2 O Modelo de Lente Térmica Aberrante

Em 1965, Gordon e colaboradores [32] perceberam durante um experimento com uma fonte laser de He-Ne que uma amostra quando irradiada pelo laser, absorvia luz e essa absorção causava um aquecimento local que modificava o índice de refração. Para estudar a variação do índice de refração, Gordon desenvolveu o “Modelo de Lente Térmica”. Esse modelo leva em consideração a baixa absorção da amostra, a conversão da energia em calor, o tempo de exposição da amostra ao feixe e a variação da distância focal da lente induzida devido a propagação de calor.

Em 1982, um modelo semelhante, foi proposto por Sheldon e colaboradores [33]. Diferente do modelo proposto por Gordon e colaboradores, que considerava a natureza parabólica da lente, o modelo de Sheldon considera a natureza aberrante de uma lente térmica. Este modelo é considerado mais realista por deixar de tratar as lentes como perfeitamente finas e sem aberrações, ainda que para efeitos fracos de lente térmica, o modelo de lente térmica parabólica funciona de maneira precisa. [34]

A contribuição térmica para a transmitância normalizada nos experimentos de Varredura Z é obtida pela Equação 1.4 [35, 36],

$$T_N(z, t) = 1 + \theta \arctan \left[\frac{2(z/z_0)}{(9 + (z/z_0)^2)(1 + (z/z_0)^2)/2\tau + (3 + (z/z_0)^2)} \right] \quad (1.4)$$

e

$$\theta = \frac{0,24\alpha P b}{\kappa \lambda} \frac{dn}{dT} \quad (1.5)$$

Onde θ é um parâmetro adimensional em unidades do SI, encontrado pela transmitância normalizada do experimento de varredura Z, α é o coeficiente de absorção medido no comprimento de onda do laser, P é a potência do laser incidente na amostra, b é a espessura do porta amostra utilizado, $\tau = t/t_c$ é o tempo normalizado e t_c é o tempo característico de difusão térmica, $\frac{dn}{dT}$ é o coeficiente termo - óptico, κ é o coeficiente de condutividade térmica e z_0 é o comprimento de Rayleigh.

1.3 Objetivos

1.3.1 Gerais

Esse trabalho tem por objetivo avaliar as concentrações e possíveis alterações de DNA Livre Circulante em pacientes com tumores sólidos pela técnica de Varredura Z. Em particular avaliar o comportamento do DNA LC de pacientes portadores de tumores sólidos em relação ao modelo experimental da técnica de Varredura Z quanto ao tempo de armazenagem, tempo de preparo das amostras, com concentrações de amostras de pacientes livres de doença e reprodutibilidade.

1.3.2 Específicos

Serão comparados os resultados obtidos pela técnica de Varredura Z com os resultados obtidos por espectrofotometria, com intuito de obter os valores de detecção da técnica de Varredura Z em pacientes portadores de tumores sólidos e indivíduos livres de doença.

Capítulo 2

Descrição Experimental

2.1 Varredura Z

A figura 2.1 apresenta o arranjo experimental utilizado nas medidas de Varredura Z descritos nesse trabalho. O arranjo é composto por um laser de estado sólido ($Nd : YVO_4$), contínuo (CW), com perfil gaussiano, com comprimento de onda no visível em $\lambda = 532nm$ (Verdi V2 – Coherent®), um obturador mecânico (Stanford Research Systems, modelo SR540) que fornecerá um perfil quadrático periódico temporal no feixe laser com duração de 30 ms. Para garantir um perfil perfeitamente quadrático, são posicionadas duas lentes, L1 e L2, antes e depois do obturador mecânico (OB). Uma terceira lente L3 é utilizada para focalizar o feixe na posição denominada $z = 0$. Entre as lentes L2 e L3, é posicionado um divisor de feixe 50% – 50%. O feixe refletido é direcionado a um fotodetector de Silício (D1) [THORLABS®, modelo PDA50]. O feixe transmitido atravessará a lente L3 e uma íris posicionada a frente de um segundo fotodetector de Si (D2). Ambos os detectores são conectados a um osciloscópio (Tektronix®, 102D). O detector D1 servirá para monitorar o comportamento do feixe laser ao longo da medida e o detector D2 dará informações da interação da luz com a amostra. Um microcomputador ligado ao osciloscópio capturará os sinais dos detectores D1 e D2.

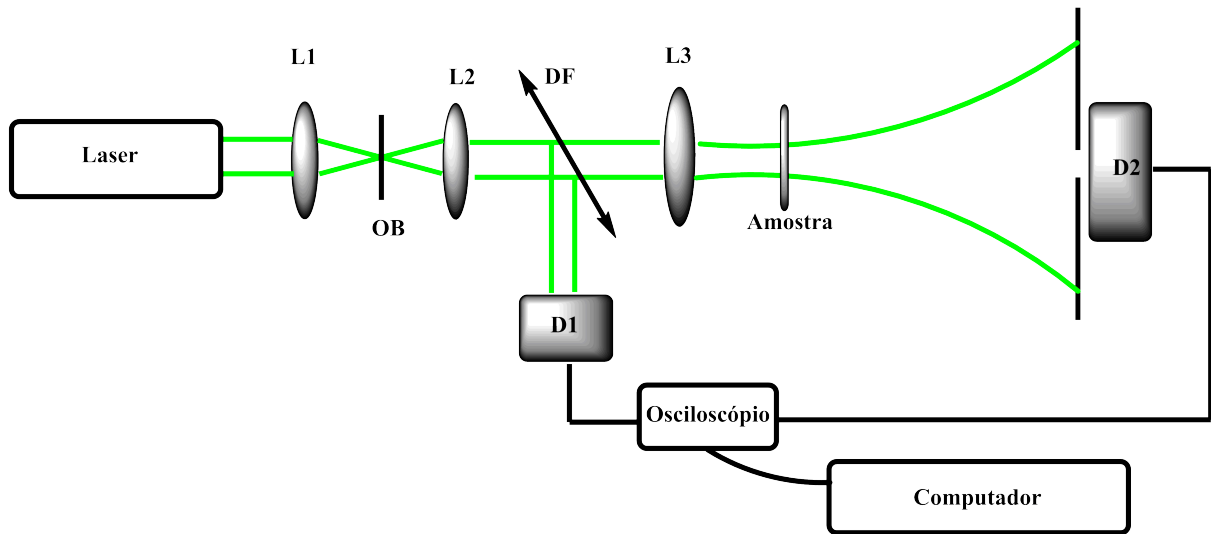


Figura 2.1: Esquema da montagem de Varredura Z para estudo de efeitos térmicos. L1, L2 e L3: lentes; OB: o obturador mecânico; DF: divisor de feixe; D1 e D2: fotodetectores

2.2 Material de Estudo e preparação de amostras

O material de estudo desse trabalho é DNA Livre Circulante de pacientes portadores de tumores sólidos (câncer de bexiga, próstata e estômago), com anatomopatológico confirmando a doença, ambos os sexos e com faixa etária de 18 a 85 anos e sem qualquer tratamento prévio. Em contrapartida, foram excluídos aqueles pacientes que apresentavam co-morbidades sorológicas (Hepatite B, Hepatite C e HIV). Esses tipos de cânceres se originam quando uma célula normal sofre uma mutação maligna e se multiplica, o núcleo dessas células libera fragmentos de DNA em corrente sanguínea, esse é o DNA que será o material a ser investigado através da técnica de Varredura Z.

Um grupo de indivíduos livres de qualquer doença também foi estudado, esse grupo foi chamado de doadores (grupo controle). As características desse grupo eram não apresentar qualquer neoplasia e não ter histórico familiar de qualquer tipo dessa doença.

Foram estudadas, pela técnica de Varredura Z, 68 amostras de pacientes diagnosticados com câncer, sendo 4 com câncer de próstata, 27 com câncer de bexiga e 37 com câncer de estômago e 10 amostras de doadores.

Um ambulatório experimental aplicado aos cuidados do tratamento de câncer foi montado para monitoramento e atendimento dos pacientes portadores da doença. Tal ambulatório foi realizado no Serviço de Oncologia da Faculdade de Medicina do ABC. O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina do ABC sob o

número 19694.

2.2.1 Extração de DNA Plasmático

Os tubos contendo amostras sanguíneas dos pacientes incluídos no estudo foram encaminhados ao Laboratório de Análises Clínicas e Biologia Molecular da FMABC e posteriormente enviadas ao Grupo de Fluidos Complexos do IFUSP, para se realizar medidas de varredura Z.

A alíquota de 10 mL de sangue total foi colhido com EDTA, e submetida a centrifugação à 1.300 *g* por dez minutos em temperatura ambiente, após centrifugação o plasma foi separado e transferido a um tubo de plástico tipo Falcon. Outra centrifugação foi realizada à 2.400 *g* por 10 minutos por temperatura ambiente. Deste material, 1 mL foi coletado para a extração.

A primeira centrifugação foi necessária a fim de evitar que as células nucleadas do sangue se rompesse e a segunda, para remoção de proteínas do plasma evitando-se a interferência dessa na purificação do DNA livre circulante. A seguir, extraiu-se DNA LC nesse material utilizando-se o reagente GFX TM (Amersham Pharmacia Biotech, Inc, USA), seguindo o protocolo adaptado:

Em 1 ml de amostra foram adicionados 500 μ L de solução extratora e a mistura foi incubada à temperatura ambiente por 10 minutos, com agitação esporádica. Essa mistura foi eluída cinco vezes pela mesma coluna do kit e, após múltipla eluição, o material foi centrifugado a 8.000 *g* durante 1 minuto à 10°C . O restante presente no tubo coletor foi descartado. Após esse processo, seguiu-se as orientações do fabricante do reagente, na qual 500 μ L de solução extratora foram adicionados à coluna e esse conjunto foi centrifugado a 8.000 *g* durante 1 minuto à 10°C. O material eluído foi transferido ao tubo coletor e descartado.

A fim de se esgotar o material retido na coluna foram 500 μ L de solução de lavagem com subsequente centrifugação à 14.000 *g* durante 3 minutos à 10° C. Uma vez mais foi descartado o eluído do tubo coletor. Por fim, a eluição do DNA LC consistiu da adição de 20 μ L de água Milli-Q sobre a coluna para última centrifugação à 8.000 *g* por 1 minuto. Assim o processo de extração do DNA LC foi purificada para as análises envolvidas nesse estudo.

2.2.2 Preparação

A preparação das amostras para as medidas de varredura Z seguiram o seguinte protocolo: foi preparado uma solução padrão com EtBr e água destilada e deionizada, Milli-Q (Millipore), na proporção de 1:1000 , ou seja, 1 μL de corante em 1000 μL de água Milli-Q.

Em um eppendorf colocou-se 250 μL da solução padrão e adicionou-se 5 μL de DNA LC que denominaremos de S1. A homogeneização de S1 é realizada por pipetagem e, em seguida, S1 é armazenada na refrigeração por 5 minutos. Após os 5 minutos, S1 é retirada da geladeira e espera-se 5 minutos para que S1 volte a temperatura ambiente e está pronta para ser medida. 50 μL de S1 é usado para preencher o porta amostra de 200 μm de espessura que será usado no experimento. Os 200 μL restantes de S1 são usados para obtenção do espectro de absorção de S1.

Capítulo 3

Resultados e Análise de Dados

Nesse trabalho, foram estudadas amostras de DNA Livre Circulante de pacientes portadores de tumores sólidos e de doadores, que denominaremos de grupo de estudo e grupo controle respectivamente, com intuito de investigar se a técnica óptica de Varredura Z pode ser utilizada como meio de diagnosticar possíveis pacientes oncológicos. Os resultados obtidos por essa técnica serão comparados com os resultados obtidos por espectrofotometria.

O DNA possui banda de absorção nos comprimentos de onda de $\lambda = 240 \text{ nm}$ e $\lambda = 260 \text{ nm}$ e não absorve na região do visível ($\lambda = 400 \text{ a } 700 \text{ nm}$). Como os experimentos de Varredura Z foram realizados em $\lambda = 532 \text{ nm}$, as soluções de DNA não apresentaram resposta não linear (figura 3.1).

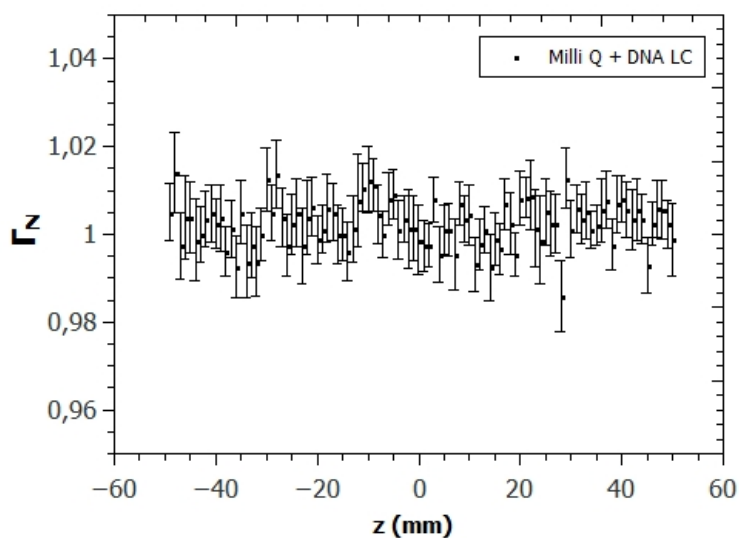


Figura 3.1: Curva de Varredura Z para solução de DNA em água Milli-Q.

Por esse motivo as soluções foram dopadas com Brometo de Etídio - $C_{21}H_{20}BrN_3$ (EtBr). A primeira etapa do estudo foi realizar a Varredura Z da solução de fundo (EtBr em água Milli-Q) nas mesma concentração de dopagem 1:1000 (figura 3.2) para correções dos resultados obtidos. Por se tratar de amostras biológicas, foram realizados testes de estabilidade e reprodutibilidade, para garantir a confiabilidade nos resultados obtidos.

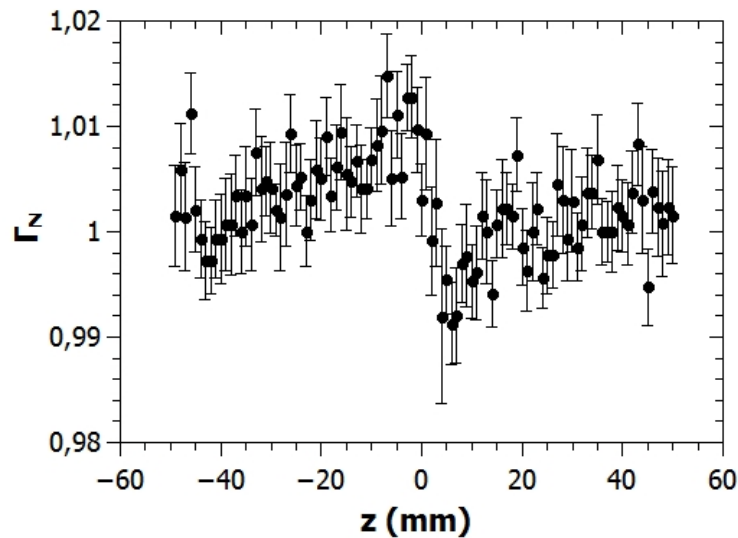


Figura 3.2: Curva de Varredura Z para solução de fundo (Brometo de Etídio em água Milli-Q 1:1000).

As seções contidas neste capítulo são: a seção 3.1 que traz as medidas de estabilidade da amostra de DNA; a seção 3.2 que traz o estudo de reprodutibilidade e a seção 3.3 que contém as medidas de Varredura Z de DNA LC do grupo controle e do grupo de estudo.

3.1 Teste de Estabilidade: Repetição ao Longo do Tempo e Estabilidade Pós Preparo

Amostras biológicas são normalmente armazenadas em refrigeração controlada, e em temperatura ambiente podem sofrer algum tipo de degradação. O DNA quando puro é um composto estável sob refrigeração ($T < 6^{\circ}C$) por vários dias. Fora da refrigeração mantêm-se estável por algumas horas.

Entretanto, não é conhecido o seu tempo de estabilidade em solução e o tempo de estabilidade da solução quando sujeita a um gradiente de temperatura. Por esse motivo,

iniciou-se um estudo da estabilidade das amostras de DNA ao longo do tempo de duração de uma medida experimental na técnica de Varredura Z.

Cada medida de Varredura Z que chamaremos de “corrida” pode ser realizada de duas formas: Ou são feitas n corridas, onde em cada posição de deslocamento, é realizada uma única aquisição da potência transmitida pela amostra e depois calcula-se a média das n corridas ou é feita uma única corrida com n aquisições da potência transmitida pela amostra em cada posição. Quando não há problemas de estabilidade na amostra estudada, os resultados obtidos nas duas formas de medida são iguais e o segundo método é escolhido por se tratar de uma medida mais rápida de aquisição de dados.

Começou-se o estudo realizando 10 corridas, onde em cada posição de cada corrida era realizada apenas uma aquisição. Em cada corrida, a amostra era deslocada ao longo de 100 posições. A distância entre os pontos era de 1 mm e o tempo entre aquisições foi de 1 s.

Com uma nova amostra realizou-se uma única corrida, onde em cada ponto foram feitas 10 aquisições. Essa nova amostra também foi deslocada ao longo de 100 pontos com separação entre os pontos de 1 mm e tempo de espera entre as aquisições de 1 s.

É possível observar na figura 3.3 que as curvas obtidas pelas duas configurações adotadas apresentaram uma tênue diferença. A curva em preto que representa a média de 10 corridas possui a amplitude pico-vale ligeiramente maior que a curva vermelha que representa uma única corrida com 10 aquisições por posição. Considerando as incertezas nas medidas, podemos observar que as amostras são estáveis dentro do intervalo de tempo de 10 corridas, que dura em torno de 55 minutos.

O segundo estudo de estabilidade foi relacionado ao tempo que a solução com DNA mantém-se estável mesmo sobre refrigeração ($T = 10^{\circ}C$). Para esse estudo foi preparada uma solução e dividida em 4 alíquotas idênticas. A alíquota 1 foi medida imediatamente após o preparo e as alíquotas 2, 3 e 4 foram postas em refrigeração e foram medidas 1h, 3h e 5h respectivamente, depois da preparação. Aguardou-se 5 minutos, antes do início das medidas das alíquotas 2, 3 e 4, para que estas ficassem à temperatura ambiente.

A figura 3.4 apresenta os resultados das medidas em função do tempo pós preparo. Os resultados mostraram que até 1 hora após o preparo as amostras apresentam o mesmo resultado, ou seja possuem a mesma amplitude pico-vale da curva de varredura Z, e amostras medidas 3 e 5 horas depois da preparação apresentaram uma redução da amplitude

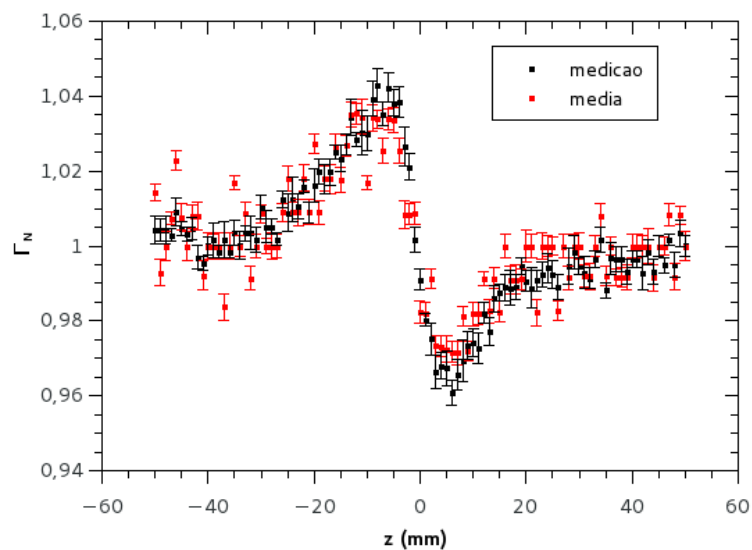


Figura 3.3: Curva característica de varredura Z para uma amostras de paciente oncológico. A curva em vermelho representa a média de 10 corrida e a curva em preto representa uma corrida com 10 aquisições por posição.

pico-vale.

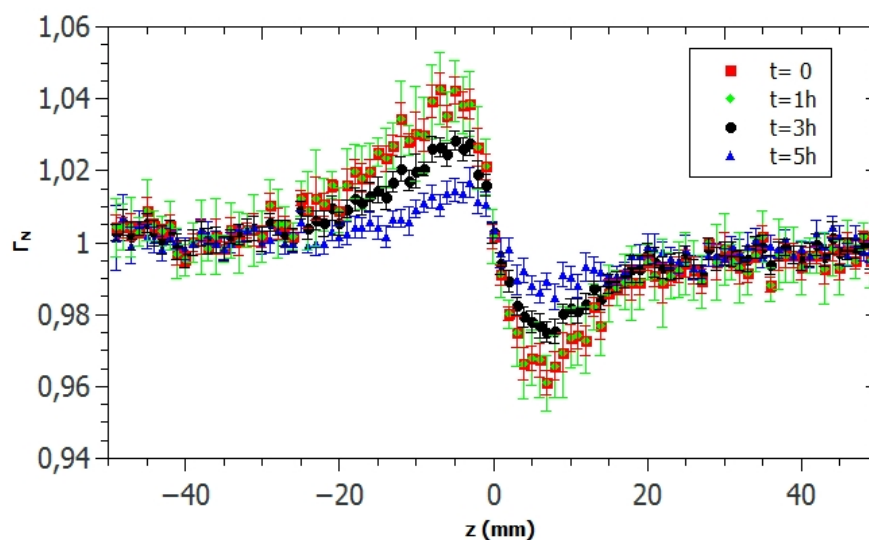


Figura 3.4: Curva característica de Varredura Z em função do tempo de preparo da amostra

Em função dos resultados obtidos nesses testes foi adotado o seguinte procedimento de preparação e medição: as soluções foram preparadas para medida imediata e foi realizada uma única corrida com 10 aquisições por posição.

3.2 Teste de Reprodutibilidade

Após a padronização das medidas, foi realizado o teste de reprodutibilidade. Para esse teste foram preparadas três amostras de um mesmo indivíduo. Pode-se observar pela figura 3.5 que os resultados obtidos são iguais, dentro da incerteza da medida. Assim, será adotado nesse trabalho que 3 amostras por indivíduo são suficientes para garantir a qualidade dos resultados obtido neste estudo.

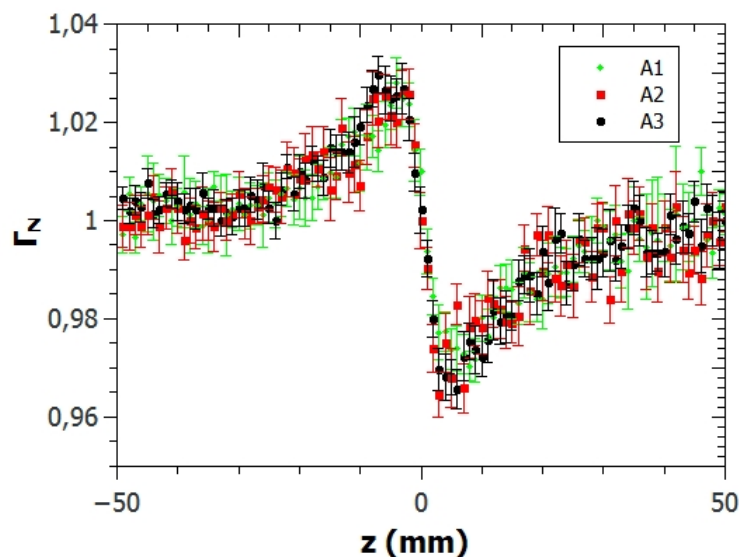


Figura 3.5: Curva de Varredura Z de 3 amostras de DNA de um mesmo paciente.

3.3 Medidas de Varredura Z de DNA Livre Circulante

Após a definição do protocolo de preparação e medidas de Varredura Z, iniciou-se o estudo das amostras do grupo controle e do grupo de estudo. As figuras 3.6 e 3.7 apresentam as curvas de transmitância normalizada de uma amostra do grupo controle e uma amostra do grupo de estudo. Podemos notar que ambas as amostras apresentam o

mesmo comportamento com a única diferença, que a amplitude pico-vale da amostra do grupo controle é menor que a do grupo de estudo. Vale ressaltar que a amostra do grupo controle apresenta amplitude pico-vale igual da solução de fundo $\theta = 0,012 \pm 0,002$. Além disso, a curva da amostra do grupo controle apresenta incerteza maior nas medidas que a da amostra do grupo de estudo.

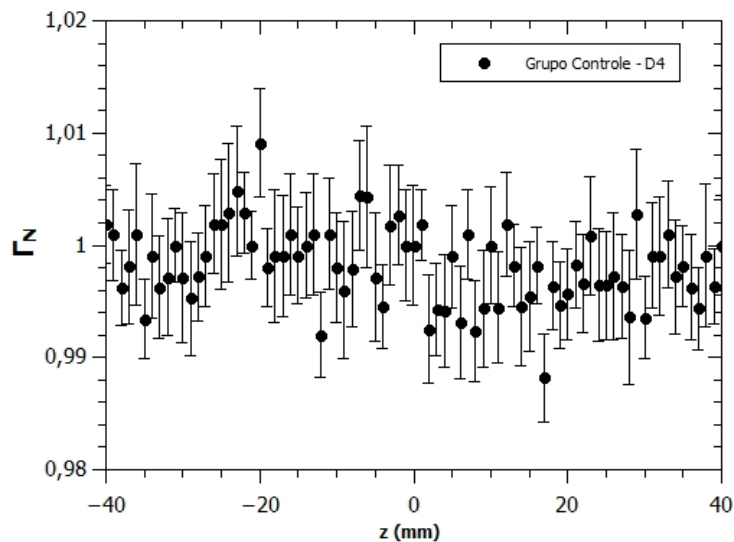


Figura 3.6: Curva característica de Varredura Z da amostra D4 - Grupo Controle

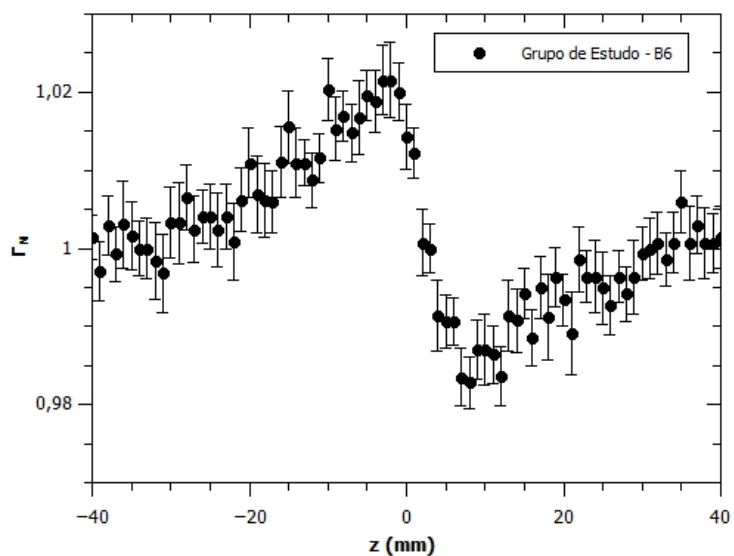


Figura 3.7: Curva característica de Varredura Z da amostra B6 - Grupo de Estudo

Como as amostras foram dopadas com Brometo de Etídio, foram realizadas medidas de absorvância de todas as amostras dos dois grupos para verificar se a diferença da

amplitude pico vale entre os grupos é devida apenas à absorção do EtBr, ou da interação entre o DNA e o EtBr, pois é conhecido que o EtBr se acopla à dupla hélice do DNA. [21]

3.3.1 Medidas de Absorvância

Todas as medidas de absorvância foram realizadas em um espectrofotômetro Ocean Optics composto por uma fonte de luz (Mikropack, modelo *DH – 2000 – BAL*), e dois detectores (Ocean Optics, modelo *USB4000*). Na figura 3.8 encontram-se os espectros de absorvância de uma amostra do grupo controle, de uma amostra de grupo de estudo e da solução de fundo.

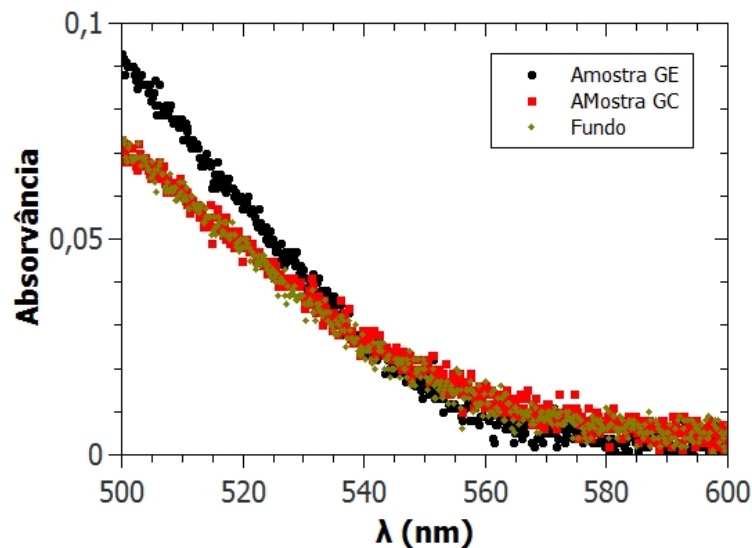


Figura 3.8: Espectro de Absorvância da Solução - Brometo de Etídio e água Milli-Q (Fundo), de uma amostra Grupo Controle (Amostra GC) e de uma amostra do Grupo de Estudo (Amostra GE).

Para $\lambda = 532nm$, os valores da absorvância encontradas foram $A_{532} = 0,88 \pm 0,05$ para a solução de fundo, $A_{532} = 0,87 \pm 0,05$ para a amostra do grupo controle e $A_{532} = 0,90 \pm 0,05$ para uma amostra do grupo de estudo. Todas as amostras estudadas apresentaram valores similares, então conclui-se que a diferença de amplitude pico vale entre os dois grupos não se deve apenas à adição do Brometo de Etídio nas amostras estudadas.

3.3.2 Teste de Proporção

Como as amostras recebidas tanto do grupo controle como do grupo de estudo possuem concentrações diferentes, realizamos dois testes para investigar a origem da diferença da amplitude pico vale entre os dois grupos. O primeiro teste consistiu em preparar soluções com DNA LC dos dois grupos, variando a proporção entre eles na solução.

Na figura 3.9 encontra-se os valores do parâmetro θ obtido pelo ajuste do modelo de lente térmica aberrante em função da proporção de DNA LC dos dois grupos com concentrações proporcionalizadas.

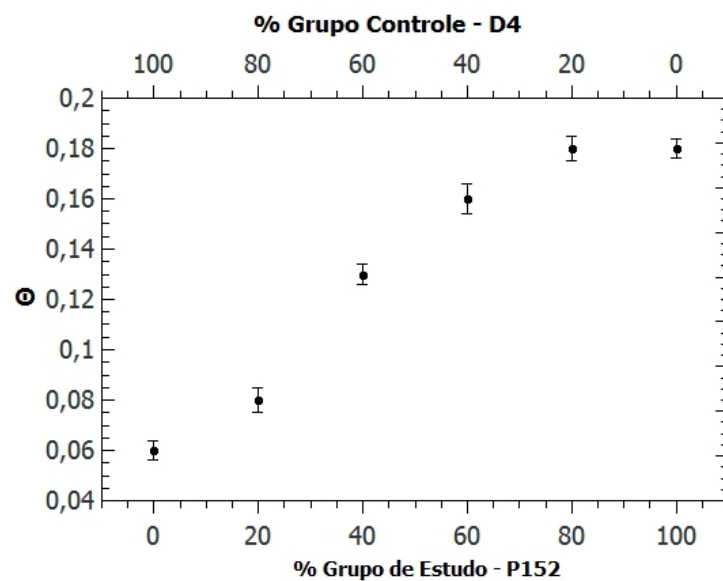


Figura 3.9: θ em função da proporção de DNA dos grupos controle e de estudo.

A figura 3.9 mostra a proporcionalidade quando se junta 20% da amostra do paciente com 80% da amostra do doador, 40% da amostra do paciente e 60% do doador, 60% da amostra do paciente e 40% do doador e por fim 80% da amostra do paciente e 20% doador. Ou seja, a técnica consegue recuperar as concentrações de DNA LC de pacientes com câncer. Por fim, se percebe que quando na solução há 20% da amostra do doador, não há diferença em θ .

O segundo teste consistiu em preparar soluções com diferentes concentrações de DNA de uma amostra do grupo de estudo e de uma amostra do grupo controle para comparar o valor de θ para as amostras dos dois grupos em uma mesma faixa de concentração.

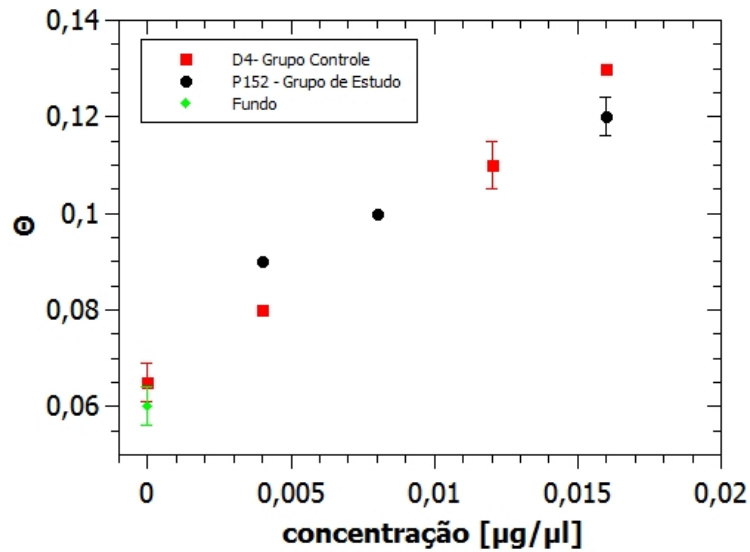


Figura 3.10: θ em função da concentração de DNA.

A figura 3.10 mostra os valores obtidos de θ para uma mesma concentração de DNA nos dois grupos estudados. Vemos que tanto para a amostra do grupo controle quanto para o grupo de estudo, o comportamento de θ não é linear em função da concentração da amostra, excluindo-se o primeiro ponto que é o valor de θ para a solução de fundo.

O valor de θ da solução de fundo parece não interferir na Varredura Z quando adicionada à amostra do grupo de estudo e do grupo controle. Os demais valores de θ obtidos a partir das comparações nos mostra que podem existir diferenças entre os conteúdos (fragmentos de DNA) das amostras de pacientes com câncer e pacientes livres de doença.

3.3.3 Avaliação Final

Após o estabelecimento do protocolo de análise supracitado, iniciamos as análises de todas as amostras do grupo de estudo e grupo controle. A figura 3.11 mostra os diferentes valores de θ dos dois grupos estudados, no qual se verifica os maiores valores obtidos de θ são do grupo de estudo ($\theta_M(GE) = 0,01402$ e $\theta_M(GC) = 0,0081$)

Além disso, foram determinadas as concentrações de DNA LC nas amostras, usando os valores de concentração e das absorvâncias obtidas por espectrofotometria fornecidas pelo Laboratório de Análises Clínicas da FMABC.

A figura 3.12 mostra a relação dos valores da razão entre θ e a concentração final de DNA das amostras para os grupos estudados. Observa-se que há um aumento na diferença

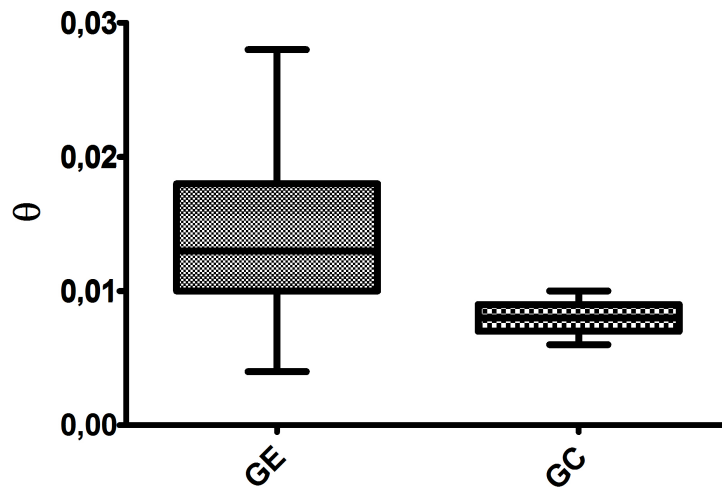


Figura 3.11: Distribuição de θ ajustados pelo Modelo de Lente Térmica Aberrante dos Grupos de Controle (GC) e de Estudo (GE).

entre os grupos estudados quando se avalia essa razão, onde o valor médio da razão entre θ e a concentração final de DNA das amostras do grupo de estudo é $\frac{\theta(GE)}{Conc.Final} = 43,61$ e do grupo controle é $\frac{\theta(GC)}{Conc.Final} = 374,3$.

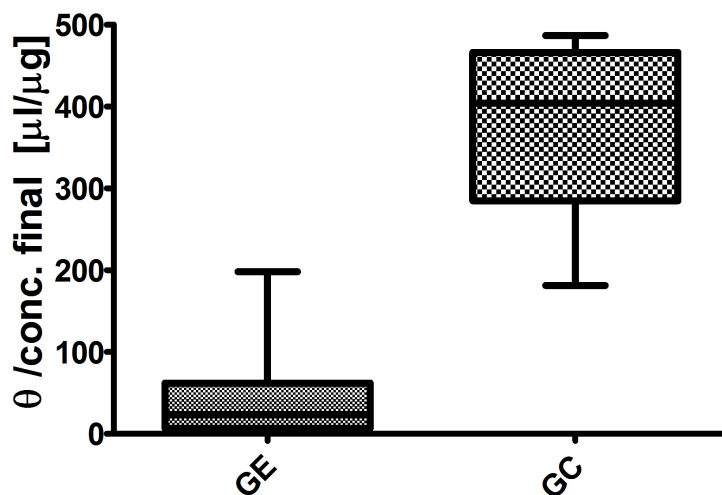


Figura 3.12: Distribuição da razão de θ pela concentração de DNA dos Grupos de Controle (GC) e de Estudo (GE).

As tabelas com todos os dados experimentais de todas as amostras estudadas podem ser consultadas no apêndice A.

Análise Clínica e Estatística

A fim de se avaliar o potencial de aplicação da técnica de Varredura Z do ponto de vista laboratorial para avaliação clínica futura foram realizados testes de associações com todas as técnicas realizadas nesse trabalho: Método 1: (Concentrações de DNA LC por meio de espectrofotometria), Método 2 (Razão entre o θ e as concentrações de DNA LC) e Varredura Z que denominaremos com *Z-Scan* (Valores de θ). Para isso, foi utilizado o teste de Mann-Whitney para analisar a associação dos pacientes com câncer e sem câncer segundo as técnicas utilizadas. Para essas análises utilizou-se nível de confiança de 95% e o programa utilizado foi o Stata versão 11.0. No apêndice encontram-se os valores usados para a análise estatística

A tabela 3.1 mostra as associações dos pacientes com câncer e sem câncer segundo as técnicas. Se verifica que em relação a mediana, o *Z-Scan* é a técnica que proporciona maiores valores de concentração de DNA LC entre os pacientes com câncer e sem câncer e também a maior diferença entre o valor máximo do grupo sem câncer e o valor mínimo do grupo com câncer. Todas as associações foram significante.

Tabela 3.1: Associação dos pacientes com câncer e sem câncer segundo os métodos de diagnóstico.

Método	Variável	Sem câncer	Com câncer	p*
		Mediana (IC95%)		
1	□	0,001 (0,001; 0,002)	0,021 (0,014; 0,039)	<0,001
2	$\theta/\square f$	0,001 (0,001; 0,001)	0,001 (0,001; 0,001)	<0,001
Z-scan	θ	0,014 (0,013; 0,015)	0,025 (0,022; 0,028)	<0,001

Valores mostrados em mediana (valor máximo; valor mínimo)

IC95%: intervalo de confiança 95%; p* teste de Mann-Whitney.

□:Concentração (Espectrofotometria);□f: Concentração Final (amostra *Z – Scan*)

A tabela 3.2 mostra as associações dos pacientes com câncer e sem câncer segundo as técnicas. Se verifica que em relação a média a diferença entre essas é mais significativa quando se aplica a técnica de *Z-Scan* ($p < 0,001$).

Tabela 3.2: Associação dos pacientes com câncer e sem câncer segundo os métodos de diagnóstico.

Método	Sem câncer	Com câncer	p*
	Media (DP)		
1	0,0012 (0,0004)	0,0655 (0,0922)	0,031
2	0,0001 (0,0001)	0,0012 (0,0018)	0,031
Z-scan	0,0140 (0,0012)	0,0261 (0,0074)	<0,001

Valores mostrados em média e desvio padrão (DP)

p* teste t de Student.

Além disso, foi verificada a capacidade das técnicas utilizadas nesse estudo para diferenciar amostras de paciente sem câncer e com câncer. Para isso foi usada a Concordância de Lin, Correlação de Spearman e Coeficiente de concordância de Bland & Altman. Também para essas análises se utilizou nível de confiança de 95%. O programa utilizado foi o Stata versão 11.0. A tabela 3.3 mostra que tanto os resultados obtidos pelo método 2 quanto aqueles obtidos pelo *Z-Scan* não concordam e também não se correlacionam com os resultados obtidos pelo método 1 (espectrofotometria).

Tabela 3.3: Concordância de Lin e Coeficiente de concordância de Bland & Altman para mensuração do Método 2, Z-scan entre os métodos de análise laboratorial e Método 1.

	Método 1	
	ρ_c (IC95%)	Bland & Altman (IC95%)
Método 2	0,026 (0,020; 0,033)	0,064 (-0,113; 0,241)
Z-scan	0,029 (-0,003; 0,061)	0,039 (-0,139; 0,217)

*Coeficiente de Lin; IC95%: Intervalo de Confiança 95%; (valor máximo; valor mínimo)

Conforme verificado, a capacidade de diferenciação entre pacientes sem câncer e com

câncer representada na tabela 3.3 pode, de alguma maneira, com associações clínicas (estadiamento, tipo de tumor e resposta terapêutica) definir a caracterização do DNA LC detectado quanto a sua origem; ou seja; se esse DNA LC é oriundo de morte apoptótica ou necrótica.

A fim de se elucidar e contextualizar, sabe-se que as células do corpo humano estão frequentemente se renovando, tal fenômeno é caracterizado por um processo ativo de alterações morfológicas e bioquímicas denominado apoptose. [37] Morfológicamente, durante a apoptose as células vão sofrer uma alteração seguida de condensação e fragmentação da cromatina com formação de bolhas citoplasmáticas e fragmentação dos corpos apoptóticos, esses serão fagocitados por macrófagos e removidos sem causar um processo inflamatório. [38]

Já a necrose é um tipo de morte celular desencadeada por estímulos ambientais, que resulta no aumento do volume celular, agregação da cromatina e desorganização do citoplasma. [39] Há perda da integridade da membrana plasmática ocasionada pela diminuição nos níveis de ATP, que vai comprometer a bomba de Na^+/K^+ e de outros fenômenos que são ATP - dependentes. Isso resulta na ruptura da célula e liberação de componentes intracelulares levando a uma reação inflamatória local. [40]

Dessa maneira, o uso da técnica do *Z-Scan* pode auxiliar a caracterização dos fragmentos de DNA LC quanto a sua origem. Até o momento e de acordo com os resultados mostrados essa técnica não parece mostrar somente quantidade de DNA LC mas como também parece possuir capacidade na caracterização já que as quantidades detectadas pela técnica diferem das encontradas pela espectrofotometria. Estudos relacionando os dados clínicos dos pacientes estudados serão realizados futuramente a fim de elucidar a origem do DNA LC.

Capítulo 4

Considerações Finais

Este trabalho teve como propósito avaliar as concentrações e possíveis alterações de DNA LC em pacientes portadores de tumores sólidos pela técnica de Varredura Z. Os resultados obtidos demonstram que há diferença entre as determinações obtidas pela técnica de Varredura Z quando se aplica a mesma em pacientes com câncer e indivíduos livres de doenças. Em particular foi observado que o tempo de armazenagem assim como o tempo de preparo das amostras interfere nos resultados quando se aplica a técnica de Varredura Z.

Essa técnica possui a capacidade de recuperar as avaliações de DNA LC quando se mistura as amostras de pacientes com câncer e indivíduos livres da doença. Além disso, os resultados são reprodutíveis não mostrando alterações das determinações intra análise. Em relação a espectrofotometria, a técnica de Varredura Z mostrou ser mais vantajosa uma vez que fornece maior diferença entre os grupos estudados e ainda essa técnica não concorda e nem se correlaciona com a espectrofotometria por possuir a capacidade de detectar não somente a quantidade mas como também possíveis alterações do fragmento de DNA que circula livremente no plasma.

Bibliografia

- [1] Estimativa 2016 – 2107: Incidência de câncer no Brasil; http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/index.asp?link=conteudo_view.asp&ID=2, acessado em 15/02/17.
- [2] GREENE KL, et al.; s.l. J Urol 2009, Vols. 182:2232-41. Prostate specific antigen best practice statement: 2009 update.
- [3] LAZCANOA, IGNACIO HERMIDA, et al.: Marcadores Tumorales. REV CLÍN MED FAM; 9(1): 31 – 42 (2016).
- [4] MANDEL P, METAIS P.: Les acides nucleiques du plasma sanguin chez l’homme CR Acad. Sci. Paris.; 142: 241 –243 (1948).
- [5] LEON, S.A. et al.: Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. Cancer Res.; 37: 646 –650 (1977).
- [6] ELLINGER, J., et al.: Apoptotic DNA fragments in serum of patients with muscle invasive bladder cancer: A prognostic entity. Cancer Letters; 264: 274 –280 (2008).
- [7] USHIJIMA T., ASADA K.: Aberrant DNA methylation in contrast with mutations. Cancer Sci.; 101 (2): 300 – 305 (2010).
- [8] WOLFF, E.M., et al.: Unique DNA methylation patterns distinguish non-invasive and invasive urothelial cancers and establish an epigenetic field defect in premalignant tissue. Cancer Res.; 70(20): 8169 –8178 (2010).
- [9] ZIEGLER A., ZANGEMEISTER-WITTKE U, STAHEL R. A.: Circulating DNA: a new diagnostic gold mine? Cancer Treat. Rev.; 28: 255 – 271 (2002).
- [10] WANG B.G., et al.: Increased plasm DNA integrity in cancer patients. Cancer Res.; 63: 3966 – 3968 (2003).

-
- [11] STROUN, M. et al.: Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. *Oncology*; 46: 318 –322 (1989).
- [12] VASIOUKHIN, V. et al.: Point mutations of the N-ras gene in the blood plasma DNA of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukaemia. *Br. J. Haematol*; 86: 774 –779 (1994).
- [13] SORENSON, G.D. et al.: Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*; 3: 67 –71 (1994).
- [14] CHEN, X.Q. et al.: Microsatellite alterations in plasma DNA of small cell lung cancer patients. *Nat. Med.*; 2: 1033 –1035 (1996).
- [15] NAWROZ, H. et al.: Microsatellite alterations in serum DNA of head and neck cancer patients. *Nat. Med.*; 2: 1035 –1037 (1996).
- [16] VISHNU S., RAJESWARI M.R.: Circulating (cell-free) nucleic acids – A promising, non-invasive tool for early detection of several human diseases. *FEBS Letters*; 581: 795 – 799 (2007).
- [17] SABINE J., et al.: DNA Fragments in Blood Plasma of Cancer Patients: Quantitations and Evidence for their origin from apoptotic and Necrotic cells. *Cancer Research*; 61: 1659 – 1665 (2001).
- [18] JIN Z., EI-DEIRY W.S.: Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther.*; 4: 139 – 163 (2005).
- [19] NAOYUKI U., et al.: Prediction of Breast Tumor Progression by Integrity of Free Circulating DNA in Serum. *J Clin Oncol.*; 24 (26): 4270 – 4276 (2006).
- [20] FELIX K., et al.: Circulating tumour-associated plasma DNA represents an independent and informative predictor of prostate cancer; 20: 544 – 548 (2006).
- [21] MORENO, et al.: Lack of reliability of nanotechnology in the of free plasma DNA in samples of patients with prostate cancer. *International Archives of Medicine*; 6 (2): 1 – 5 (2013).
- [22] M. SHEIK-BAHAE, A. A. SAID, and E. W. van STRYLAND, High – sensitivity, single -beam n_2 measurements, *Opt. Lett.*; 14: 955 – 957 (1989).

-
- [23] M. SHEIK-BAHAE, et al., Sensitive measurement of optical nonlinearities using a single -beam, IEEE J. Quantum Eletron; 26: 760 – 769 (1990).
- [24] GOMEZ, S. L. ; TURCHIELLO, R. F.; JURADO, M. C. ; et al.: Characterization of native and oxidized human low-density lipoproteins by the Z-Scan Technique. Chemistry and Physics of Lipids; 132: 185 – 195 (2004).
- [25] GOMEZ, S. L. ; TURCHIELLO, R. F.; JURADO, M. C. ; et al.: Thermal lens effect of low density lipoprotein lyotropic like aggregates investigated by using the Z-Scan technique. Liquid Crystals Today; 15(1): 1 – 3 (2006).
- [26] GOMEZ, S. L. ; MONTEIRO, A. M.; RABANNI, S. R.; et al.: Cu and Fe metallic ions-mediated oxidation of low-density lipoproteins studied by NMR, TEM and Z-scan technique. Chemistry and Physics of Lipids; 163: 545 – 551 (2010).
- [27] ALVES, S.; MONTEIRO, A. M.; GIDLUND, M.; et al.: Thermal-lens effect of native and oxidized lipoprotein solutions investigated by the Z-Scan technique. International journal of atherosclerosis; 3: 33 – 38 (2008).
- [28] MONTEIRO, A. M.; JARDINI, M. A. N.; ALVES, S.; et al.: Cardiovascular Disease Parameters in Periodontitis; Journal of Periodontology; 80: 378 – 388 (2009).
- [29] DHINAA, A. N. and PALANISAMY, P. K.; Z-Scan technique for measurement of total cholesterol and triglycerides in blood. Journal of Innovative Optical Health Sciences; 2 (3): 295 – 301 (2009).
- [30] DHINAA, A. N. and PALANISAMY, P. K.; Z-Scan technique: To measure the total protein and albumin in blood. Journal biomedical Science and Engineering; 3: 285 – 290 (2010).
- [31] DHINAA, A. N.: Z-Scan Technique as a tool for the measurement of blood glucose. Laser Physics; 18(10): 1212 – 1216 (2008).
- [32] GORDON, J. P., et al.: Long – Transient Effects in Lasers with Inserted Liquid Samples , J. Appl. Phys.; 36: 3 – 8 (1965)
- [33] SHELDON, S., KNIGHT, L. and THORNE, J.: Appl. Opt.; 21: 1663 (1982).

-
- [34] CARTER, C. A. and HARRIS, J. M.: Comparasion of Modeles Describing the thermal Lens Effect , *Applied Optics*; 23: 476 – 481 (1984).
- [35] FALCONIERI, M.: Thermo-optical effects in Z -scan measurements using high-repetition-rate lasers. *Journal of Optics A: Pure and Applied Optics*; 1(6): 662 – 667 (1999).
- [36] SANTOS, C. E. A., et al.: Anionic and cationic influence on the nonlocal nonlinear optical response of ionic liquids; 403: 33 – 36 (2012).
- [37] IVANA G., ANDRÉA R., ADRIANA B.R.: Morte Celular por Apoptose. *Rev. Brasileira de Cancerologia*; 53(3): 335 – 343 (2007).
- [38] ROBINS & Cortan: *Bases Patologicas das Doenças*; 8^a edição, (2010).
- [39] BRAS, M.; QUEENAN, B.; SUSIN, S. A.: Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. *Biochemistry (Mosc)*; 70 (2): 231 – 239 (2005).
- [40] BOUJRAD, H.; et al.: AIF-Mediated Programmed Necrosis: A Highly Regulated Way to Die. *Cell Cycle*; 6 (21): 2612 – 2619 (2007).

Apêndice A

Valores das Amplitudes Térmicas
das amostras de DNA LC.

A.1 Dados Experimentais das amostras do Grupo Controle e da Solução de Fundo medidas pelo Z-Scan.

Tabela A.1: Dados Experimentais do G.C. e da S1

amostras	concentração $\left[\frac{\mu g}{\mu l}\right]$	θ	σ_θ	$\alpha_0 [cm^{-1}]$	σ_{α_0}
milli-Q + EtBr		0,012	0,002	0,88	0,05
D1	0,001	0,014	0,003	0,91	0,05
D2	0,001	0,013	0,002	0,88	0,05
D3	0,002	0,015	0,003	0,87	0,05
D4	0,001	0,014	0,003	0,90	0,05
D5	0,001	0,015	0,002	0,85	0,05
D6	0,001	0,012	0,003	0,88	0,05
D7	0,001	0,014	0,002	0,89	0,05
D8	0,001	0,015	0,003	0,90	0,05
D9	0,001	0,012	0,002	0,89	0,05
D10	0,001	0,014	0,003	0,90	0,05

A.2 Dados Experimentais do Grupo de Estudo medidas pelo Z-Scan.

Tabela A.2: Dados Experimentais do G.E.

amostras	concentração $\left[\frac{\mu g}{\mu l}\right]$	θ	σ_θ	$\alpha_0 [cm^{-1}]$	σ_{α_0}
próstata 1	0,015	0,022	0,004	0,89	0,05
próstata 3	0,100	0,035	0,002	0,88	0,05
próstata 4	0,089	0,034	0,003	0,90	0,05
próstata 5	0,020	0,027	0,004	0,88	0,05
bexiga 3	0,500	0,03	0,002	0,88	0,05
bexiga 4	0,100	0,02	0,003	0,85	0,05
bexiga 5	0,200	0,02	0,002	0,89	0,05
bexiga 6	0,200	0,042	0,006	0,9	0,05
bexiga 7	0,100	0,025	0,003	0,82	0,05
bexiga 8	0,200	0,027	0,005	0,84	0,05
bexiga 9	0,100	0,02	0,004	0,94	0,05
bexiga 10	0,100	0,03	0,007	0,87	0,05
bexiga 14	0,010	0,032	0,004	0,86	0,05
bexiga 15	0,015	0,025	0,004	0,91	0,05
bexiga 16	0,006	0,03	0,003	0,87	0,05
bexiga 17	0,010	0,032	0,002	0,93	0,05
bexiga 18	0,078	0,035	0,002	0,90	0,05
bexiga 19	0,010	0,038	0,003	0,84	0,05
bexiga 20	0,010	0,035	0,003	0,91	0,05
bexiga 21	0,060	0,026	0,002	0,86	0,05
bexiga 22	0,010	0,035	0,003	0,85	0,05
bexiga 23	0,010	0,017	0,005	0,90	0,05
bexiga 24	0,010	0,018	0,003	0,82	0,05
bexiga 25	0,087	0,038	0,003	0,92	0,05
Continua na próxima página					

Tabela A.2 – Continuação da página anterior

amostras	concentração $\left[\frac{\mu g}{\mu l}\right]$	θ	σ_{θ}	$\alpha_0 [cm^{-1}]$	σ_{α_0}
bexiga 26	0,020	0,030	0,004	0,90	0,05
bexiga 27	0,007	0,043	0,003	0,88	0,05
bexiga 28	0,010	0,040	0,002	0,87	0,05
bexiga 29	0,010	0,020	0,003	0,92	0,05
bexiga 30	0,005	0,023	0,003	0,90	0,05
bexiga 31	0,010	0,041	0,002	0,87	0,05
gastro 1	0,202	0,025	0,003	1,03	0,05
gastro 2	0,217	0,028	0,003	0,95	0,05
gastro 3	0,101	0,034	0,002	1,03	0,05
gastro 4	0,024	0,020	0,002	1,08	0,05
gastro 5	0,361	0,035	0,002	1,29	0,05
gastro 6	0,194	0,020	0,002	1,0	0,05
gastro 9	0,012	0,015	0,003	0,95	0,05
gastro 10	0,013	0,020	0,002	0,95	0,05
gastro 11	0,094	0,034	0,003	1,00	0,05
gastro 12	0,039	0,026	0,006	0,94	0,05
gastro 13	0,033	0,020	0,002	0,94	0,05
gastro 14	0,094	0,026	0,002	1,03	0,05
gastro 15	0,010	0,023	0,003	1,00	0,05
gastro 17	0,009	0,018	0,002	0,91	0,05
gastro 19	0,021	0,022	0,002	1,06	0,05
gastro 20	0,036	0,022	0,002	1,02	0,05
gastro 21	0,019	0,020	0,002	0,98	0,05
gastro 23	0,011	0,018	0,002	0,94	0,05
gastro 24	0,008	0,024	0,002	1,01	0,05
gastro 26	0,297	0,038	0,003	1,15	0,05
gastro 27	0,123	0,020	0,002	1,02	0,05
gastro 29	0,056	0,020	0,002	0,94	0,05
Continua na próxima página					

Tabela A.2 – Continuação da página anterior

amostras	concentração $\left[\frac{\mu g}{\mu l}\right]$	θ	σ_{θ}	$\alpha_0 [cm^{-1}]$	σ_{α_0}
gastro 34	0,021	0,015	0,003	0,95	0,05
gastro 35	0,014	0,025	0,003	0,95	0,05
gastro 36	0,030	0,020	0,002	0,97	0,05
gastro 37	0,013	0,017	0,003	0,87	0,05
gastro 39	0,016	0,034	0,004	0,95	0,05
gastro 41	0,019	0,020	0,002	0,99	0,05
gastro 48	0,038	0,029	0,003	1,05	0,05
gastro 49	0,014	0,018	0,002	0,90	0,05
gastro 50	0,021	0,021	0,002	0,93	0,05
gastro 54	0,009	0,018	0,002	1,01	0,05
gastro 59	0,007	0,028	0,003	0,95	0,05
gastro 60	0,007	0,015	0,002	0,93	0,05
gastro 61	0,005	0,016	0,003	0,94	0,05
gastro 62	0,044	0,030	0,003	1,10	0,05
gastro 71	0,024	0,020	0,002	0,93	0,05