

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

QUANTIFICAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA LIVRE NO
SANGUE PERIFÉRICO DE PORTADORES DE CÂNCER
COLORRETAL

BENISIO FERREIRA DA SILVA FILHO

MACEIÓ
2009

BENISIO FERREIRA DA SILVA FILHO

QUANTIFICAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA LIVRE NO
SANGUE PERIFÉRICO DE PORTADORES DE CÂNCER
COLORRETAL

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO PROGRAMA DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS, PARA
OBTENÇÃO DE GRAU DE MESTRE.

ORIENTADOR: PROF. DR. LUÍZ ANTÔNIO FERREIRA
DA SILVA / INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E
DA SAÚDE/ UFAL.

CO-ORIENTADOR: PROF. DR. MANOEL ALVARO
LINS NETO / FACULDADE DE MEDICINA / UFAL.

MACEIÓ

2009

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

S586q Silva Filho, Benisio Ferreira da.
Quantificação de fragmentos de DNA livre no sangue periférico de portadores de câncer colorretal / Benisio Ferreira da Silva Filho, 2009.
xviii, 61 f. : il.

Orientador: Luíz Antônio Ferreira da Silva.
Co-Orientador: Manoel Alvaro Lins Neto.
Dissertação (mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió, 2009.

Bibliografia: f. 50-56.
Apêndices: f. 57-61.

1. DNA livre – Quantificação absoluta. 2. Neoplasias colorretais. I. Título.

CDU: 577.233.3: 616.348/.351-006



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Defesa da Dissertação de Mestrado do aluno Benisio Ferreira da Silva Filho, intitulado: "Quantificação de DNA Livre em sangue periférico de pacientes de câncer colorretal", orientado pelo Prof. Dr. Luiz Antônio Ferreira da Silva, apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Alagoas, em 30 de março de 2009.

Os membros da Banca Examinadora, consideraram o candidato APROVADO

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Luiz Antônio Ferreira da Silva (ICBS/UFAL)

Prof. Dr. Jacinto da Costa Silva Neto (UFPE/Faculdade de Medicina de Garanhuns)

Prof. Dr. Eurípedes Alves da Silva Filho (ICBS/UFAL)

Prof. Dr. Francisco Javier da Silva (ICBS/UFAL)

Francisco Javier da Silva (ICBS/UFAL)

DEDICO

A Deus por ter me dado fé e sabedoria para suportar as perdas que tive nestes últimos três anos e me dar forças e oportunidades para seguir em frente.

Aos meus pais, Benisio Ferreira da Silva e Luzinete Neves Ferreira pelo amor, força e sacrifícios.

À minha filha Maria Beatriz fonte de minha energia e perseverança. Meu grande estímulo.

À Angela Weber Andrusko por ter iluminado minha vida.

Ao **Prof. Dr. Luiz Antonio Ferreira da Silva** pelo exemplo como pessoa e como profissional.

AS INSTITUIÇÕES FINANCEIRAS

Este trabalho contou com o apoio financeiro das seguintes instituições:

Ministério da Saúde – MS

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq

Fundação de Apoio a Pesquisa de Alagoas – FAPEAL

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Luiz Antonio Ferreira da Silva, por ter me dado a oportunidade de realizar um sonho. Desenvolvi este trabalho utilizando os mais modernos recursos da biologia molecular orientado por um homem que é exemplo de profissionalismo e educação. Um exemplo a ser seguido. Por participar de forma efetiva em um passo importante na minha caminhada. Professor, sou muito grato por tudo que sou e que serei de agora em diante. Prometo transmitir seus ensinamentos da melhor forma. Obrigado por ter mudado minha vida para melhor, o senhor não imagina o quanto contribuiu para isso...

Ao Prof. Dr. Manoel Álvaro Lins Neto, por todos os ensinamentos, pelo exemplo profissional de dedicação à pesquisa e ética, pela confiança em meu trabalho e por ensinar como interagir de forma interdisciplinar.

À Prof^a Maria Lusía de Moraes Belo que apresentou o mundo da biotecnologia ainda na graduação e me mostrou a arma mais poderosa do mundo: o conhecimento.

À toda equipe do Laboratório de DNA Forense: Iede Ferreira, Dalmo Azevedo, André Santana, Gustavo Reis, Antonio Carlos, Djavan David, Elisângela, pelo companheirismo e força.

À Iede Ferreira que sempre me apoiou e contribuiu com sua sabedoria nos momentos difíceis e de total estresse por conta do trabalho. Grande amiga nas horas difíceis...e minha professora de pipetagem e organização!!

Agradecimento especial ao Gustavo Reis, meu amigo e parceiro no mundo da ciência. Por sempre acreditar em minhas idéias e trabalhar para realização de cada uma delas. Conseguimos vencer amigo! Ao Dalmo por todas as horas de discussão e questionamentos sobre trabalho. Obrigado Mestre Dalmo!

A minha amiga e companheira de ciência Régia Caroline, que sempre duvidou de minhas idéias, me dando mais força para mostrar que sempre é possível e que ela estava errada. Hoje realizo mais um sonho que ela duvidou que seria possível conseguir realizar... obrigado Régia!!

Ao Alessandro Varani que sempre me deu força pra seguir em frente, respeitando meus limites e me dando oportunidades únicas de conhecer o mundo da biotecnologia.

Ao Dr. Mauricio Matos do hospital Barão de Lucena em Recife, por me receber muito bem e contribuir neste trabalho.

Ao prof. Dr. Paulo Miranda (UFPE-Coordenação de Biomedicina) e à Prof^a. Valdenia (UFPE-LIKA) pela ajuda nos dias em que estive em Recife.

Aos professores da pós-graduação em Ciências da Saúde: Prof. Dr. Emiliano Barreto, Prof. Dr^a Salete Smanioto e Prof. Dr. Eurípedes Alves por me darem a

oportunidade de aprender mais e desenvolver trabalhos paralelos que contribuíram com meu conhecimento e habilidade laboratorial.

A todos os colegas do mestrado em Ciências da Saúde. Turma inesquecível.

Aos meus colegas Biomédicos.

Aos Professores: Dr. Jacinto Costa, Dr. Paulo Miranda e Carlos Daniel por acreditarem em mim e ter me dado a chance de difundir para os Biomédicos do nordeste nossa atuação em Biotecnologia.

A todos os membros do Centro Acadêmico Roberto Figueiredo – Biomedicina (CESMAC).

Ao Rafael Vital, um amigo que foi “vital” para concluir a análise estatística.

À Biomédica Nathália que me deu uma grande ajuda no período em que estive em Recife.

À Angela Weber Andrusko por me devolver a vida no período mais complicado ao longo destes vinte e nove anos. Dizem que você é o meu anjo, mas é muito mais que isso.

RESUMO

O câncer colorretal (CCR) é a terceira neoplasia maligna mais frequente no mundo, sendo no Brasil a quinta mais diagnosticada e a terceira causa de morte por câncer. A detecção de marcadores moleculares no sangue periférico aplica-se ao diagnóstico precoce de neoplasias, antes e após procedimento cirúrgico, diminuindo assim o tempo de identificação do CCR e melhorando o tratamento, que se torna menos invasivo e diminuindo os custos. O objetivo deste trabalho é quantificar, através da PCR em Tempo Real de forma absoluta e direta, os fragmentos de DNA Livre encontrados no soro de pacientes com câncer colorretal, determinando assim valores que caracterizam a condição de portador de tumor. Para isso, foi desenvolvido um método em que a quantificação utiliza como amostras de referências os próprios fragmentos ALU115 e ALU247 purificados e quantificados. Foram estudados 3 grandes grupos: *Controle*, com voluntários saudáveis; *Operados*, pacientes que já se submeteram à cirurgia para retirada de tumor colorretal; e *Não-Operados*, pacientes que ainda não retiraram o tumor através de cirurgia. Observando os resultados podemos notar que os grupos se diferenciam principalmente através dos valores da quantificação ALU247. Para o grupo *Controle*, os limites ficaram entre 91 fentogramas e 1,55 picogramas. O grupo *Não-Operados* apresentou quantidades que vão de 8,02pg a 23,54pg e, o grupo *Operados*, de 80fg a 5,95 pg. De forma contrária, os resultados apresentados pela quantificação ALU115 não permitiram estabelecer limites definidos capazes de diferenciar pelo menos um dos grupos. O grupo *Controle* apresentou como limites 2pg e 69,45pg; o grupo *Não-Operados*, 9,71pg e 381,56pg e; o grupo *Operados*, 10,69pg e 196,85pg. O grupo *Não-Operados* apresentou uma média significativa quando comparado aos outros dois grupos, porém apresentou menor heterogeneidade na quantificação ALU247 ($14,62\text{pg} \pm 4,73$ - $p < 0,05$). Foi possível concluir que a quantificação direta, utilizando como concentrações de referência os próprios fragmentos ALU115 e ALU247, mostrou-se uma metodologia simples, de baixo custo e com resultados confiáveis. Além disso, a quantificação ALU247 é capaz de identificar a condição de portador de tumor.

Palavras Chaves: DNA Livre. Câncer Colorretal. PCR em Tempo Real

ABSTRACT

The colorectal cancer (CRC) is the third most common malignancy in the world and in Brazil, the fifth most diagnosed and the third cause of cancer deaths. The detection of molecular markers in peripheral blood applies to the early diagnosis of cancer, before and after surgery, reducing the time of identification of CCR and improving the treatment, it is less invasive and reducing costs. This work is quantified by Real Time PCR in absolute and direct, free of DNA fragments found in the serum of patients with colorectal cancer, thereby determining values that characterize the condition of carrier of tumor. For this, a method was developed in which the measurement used as reference samples of the actual fragments ALU115 and ALU247 purified and quantified. We studied 3 major groups: Control, with healthy volunteers; surgery, patients who have already been submitted to surgical removal of colorectal tumor and non-surgery, patients who have not removed the tumor through surgery. Observing the results we note that the groups differ mainly by the values of quantification ALU247. For the control group, the limits were between 91 femtogramas and 1.55 picograms. The non operated group had amounts ranging from 8.02pg to 23.54pg and the group operators, 80fg to 5.95pg. In contrary, the results presented by quantification ALU115 did not set limits defined capable of differentiating at least one of the groups. The control group presented as limits 2pg and 69.45pg and the non operated group, 9.71pg and and 381.56pg, the group operated, 10.69pg and 196.85pg. The non operated group showed a mean significant when compared to the other two groups, but showed minor differences in the quantification ALU247 (14.62 ± 4.73 pg - $p < 0.05$). It could be concluded that direct measurement, using reference concentrations of the fragments themselves ALU115 and ALU247 is a simple methodology, low cost and with reliable results. Moreover, the quantification ALU247 is able to identify the condition of carrier of tumor.

Key Words: Free DNA. Colorectal Cancer. Real Time PCR

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	xiv
LISTA DE FIGURAS	xiv
LISTA DE TABELAS	xv
LISTA DE QUADROS	xvii
LISTA DE APÊNDICES	xviii
1 - INTRODUÇÃO	1
2 - REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 - O CÂNCER COLORRETAL (CCR).....	4
2.2 - COMPLICAÇÕES DO CCR PELO PROCESSO DE METÁSTASE.....	8
2.3 - APOPTOSE E CCR.....	8
2.4 - DIAGNÓSTICO MOLECULAR DO CCR.....	9
2.5 - REPETIÇÕES ALU.....	11
2.6 - DNA LIVRE.....	13
2.7 - DIFERENTES ABORDAGENS PARA UTILIZAÇÃO DO DNA LIVRE COMO MARCADOR TUMORAL.....	15
2.7.1 - Detecção de fragmentos contendo alterações microssatélites.....	15
2.7.2 - Detecção de fragmentos contendo mutações associadas a tumores.....	15
2.7.3 - Medição dos níveis de DNA Livre circulante 2.7.4 Detecção de DNA Viral Livre.....	16
2.7.5 - Detecção de fragmentos contendo sequências de genes supressores de tumor hipermetiladas.....	17
2.7.6 - Detecção de RNA mensageiro de genes associados a tumores.....	18
2.7.7 - Detecção de alterações nas propriedades físicas do DNA circulante.....	18
2.8 - RAZÕES QUE JUSTIFICAM MAIS ESTUDOS PARA IMPLANTAÇÃO DO DNA LIVRE COMO MARCADOR TUMORAL NA PRÁTICA CLÍNICA.....	20
3 - OBJETIVOS	21
4 - MATERIAIS E MÉTODOS	22
4.1 - AMOSTRA.....	22

4.1.1 - Características gerais da amostra	22
4.1.2 - Critérios de inclusão na amostra.....	22
4.1.3 - Critérios de exclusão na amostra.....	22
4.1.4 - Formação da amostra.....	23
4.2 - TRATAMENTO DA AMOSTRA PARA ANÁLISE – SORO	23
4.2.1 - Obtenção do soro	23
4.2.2 - Filtragem do soro em membrana de 0.45µm	23
4.2.3 - Tratamento do soro com tampão Tris-EDTA e Proteinase K.....	23
4.2.4 - Ensaio para confirmação de solução contendo apenas fragmentos de DNA Livre	24
4.3 - PREPARAÇÃO DE AMOSTRA PARA QUANTIFICAÇÃO ABSOLUTA	25
4.4 - PREPARAÇÃO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE REFERÊNCIA	25
4.5 - QUANTIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS ALU115 E ALU247 NAS AMOSTRAS DE SORO	26
4.6 - ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	27
5 - RESULTADOS	28
5.1 - VALIDAÇÃO DA TÉCNICA DE OBTENÇÃO DE SORO CONTENDO APENAS FRAGMENTOS DE DNA LIVRE	28
5.2 - FRAGMENTOS DE DNA LIVRE ALU115 E ALU247 COMO CONCENTRAÇÕES DE REFERÊNCIA	29
5.3 - AVALIAÇÃO DO ERRO EXPERIMENTAL	31
5.4 - QUANTIFICAÇÃO DE FRAGMENTOS ALU NOS GRUPOS	33
5.4.1 Quantificação ALU115 nos grupos.....	38
5.4.2 Quantificação ALU247 nos grupos.....	38
6 - DISCUSSÃO	39
6.1 - VALIDAÇÃO DA TÉCNICA DE OBTENÇÃO DE SORO CONTENDO APENAS FRAGMENTOS DE DNA LIVRE	39
6.2 - FRAGMENTOS DE DNA LIVRE ALU115 E ALU247 COMO CONCENTRAÇÕES DE REFERÊNCIA	40
6.3 - AVALIAÇÃO DO ERRO EXPERIMENTAL	44
6.4 - QUANTIFICAÇÃO DE FRAGMENTOS ALU NOS GRUPOS	44
6.4.1 Quantificação ALU115 nos grupos.....	46
6.4.2 Quantificação ALU247 nos grupos.....	46

7 - CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	47
8 - CONCLUSÃO	49
9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50
APÊNDICES	57

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1:	Sequência de bases da repetição ALU. Em destaque o sítio de restrição da enzima ALU.	12
FIGURA 2:	Sequência de bases da repetição ALU. Em destaque os primers ALU115.	19
FIGURA 3:	Sequência de bases da repetição ALU. Em destaque os primers ALU247.	19
FIGURA 4:	Fotografia do gel de agarose corado com brometo de etídio. Primeiro ensaio. A) CEA, B) GAPDH, C) ALU115, D) ALU247, E) TH01, F) FGA e G) LPL.	28
FIGURA 5:	Fotografia do gel de agarose corada com brometo de etídio. Segundo ensaio. A) ALU115, B) ALU247.	29
FIGURA 6:	Tela representativa das curvas de amplificação das soluções de referência (156pg - 152fg), curvas do paciente não operado, do paciente operado e do voluntário de grupo controle. Nesta tela estão sendo utilizados os fragmentos e o conjunto de primers ALU247.	30
FIGURA 7:	Tela representativa do coeficiente de correlação entre reações (R^2) de 0,994730 e o Slope de 3.61 indicando que a quantificação poderia ser realizada com alto índice de confiabilidade.	30
FIGURA 8:	Tela representativa de reação das soluções de referência e amostras de voluntários do grupo controle e pacientes não operados utilizando os primers ALU247. Seta azul), grupo <i>Não Operados</i> ; Seta vermelha) grupo <i>Controle</i>	31
FIGURA 9:	Concentração máxima e mínima de fragmentos ALU247 em cada grupo.	36
FIGURA 10:	Concentração máxima e mínima de fragmentos ALU115 em cada grupo.	36

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Relação dos genes envolvidos na carcinogênese do CCR e as funções celulares afetadas. Adaptada de Sjöblom <i>et al.</i> , 2006.....	6
TABELA 2: Erro experimental - 1ª coleta.....	27
TABELA 3: Erro experimental - 2ª coleta.....	27
TABELA 4: Tabela apresentando as quantificações ALU247 de cinco voluntários do grupo controle para avaliação de erro experimental	31
TABELA 5: Tabela apresentando as quantificações ALU115 de cinco voluntários do grupo controle para avaliação de erro experimental.	32
TABELA 6: Tabela apresentando as quantificações ALU247 de cinco voluntários do grupo controle para avaliação de erro experimental 1 mês depois da primeira quantificação.	32
TABELA 7: Tabela apresentando as quantificações ALU115 de cinco voluntários do grupo controle para avaliação de erro experimental 1 mês depois da primeira quantificação.	32
TABELA 8: Quantificações ALU247 do Grupo <i>Controle</i>	33
TABELA 8: Quantificações ALU247 do Grupo <i>Controle</i>	33
TABELA 9: Quantificações ALU115 do Grupo <i>Controle</i>	33
TABELA 10: Quantificações ALU247 do Grupo <i>Operados</i>	34
TABELA 11: Quantificações ALU115 do Grupo <i>Operados</i>	34
TABELA 12: Quantificações ALU247 do Grupo <i>Não-Operados</i>	35
TABELA 13: Quantificações ALU115 do Grupo <i>Não-Operados</i>	35
TABELA 14: Comparação entre as quantidades encontradas de cada grupo para ALU247	36
TABELA 15: Comparação entre as quantidades encontradas de cada grupo para ALU115.....	36
TABELA 16: Comparação entre as médias de quantificação ALU115 entre os grupos	38

TABELA 17: Comparação entre as médias de quantificação ALU247 entre os grupos	38
---	----

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1: Conjuntos de primers utilizados para confirmação de solução contendo apenas fragmentos de DNA Livre.	24
--	----

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A: Declaração de aprovação do projeto de pesquisa, pelo comitê de ética em pesquisa, da Universidade Federal de Alagoas.	57
APÊNDICE B: Termo de consentimento livre e esclarecido	58

1 - INTRODUÇÃO

É amplamente aceito que o câncer humano é uma doença genética causada por um acúmulo de mutações em oncogenes e genes supressores de tumor (Volgelstein e Kinzler, 2004).

O câncer colorretal (CCR) é uma das formas mais comuns de câncer nos países desenvolvidos e sua incidência tem crescido continuamente. Apesar de ser modelo bem caracterizado de carcinogênese, permanece como importante causa de mortalidade, afetando aproximadamente 782 mil pessoas em todo mundo a cada ano (Huerta, 2008).

É a terceira neoplasia maligna mais frequente no mundo (Araújo sea *et al.*, 2001), sendo no Brasil a quinta mais diagnosticada e a terceira causa de morte por câncer (Coura *et al.*, 2005). O número de casos novos de câncer de cólon e reto estimados para o Brasil em 2008 é de 12.490 casos em homens e de 14.500 em mulheres. Estes valores correspondem a um risco estimado de 13 casos novos a cada 100 mil homens e 15 para cada 100 mil mulheres (INCA., 2008).

Segundo os dados apresentados pelo Instituto Nacional do Câncer - INCA para o ano de 2008, há uma estimativa de 90 casos novos de câncer de cólon e reto para o estado de Alagoas, sendo 50 novos casos somente para a capital Maceió. Em Alagoas a maioria dos casos acomete mulheres, o que corresponde a 80% (INCA., 2008).

O CCR é mais frequente em indivíduos com idade superior a 60 anos (Araújo sea *et al.*, 2001). Jovens com câncer colorretal são considerados como tendo pior evolução, porém controvérsias ainda existem quanto às características destes tumores e prognóstico nesta população (Monteiro *et al.*, 2006).

As alterações genéticas sejam elas esporádicas ou hereditárias, resultam no desenvolvimento de adenocarcinoma na mucosa colorretal, sendo o avanço beneficiado pela não resposta dos fatores determinantes de crescimento celular, diferenciação e morte (apoptose), conduzindo à displasia e ao câncer invasivo (Araújo sea *et al.*, 2001).

As principais técnicas de investigação de CCR utilizadas isoladamente ou em combinação, incluem a pesquisa de sangue oculto nas fezes, sigmoidoscopia flexível e colonoscopia. O objetivo do rastreamento (*screening*) é reduzir a morbimortalidade em uma população-alvo. Evidências da literatura sobre métodos de

rastreio para grupos de risco são escassas e, muitas vezes não se apresentam a partir de estudos controlados. No entanto, estes métodos com os recentes avanços na genética molecular, certamente podem contribuir para uma maior eficácia e menor custo nos exames de investigação de caráter preventivo do CCR (Almeida *et al.*, 2000).

A presença de metástases representa, na maior parte dos casos, um sinal de irreversibilidade da doença. Aproximadamente 30% de todos os pacientes são portadores de metástases no momento do diagnóstico e, cerca de 30% a 40% daqueles sem doença metastática aparente neste momento irão desenvolvê-la posteriormente (Pinho, 2005).

Apesar dos avanços em novas abordagens terapêuticas para pacientes com câncer colorretal, a disseminação de células neoplásicas através da corrente sanguínea ou circulação linfática ao órgão distante, ainda é a principal causa de morte. Portanto, há necessidade urgente de estabelecer métodos sensíveis para a detecção precoce de micrometástases ou células tumorais no sangue periférico ou na circulação linfática de pacientes com CCR (Xu *et al.*, 2006).

A mortalidade persiste inalterada nos últimos 50 anos a despeito dos avanços obtidos em diagnóstico e tratamento. Grande parte dos doentes recebe um mau prognóstico por conta de tumores em estágio avançado ou incuráveis. Portanto, há necessidade de se rastrear na população, pacientes com lesões pré-malignas (pólipos adenomatosos) como resultado de herança genética ou idade, e de vigilância dos portadores de doença inflamatória intestinal de longa evolução. Na medida em que existem diferentes grupos de risco identificáveis para CCR e diferentes estratégias para o rastreamento, há que se determinar o protocolo de triagem capaz de oferecer maior relação custo-benefício, uma vez que o objetivo das técnicas de rastreamento é diminuir a morbi-mortalidade da população analisada (Almeida *et al.*, 2000).

Por não haver uma redução nos números de mortalidade no Brasil, devido à não aplicação de métodos mais eficientes de diagnóstico precoce e acompanhamento pós-operatório na pesquisa de metástases, pesquisas visando o desenvolvimento de estratégias ou métodos mais sensíveis e específicos estão sendo desenvolvidos incansavelmente. Os dados apresentados acima mostram a importância de se diagnosticar precocemente a formação de pólipos, porém, por

conta dos custos e da invasividade dos métodos, a parcela de pacientes com grandes chances de cura é pequena.

Estes dados mostram a importância do estudo e do desenvolvimento de técnicas ou estratégias para detecção precoce com um bom custo-benefício.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

No Brasil, o câncer em geral configura-se como problema de saúde pública de dimensão nacional. Com o aumento da expectativa de vida da população brasileira e com a progressiva industrialização e globalização, as neoplasias ganharam importância crescente no perfil de mortalidade do país, ocupando o segundo lugar como causa de óbito (Habr-Gama, 2005).

Apesar do interesse deste assunto, no Brasil como em muitos outros países, a percentagem média de sobrevida de 5 anos permanece estável em 50%, podendo chegar a 70% quando o atendimento é realizado em centros especializados em cirurgia colorretal. Somente 41% de todos os tumores colorretais são diagnosticados e tratados em estágio localizado, sem envolvimento linfático. O índice de sobrevida de 5 anos, quando o tumor é circunscrito à parede retal é de 70%, baixando para 40% para aqueles com doença não localizada. Nos doentes cujo CCR é detectado em fase assintomática, o índice de sobrevida de 5 anos alcança 90% (Habr-Gama, 2005).

Um dos fatores mais importantes para diminuição da morbi-mortalidade do câncer colorretal (CCR) é o tempo de evolução da lesão, por esse motivo, na suspeita de CCR pela história clínica e pelo exame físico, recomenda-se a realização de um exame proctológico (toque retal). A identificação correta do local da lesão colorretal e a possibilidade de realização de um exame completo fazem com que a retossigmoidoscopia (rígida ou flexível) seja sempre indicada na suspeita de câncer retal (Cordeiro *et al.*, 2001).

Segundo Winawer (1997), rastreamento é o teste indicado para prevenir doenças em indivíduos assintomáticos no caso do CCR, para descobrir quem tem pólipos adenomatosos ou CCR em estágio inicial.

O rastreamento do CCR se justifica por sua alta incidência e pela oportunidade de fazer o diagnóstico de pólipos e do CCR no estágio inicial, com

significante resultado terapêutico em população de risco. Por isso, deve-se conscientizar a população sobre a importância do estadiamento do CCR para aumentar as chances de detecção precoce (Monteiro *et al.*, 2006).

A detecção precoce de pólipos adenomatosos colorretais (precursores do câncer de cólon e reto) e de cânceres localizados é possível pela pesquisa de sangue oculto nas fezes e por intermédio de métodos endoscópicos (INCA, 2008).

Mesmo em países com recursos abundantes como os Estados Unidos, encontram-se dificuldades na realização de avaliação diagnóstica por exames endoscópicos em pacientes com presença de sangue oculto nas fezes, impossibilitando a implantação de rastreamento populacional. O objetivo dessa estratégia não é diagnosticar mais pólipos ou mais lesões planas, mas sim diminuir a incidência e a mortalidade por esse tipo de câncer na população alvo. A história natural dessa neoplasia propicia condições ideais à sua detecção precoce (INCA, 2008).

O rastreamento bem delineado do câncer colorretal reduz as taxas de mortalidade, alcançando a população de risco susceptível ao CCR, em indivíduos assintomáticos. Pode diminuir também a incidência da doença através da remoção de pólipos adenomatosos, interrompendo a sequência adenoma-carcinoma (Araújo sea *et al.*, 2001; Monteiro *et al.*, 2006).

2.1 - O CÂNCER COLORRETAL (CCR)

O câncer colorretal (CCR) é uma doença genética caracterizada pela presença de tumor maligno no cólon e/ou reto; duas partes do sistema digestivo conhecido como intestino grosso. É a terceira neoplasia maligna mais frequente no mundo, sendo no Brasil a quinta mais diagnosticada e a terceira causa de morte por câncer (Rocha *et al.*, 2000; Araújo sea *et al.*, 2001; Coura *et al.*, 2005; Monteiro *et al.*, 2006).

O número de óbitos é maior nas mulheres do que em homens e a idade acima de 60 anos de idade é considerada como um dos principais fatores de risco. Casos de indivíduos com menos 40 anos de idade apresentando câncer colorretal são incomuns e considerados de pior prognóstico, representando apenas 14,6% (Rocha *et al.*, 2000; Araújo sea *et al.*, 2001; Coura *et al.*, 2005; Monteiro *et al.*, 2006).

Modelos genéticos desenvolvidos para explicar a evolução da sequência adenoma-câncer demonstraram que adenoma de tamanhos variados apresenta diferentes tipos de proteínas mutadas, estabelecendo assim uma correlação entre o estágio do adenoma e a alteração genética correspondente (Fearon e Vogelstein., 1990).

Genes como o *K-ras*, *APC* e o *TP53* foram correlacionados com o tamanho dos tumores, grau de malignização e diferentes graus de displasia respectivamente (Ieda *et al.*, 1996).

Após o sequenciamento do genoma humano e a disponibilidade de sua informação para o meio científico, foram iniciadas inúmeras investigações na busca do conjunto de genes responsáveis pelo surgimento do câncer colorretal.

Sjöblom *et al* (2006) apresentaram os resultados da investigação de 13.023 genes em 11 amostras de tumor de câncer de mama e 11 amostras de tumor colorretal. Como resultado, 189 genes analisados apresentaram significativa frequência de mutações, sendo para o câncer colorretal 69 genes (tabela 1). A grande maioria destes genes não era conhecida por estarem muito alterados em tumores e, outros como *K-ras*, *APC* e o *TP53*, já conhecidos, foram confirmados. Estes genes afetam uma variedade de funções celulares como adesão, metabolismo e transporte celular.

Tabela 1: Relação dos genes envolvidos na carcinogênese do CCR e as funções celulares afetadas. Adaptada de Sjöblom *et al.*, 2006.

Função celular afetada	Genes relacionados
Mobilidade e Adesão celular	<i>PKHD1, CNTN4, ADAMTSL3, CHL1, OBSCN, HAPLN1, ADAMTS18, MGC33407, MMP2, MAP2, TLL3, EVL, ADAM29, CSMD3, ADAMTS15</i>
Sinalização Celular	<i>APC, PTPRD, KRAS, MCP, EPHA3, NF1, GUCY1A2, PTPRU, EPHB6, CD109, TGFB2, PHIP, GNAS, RET, P2RY14, LGR6</i>
Regulação da transcrição	<i>TP53, ZNF442, SMAD4, SMAD3, MLL3, EYA4, TBX22, PKNOX1, SMAD2, MKRN3, TCF7L2, HIST1H1B, RUNX1T1.</i>
Transporte Celular	<i>ABCA1, C6orf29, SLC29A1, SCN3B, P2RX7, KCNQ5</i>
Metabolismo Celular	<i>UQCRC2, ACSL5, GALNS</i>
Metabolismo de RNA	<i>SFRS6</i>
Resposta ao estímulo e danos no DNA / Ubiquitinização de proteínas	<i>FBXW7, K6IRS3, UHRF2, CD248, LMO7, ERCC6</i>

O CCR caracteriza-se pelo crescimento desordenado de células pré-neoplásicas no cólon e/ou reto e este crescimento dá origem à formação de pólipos colônicos do tipo adenoma (Araújo *et al.*, 2001). Os pólipos do tipo adenoma poderão sofrer transformação maligna; pacientes portadores deste tipo de adenoma tem de duas a três vezes mais chances de desenvolver câncer (Rocha *et al.*, 2000).

Os adenomas podem ser classificados histologicamente em viloso (consiste em glândulas da lâmina própria com formação papilar que se estendem do epitélio até a camada muscular da mucosa), tubular (composto por glândulas compactadas na lâmina própria) e túbulo-viloso (tem características dos dois tipos). O pólipo viloso tem maior chance de malignização em relação ao tubular. O pólipo do tipo hiperplásico não sofre transformação maligna e, portanto, não é uma lesão pré-neoplásica (Rocha *et al.*, 2000).

O fator de risco mais importante para esse tipo de neoplasia é a história familiar de câncer de cólon e reto e a predisposição genética ao desenvolvimento de doenças crônicas do intestino (como as poliposes adenomatosas). Dieta com base em gorduras animais, baixo consumo de frutas, legumes, cereais, e ainda o consumo excessivo de álcool e o tabagismo, contribuem com o aumento das chances de desenvolver CCR (Araújo *et al.*, 2001; Brasil, 2003; INCA, 2008).

A prática de atividade física regular está associada a um baixo risco de desenvolvimento do câncer de cólon e reto; além disso, a idade também é considerada um fator de risco, uma vez que tanto a incidência como a mortalidade aumenta proporcionalmente à idade (Brasil, 2003; INCA, 2008).

Há dois tipos de câncer colorretal segundo a avaliação das características clínicas: esporádico e hereditário. O esporádico é resultado da interação de mutações somáticas e fatores ambientais, ocorre geralmente em caso isolado na família ou em idade avançada. O hereditário está presente em famílias com suscetibilidade genética e ocorre após exposição a fatores de risco ambientais devido à baixa penetrância dos genes na família (Santos-Júnior, 2003; Coura *et al.*, 2005).

O acúmulo hereditário ou mudanças genéticas adquiridas resultam no desenvolvimento de adenocarcinoma na mucosa colorretal, tendo o avanço beneficiado pela não resposta dos fatores determinantes de crescimento celular, diferenciação e morte (apoptose), conduzindo à displasia e ao câncer invasivo (Araújo *et al.*, 2001).

2.2 - COMPLICAÇÕES DO CCR PELO PROCESSO DE METÁSTASE

Metástase é a transferência de uma afecção de uma parte do organismo para outra por meio de microorganismos ou de células anormais (doentes) transportadas pelo sangue ou pela linfa. As células cancerosas são especialmente propensas a produzir metástases. Essas células desprendem-se do tumor primário e são transportadas para outras partes do organismo, onde se alojam, se dividem e aumentam em número, dando origem a tumores secundários. Normalmente o que leva o doente ao óbito, não é o tumor primário e sim as metástases (Ballantyne e Quin, 1993; Pinho, 2005).

Cerca de 20 a 50% dos pacientes com câncer colorretal irão morrer dentro de 5 anos após o diagnóstico, usualmente como resultado de doença metastática. No tempo do diagnóstico, 20% dos pacientes têm metástase no fígado, sítio metastático predominante do câncer colorretal (Ballantyne e Quin, 1993).

Trinta por cento (30%) dos pacientes submetidos à ressecção colônica desenvolveram doença metastática, sugerindo existência de micrometástase fazendo parte deste processo de reincidência (Jaw *et al.*, 2006). Até mesmo com os recentes desenvolvimentos de estudos de imagem e outras modalidades de diagnóstico (exame ultra-sonográfico, tomografia computadorizada, exame radiológico simples de tórax) nem sempre é possível detectar a metástase em qualquer estágio da doença (Jaw *et al.*, 2006; Cordeiro *et al.*, 2001)

2.3 - APOPTOSE E CCR

A morte celular pode ser classificada baseada na fisiopatologia, no mecanismo molecular ou na morfologia das células afetadas. A apoptose é um termo cunhado por Kerr *et al.* em 1974. Eles observaram alterações morfológicas em células que foram morrendo de forma totalmente distinta daquelas que morreram por necrose, relacionando assim que essas mudanças são uma forma espontânea de morte celular. É um processo essencial para a manutenção do desenvolvimento dos seres vivos, sendo importante para eliminar células supérfluas ou defeituosas. Ocorre durante várias situações fisiológicas e patológicas, constituindo um mecanismo de remoção de células lesadas e, de renovação celular e tecidual (Takemura e Fujiwara, 2006; Grivicich *et al.*, 2007; Anazetti e Melo, 2007).

Durante a apoptose, a célula sofre alterações morfológicas características desse tipo de morte celular. Essas alterações começam com a retração da célula e segue com a perda de aderência com a matriz extracelular e células vizinhas, condensação da cromatina, fragmentação internucleossômica do DNA e formação dos corpos apoptóticos (Saraste e Pulkki, 2000; Takemura e Fujiwara, 2006; Grivicich *et al.*, 2007; Anazetti e Melo, 2007).

Outra característica muito marcante da morte por apoptose é a fragmentação internucleossômica do DNA, a qual possui um padrão característico e organizado. Uma endonuclease, a caspase 3, é ativada durante o processo e cliva o DNA produzindo fragmentos de tamanhos variáveis, mas sempre múltiplos de 200 pares de base. De forma exata, o menor destes fragmentos possui variação entre 185pb a 200pb (Saraste e Pulkki, 2000; Grivicich *et al.*, 2007).

O estudo da apoptose ajudou a elucidar questões relacionadas ao dano tóxico bem como os mecanismos de carcinogênese e teratogênese em vários tecidos. Desta forma, a indução da apoptose em adição à inibição da proliferação celular é a principal meta da estratégia para prevenção do câncer, assim como para o tratamento de neoplasias malignas instaladas (Bursch *et al.*, 2000).

Apoptose representa uma defesa celular inata contra tumorigênese por impedir que erros no DNA sejam transmitidos para células-filhas e assim limita o aumento o número de células neoplásicas. Indivíduos com alto risco para câncer colorretal frequentemente têm decréscimo na competência da apoptose na mucosa colônica de aparência normal em resposta a altos níveis fisiológicos de deoxilato, um ácido biliar que causa dano ao DNA (Grivicich *et al.*, 2007).

2.4 - DIAGNÓSTICO MOLECULAR DO CCR

Embora os exames histológicos obtidos com microscopia óptica permaneçam como os elementos de maior valor prognóstico, a crescente disponibilidade de métodos de estudo dos genes e moléculas existentes em cada espécime tumoral vem progressivamente tornando viável sua inclusão na prática clínica (Pinho, 2005; Xu *et al.*, 2006).

Para a maioria dos cânceres, a extensão da doença no momento do diagnóstico é um fator importante para determinar o tratamento. Para uma investigação mais precisa e para melhor triagem, foram pesquisados diversos

marcadores de doenças malignas. Os principais marcadores utilizados rotineiramente são proteínas produzidas principalmente por células tumorais (Xue *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006; Chan e Lo, 2007).

Infelizmente, apenas um subconjunto de cânceres é que secretam proteínas específicas que podem ser utilizadas como marcadores tumorais. Além disso, há proteínas que são produzidas por mais de um tipo de tumor como é o caso do antígeno carcinoembrionário (CEA) (Xue *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006; Chan e Lo, 2007).

A detecção de células tumorais na circulação sanguínea tem sido acompanhada primeiramente por técnicas baseadas na imunocitologia e citologia de fluxo. A maior limitação desses métodos é a baixa sensibilidade (Xu *et al.*, 2006).

Para estabelecer abordagens alternativas com alta sensibilidade e especificidade, ensaios baseados na PCR (polymerase chain reaction) tem sido usados, pois é uma técnica muito sensível e clinicamente usada para detectar marcadores cancerígenos em células tumorais circulantes (Guadagni *et al.*, 2001; Schuster *et al.*, 2004; Pinho, 2005; Giribaldi *et al.*, 2006).

Contudo, uma série de questionamentos realizados pela comunidade científica a grupos de pesquisa que utilizaram a Nested PCR convencional levou a relatos conflitantes sobre os métodos (Jung *et al.*, 1999; Schuster *et al.*, 2004).

A PCR pode amplificar DNA ou cDNA (DNA complementar ao RNA). A amplificação de trechos específicos de DNA tem a vantagem de identificar a presença na amostra de mutações específicas de tumores. No entanto, não se conhecem todas as mutações que ocorrem constantemente em cada gene relacionado ao câncer colorretal (Bustin *et al.*, 2006).

A recente disponibilidade de equipamento de PCR em tempo real mudou esta situação. A possibilidade de quantificação de pequenos níveis de RNAm permite a definição de valores de corte para a expressão de marcadores encontrados no sangue e, portanto, melhorando a sensibilidade e especificidade. Além disso, a quantificação confiável da expressão de um *housekeeping gene* (gene de função básica para manutenção e funcionamento celular, sendo constantemente expressos) permite um excelente controle de qualidade por amostragem, e diz respeito à concentração absoluta do marcador na amostra (Schuster *et al.*, 2004).

Diversos trabalhos publicados utilizaram a análise dos níveis de expressão de genes conhecidos do CCR e também de outros tipos de tumores, através da relação

entre os níveis de expressão destes genes e o surgimento do tumor, bem como seu estadiamento. Os resultados apresentados na literatura mostram que há uma relação direta entre o aumento da expressão de alguns genes e a agressividade de alguns tipos de tumor (Schuster *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2006; Giribaldi *et al.*, 2006).

Os marcadores empregados para detecção por RT-PCR de células tumorais são baseados em características específicas do tecido do qual o tumor se origina, assim o RNAm do antígeno carcinoembrionário (CEA) e das citoqueratinas (CK-20 e CK-19) são geralmente usados na detecção de muitos tipos de células tumorais de epitélio (Guadagni *et al.*, 2001; Schuster *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2006; Giribaldi *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006).

Resultados de pesquisas sugerem que o RNAm do CEA pode ser um marcador mais confiável do que a transcriptase reversa da telomerase (hTERT), a CK-19 e a CK-20 para a detecção de células cancerosas que circulam no sangue periférico de pacientes com CCR (Fiorella *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006).

Os custos para estabelecer uma rotina utilizando a RT-PCR ou métodos de diagnóstico através do sequenciamento de trechos do DNA ainda são altos quando comparados a outras técnicas utilizadas em laboratórios de patologia clínica (Ziegler *et al.*, 2002).

2.5 - REPETIÇÕES ALU

O DNA no genoma nuclear humano está organizado em 24 cromossomos distintos, sendo 22 autossomos e dois cromossomos sexuais. Cada cromossomo é formado por uma única molécula de DNA com alto grau de espiralização, com tamanho de 50 a 250 milhões de pares de bases. Todas as células nucleadas possuem um genoma completo, sendo que as células sexuais possuem 23 cromossomos (N) e as somáticas possuem dois conjuntos de cromossomos (2N) (Watson *et al.* 2006).

O genoma humano contém 3.164.700.000 pares de bases (A,T,G,C), organizadas em sequências codificantes, os genes, e sequências não codificantes. Há também os elementos repetitivos que são sequências de DNA que se repetem ao longo de todo o genoma (Batzer e Deininger, 2002; Human Genome Project Information, 2008)

O elemento repetitivo mais abundante no genoma humano são as sequências ALU, que recebem este nome por possuírem um sítio de restrição para endonuclease *Alu I*. É derivado do componente 7sl RNA da partícula de reconhecimento de sinal e contém um promotor da RNA polimerase III. A transposição desse elemento para regiões codificadoras e reguladoras de genes é responsável por muitas doenças herdáveis (MeSH, 2008).

O número de cópias ao longo do genoma humano é estimado em aproximadamente um milhão e quatrocentas mil cópias, o que corresponde a mais de 10% da massa do genoma humano (Umetani *et al.*, 2006a; Umetani *et al.*, 2006b).

Em média, o tamanho de cada sequência ALU é de 300 pares de base. Uma pequena variação ocorre por conta de uma repetição de adenina no comprimento 3' (figura 1). (Batzer e Deininger, 2002; Umetani *et al.*, 2006a; Umetani *et al.*, 2006b).

```

GGCCGGGCGCGGTGGCTCACGCCTGTAATCCCAAGCACTT
TGGGAGGCCGAGGCGGGTGGATCACCTGAGGTCAGGAGT
TCGAGACCAGCCTGGCCAACATGGTGA AACCCCGTCTCTA
CTAAAATACAAAATTAGCCGGGCGTGGTGGCGGGCGC
CTGTAATCCC AGCT ACTCGGGAGGCTGAGGCAGGAGAAT
CGCTTGAACCCGGGAGGCGGAGGTTGCAGTGAGCCGAGA
TCGCGCCACTGCACTCCAGCCTGGGCAACAAGAGCGAAA
CTCCGTCTCAAAAAAAAA

```

Figura 1: Sequência de bases da repetição ALU. Em destaque o sítio de restrição da enzima ALU.

2.6 - DNA LIVRE

A comunidade científica há muito tempo busca uma forma de diagnosticar o câncer de forma precoce, sensível e com mínimo de invasividade ao paciente. A detecção precoce é detectar a doença ainda no seu estágio inicial e pré-sintomático.

Ainda por razões não esclarecidas, as primeiras células neoplásicas não são destruídas pelo organismo e esta fase, seria o momento ideal para se iniciar o tratamento. Porém, através dos recursos utilizados hoje em dia, esta fase ainda não é detectada e o câncer só vem a ser diagnosticado quando se iniciam os sinais e os sintomas.

O estudo do DNA Livre no sangue periférico busca encontrar uma forma de relacioná-lo com o estado clínico dos portadores de câncer, agressividade do tumor e principalmente, buscam um meio de detectar precocemente o surgimento das primeiras células neoplásicas. Acredita-se que alguns destes fragmentos de DNA Livre são a prova da existência de tumor no organismo. Detectar este surgimento ou aumento seria então detectar precocemente o câncer.

O primeiro relato da existência de ácidos nucléicos presentes na corrente sanguínea foi feito por Mandel e Meitais em 1948. Obviamente, por questões limitantes às técnicas utilizadas na época, foi feito apenas o relato da presença. Koffler *et al* (1973) descreveram 25 anos mais tarde, a primeira quantificação destes ácidos nucléicos de forma indireta através de antígenos encontrados no soro, e relacionou tais quantidades com doenças como artrite reumatóide, glomerulonefrite crônica, leucemia, tumores malignos e infecções hospitalares (Koffler *et al.*, 1973; Leon *et al.*, 1977; Chan e Lo, 2007).

Quatro anos mais tarde, o nível de DNA livre no soro de 173 pacientes com diversos tipos de câncer e em 55 indivíduos saudáveis foi determinado através de radioimunoensaio por Leon *et al* (1977), mostrando que existiam diferenças entre os níveis encontrados em pessoas normais e pacientes portadores de algum tipo de câncer (Leon *et al.*, 1977; Chan e Lo, 2007).

A origem do DNA Livre no plasma/soro ainda não está totalmente conhecida. Resultados encontrados na literatura sugerem que podem ter origem de células que entraram em apoptose, células tumorais, leucócitos e vírus (Leon *et al.*, 1977; Chan e Lo, 2007; Zitt *et al.*, 2008)

Estes resultados interessantes estimularam diversas pesquisas que de diferentes formas tentaram relacionar o DNA achado em sangue periférico com doenças. Porém, a maior parte dos grupos de pesquisa começou a direcionar seus estudos para verificar a relação de existência entre DNA Livre circulante e cânceres. Dados encontrados na literatura têm demonstrado que o DNA detectado em amostras de plasma ou soro de pacientes com diversas doenças malignas tem

potencial para o diagnóstico e prognóstico molecular (Leon *et al.*, 1977; Anker *et al.* 1999; Ziegler *et al.*, 2002; Taback e Hoon, 2004; Gautschi *et al.*, 2004; Bremnes *et al.*, 2005; Chan e Lo, 2007; Zitt *et al.*, 2008).

A introdução da PCR no final dos anos 1980 e seu aperfeiçoamento ao longo dos últimos 20 anos têm permitido a detecção e quantificação de quantidades extremamente pequenas de amostras de DNA, especialmente quando feita através da PCR em tempo real. (Schuster *et al.*, 2004; Bremnes *et al.*, 2005; Bustin *et al.*, 2006).

Com a evolução das técnicas moleculares, mudanças sutis na quantidade de DNA Livre encontrado no plasma ou no soro de pacientes com câncer e de pessoas normais podem ser monitoradas, abrindo a possibilidade de utilizar ácidos nucléicos circulantes como uma nova geração de marcadores tumorais (Anker *et al.* 1999; Ziegler *et al.*, 2002; Bremnes *et al.*, 2005; Chan e Lo, 2007).

O potencial para o diagnóstico molecular e prognóstico é que os ácidos nucléicos de origem humana ou viral e, derivados de tumores podem ser obtidos a partir de sangue periférico por um procedimento minimamente invasivo, e utilizados como substitutos aos marcadores tumorais protéicos para acompanhar o curso da doença ou auxílio no diagnóstico precoce (Leon *et al.*, 1977; Anker *et al.* 1999; Ziegler *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2002; Taback e Hoon, 2004; Gautschi *et al.*, 2004; Bremnes *et al.*, 2005; Umetani *et al.*, 2006a; Umetani *et al.*, 2006b; Chan e Lo, 2007; Zitt *et al.*, 2008; Schmidt *et al.*, 2008).

Além disso, há também trabalhos que mostram que o DNA Livre tem outra aplicação importante na área de acompanhamento pré-natal. O DNA fetal pode ser detectado no sangue materno e está sendo usado para determinar identidade sexual, avaliar anomalias cromossômicas, e acompanhar a gravidez e as complicações associadas (Ziegler *et al.*, 2002; Zolotukhina *et al.*, 2005; González *et al.*, 2005; Ramos, 2006).

Dúvidas permanecem sobre a etiologia, as características, a estabilidade e as potenciais consequências que influenciam no aumento de DNA na circulação. No entanto, a base dos ensaios que monitoram ácidos nucléicos no plasma, soro e fluidos corporais, é um meio minimamente invasivo, fácil, prático para avaliação dos pacientes, e este é um dos principais pontos que torna o DNA Livre objeto de estudo de tantos grupos na área de diagnóstico molecular (Ziegler *et al.*, 2002; Taback e Hoon, 2004).

2.7 - DIFERENTES ABORDAGENS PARA UTILIZAÇÃO DO DNA LIVRE CIRCULANTE COMO MARCADOR TUMORAL

2.7.1 - Detecção de fragmentos contendo alterações microssatélites

A perda da heterozigotidade (LOH) é frequentemente demonstrada em tecidos tumorais. Existem evidências bem estabelecidas de que tumores colorretais malignos com instabilidade de microssatélites apresentam características que os destacam em diversos aspectos, quanto ao local de incidência, idade, aspectos histológicos e prognósticos (Chen *et al.*, 1996; Chan e Lo, 2007).

As alterações microssatélites observadas no plasma são idênticas às encontradas nos tumores primários dos respectivos pacientes, indicando sua origem tumoral. Porém, tecnicamente, como a taxa de detecção de LOH com um único marcador microssatélite é relativamente baixa, um painel de marcadores microssatélites é geralmente necessário para a detecção de LOH em tecidos tumorais e plasma/soro para alcançar a necessária sensibilidade (Chen *et al.*, 1996; Chan e Lo, 2007).

2.7.2 - Detecção de fragmentos contendo mutações associadas a tumores

Mutações em oncogenes e genes supressores tumorais são comumente detectados e estas mudanças são importantes na patogênese do câncer. O gene *K-ras* é um gene cuja mutação está relacionada ao estado de constante estimulação à divisão celular, contribuindo assim para o desenvolvimento da neoplasia (Chen *et al.*, 1996; Pinho, 2005).

Em 1994, Sorenson *et al* (1994) detectaram mutações no gene *K-ras* no plasma e tumores de três pacientes que sofriam de câncer pancreático. Estudos também relataram que mutações associadas a tumores podem ser encontradas no plasma/soro de indivíduos expostos a agentes cancerígenos, bem como a presença de tais mutações na prática, pode indicar um risco aumentado de desenvolver câncer (Chen *et al.*, 1996; Chan e Lo, 2007).

Outro alvo também já detectado foram sequências mutantes da p53 (gene que codifica uma proteína nuclear fosforilada com propriedades de ligação ao DNA.

Ela age como um fator de transcrição e interage com vários outros genes) no plasma de fumantes, porém o mais importante é que no mesmo estudo não houve detecção destas sequências no plasma de não-fumantes (Chen *et al.*, 1996; Hagiwara *et al.*, 2006).

Mutações em tumores específicos podem ocorrer de forma pontual e por isso nem todas as mutações serão detectadas em um mesmo instante. Para aumentar a especificidade, um conjunto de *primers* deveria ser utilizado. Devido a essas dificuldades técnicas, detecção de tumores associada a mutações no plasma/soro não tem sido amplamente utilizada como uma ferramenta clínica para detecção do câncer (Chan e Lo, 2007).

2.7.3 - Medição dos níveis de DNA Livre circulante

A medição dos níveis de DNA Livre circulante foi a primeira forma de utilizar o DNA Livre circulante no plasma/soro como marcador tumoral. Inicialmente o aumento de seus níveis foi relacionado a diversas doenças e cânceres, porém por limitações da época (década de 70), a quantificação era feita de forma indireta através de antígenos encontrados no soro ou radioimunoensaio (Koffler *et al.*, 1973; Leon *et al.*, 1977; Chan e Lo, 2007).

O problema para esse tipo de abordagem é que, apenas medir os níveis de DNA Livre não é uma forma clara de estabelecer uma relação com o câncer, uma vez que existem resultados de pesquisas com DNA Livre que mostram outras condições fisiológicas (como gravidez e traumas) e outras doenças, elevando os níveis de DNA no plasma/soro (Chan e Lo, 2007).

2.7.4 - Detecção de DNA Viral Livre

Pesquisas de cânceres causados por vírus também foram objetos de pesquisas para DNA Livre. Em pacientes com câncer nasofaríngeo (NPC) foi detectado material genético do vírus Epstein-Barr (EBV). Através da quantificação do genoma viral no soro, estudos sobre o prognóstico do câncer foram feitos e puderam concluir que há relação entre os níveis de DNA viral e o estado clínico dos pacientes (Lo *et al.*, 1999; Lo *et al.*, 2000; Lei *et al.*, 2002).

Em contraste com a detecção de tumores, mutações associadas e alterações microssatélites, a detecção e quantificação do DNA viral no plasma humano por PCR em tempo real é relativamente simples, precisa e rápida. Todo o processo de coleta de sangue para análise pode ser concluído em 3 h. Portanto, DNA viral detectado no plasma tem um elevado potencial de aplicação clínica. De fato, a análise quantitativa do DNA do EBV (vírus Epstein-Barr) tem sido adotada por vários centros como rotina, um teste clínico para a detecção, acompanhamento e prognóstico do NPC (Lo *et al.*, 1999; Lo *et al.*, 2000; Lei *et al.*, 2002; Chan e Lo, 2007).

2.7.5 - Detecção de fragmentos contendo seqüências de genes supressores de tumor hipermetiladas

Um dos fatores reguladores intrínsecos da detecção de fragmentos contendo seqüências de genes supressores de tumor hipermetiladas é a colocação de um radical metila na cadeia de DNA anteriormente a um determinado gene. Hipermetilar é uma forma de silenciar um gene e esta característica é detectada em DNA Livre no plasma/soro (Pinho, 2005; Bazan *et al.*, 2006; Chan e Lo, 2007).

Além disso, em contraste com a detecção de DNA viral que só é útil para cânceres associados a vírus, a hipermetilação de genes supressores tumorais é amplamente observada em diferentes tipos de cânceres e, conseqüentemente, a detecção destas alterações no plasma pode ser aplicada a uma ampla variedade de cânceres (Bazan *et al.*, 2006; Chan e Lo, 2007).

2.7.6 - Detecção de RNA mensageiro de genes associados a tumores

RNAses estão em níveis elevados no soro de pacientes com câncer. Por este motivo, imaginava-se que não haveria RNA mensageiro livre no soro com integridade suficiente para permitir a amplificação por transcrição reversa (RT-PCR). Porém, Kopreski *et al.* (1999) conseguiram amplificar o RNAm da tirosinase presente no soro de pacientes com melanoma (Kopreski *et al.*, 1999; Chan e Lo, 2007).

Porém, mais estudos sobre a detecção de RNAm no soro devem ser realizados pois, ele é mais instável que o DNA, logo, está mais propenso a degradação em um curto tempo de duração no plasma/soro (Chan e Lo, 2007).

2.7.7 - Detecção de alterações nas propriedades físicas do DNA circulante

As primeiras provas de que existe DNA Livre circulante oriundo de células tumorais foram dadas através de estudos das propriedades físicas do DNA circulante no sangue periférico.

O primeiro trabalho foi realizado por Stroun *et al.*, (1989) mostrando uma diferença significativa na estabilidade dos fragmentos encontrados em tecidos tumorais e os fragmentos encontrados em pessoas saudáveis.

Outra forma de explorar a propriedade física é utilizar como referência a diferença que existe entre o tamanho do DNA que teoricamente é de origem apoptótica e DNA liberado de células neoplásicas. Tem sido proposto que em indivíduos normais, os fragmentos de DNA circulante no soro são em sua grande maioria derivados de células apoptóticas. Pacientes com câncer teriam um outro tipo de fragmento, oriundo de células neoplásicas que se diferenciaria pelo tamanho (Chan *et al.*, 2004; Umetani *et al.*, 2006a; Umetani *et al.*, 2006b).

O DNA Livre circulante no plasma é um promissor biomarcador para câncer porque contém DNA liberado de células tumorais mortas. Diferente do DNA fragmentado (entre 185 – 200pb) por processo natural de apoptose liberado de células normais, a presença de fragmentos maiores e sem nenhum padrão, indica presença de células neoplásicas no sangue periférico (Jahr *et al.*, 2001; Umetani *et al.*, 2006a; Umetani *et al.*, 2006b; Langford *et al.*, 2007).

Umetani *et al.* (2006a) desenhou um conjunto de primers capaz de diferenciar os fragmentos de origem apoptótica dos fragmentos de origem tumoral. O primeiro par de primers nomeado de ALU115 amplifica, em amostras de soro, todos fragmentos apoptóticos e não apoptóticos presentes (figura 2). O segundo par de primers, chamados de ALU247, amplifica apenas fragmentos de origem não apoptótica (figura 3).

Através de PCR em Tempo Real, a quantidade destes fragmentos é medida e relacionada com o estado clínico de pacientes com câncer de mama (Umetani *et al.*, 2006b).

```

GGCCGGGCGCGGTGGCTCACGCCTGTAATCCCAGCACTT
TGGGAGGCCGAGGCGGGGTGGATCA CCTGAGGTCAGGAGT
TCGAGACCAGCCTGGCCAACATGGTGAAACCCCGTCTCTA
CTAAAATACAAAATTAGCCGGGCGTGGTGGCGGGCGC
C TGTAATCCCAGCTACTCGGGAGGCTGAGGCAGGAGAAT
CGCTTGAACCCGGGAGGCGGAGGTTGCAGTGAGCCGAGA
TCGCGCCACTGCACTCCAGCCTGGGCAACAAGAGCGAAA
CTCCGTCTCAAAAAAA

```

Figura 2: Sequência de bases da repetição ALU. Em destaque os primers ALU115.

```

GGCCGGGCGCG GTGGCTCACGCCTGTAATCCCAGCACTT
TGGGAGGCCGAGGCGGGGTGGATCACCTGAGGTCAGGAGT
TCGAGACCAGCCTGGCCAACATGGTGAAACCCCGTCTCTA
CTAAAATACAAAATTAGCCGGGCGTGGTGGCGGGCGC
CTGTAATCCC AGCTACTCGGGAGGCTGAGGCAGGAGAAT
CGCTTGAACCCGGGAGGCGGAGGTTGCAGTGAGCCGAGA
TCGCG CCACTGCACTCCAGCCTGGGCAACAAGAGCGAAA
CTCCGTCTCAAAAAAA

```

Figura 3: Sequência de bases da repetição ALU. Em destaque os primers ALU247.

2.8 - RAZÕES QUE JUSTIFICAM MAIS PESQUISAS PARA IMPLANTAÇÃO DO DNA LIVRE COMO MARCADOR TUMORAL NA PRÁTICA CLÍNICA

Os resultados obtidos em vários trabalhos com câncer têm aberto uma nova área de investigação que indica que o DNA Livre no plasma/soro pode, eventualmente, ser o objeto de estudo adequado para o desenvolvimento de um método de diagnóstico e prognóstico não-invasivo e acompanhamento para o câncer

(Leon *et al.*, 1977; Anker *et al.* 1999; Ziegler *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2002; Taback e Hoon, 2004; Gautschi *et al.*, 2004; Bremnes *et al.*, 2005; Umetani *et al.*, 2006a; Umetani *et al.*, 2006b; Chan e Lo, 2007; Zitt *et al.*, 2008; Schmidt *et al.*, 2008).

Existem dados de relevância clínica, no entanto, há a necessidade de mais estudos clínicos prospectivos para validar e uniformizar eventuais testes de DNA ou RNA Livres no plasma ou soro de indivíduos de alto risco ou de pacientes com câncer. (Ziegler *et al.*, 2002; Taback e Hoon, 2004; Bremnes *et al.*, 2005).

Não há ainda um consenso sobre o tipo de amostra e protocolo para análise de ácidos nucleicos circulantes. Alguns trabalhos usam plasma, outros soro, além disso, fatores pré-analíticos influenciam diretamente no resultado final. A normatização desses fatores pré-analíticos é uma questão importante (Chan e Lo, 2007).

Um problema observado entre os artigos científicos publicados é a diferença entre o número de pessoas estudadas, e esta diferença pode influenciar em resultados diferentes, mesmo utilizando tecnologias semelhantes. Este conflito causa insegurança e pesquisas em larga escala seriam necessárias para abordar a real sensibilidade e a utilidade clínica de cada uma das abordagens com DNA Livre (Ziegler *et al.*, 2002; Taback e Hoon, 2004; Bremnes *et al.*, 2005; Chan e Lo, 2007).

A utilização de tecnologias que não requerem tratamento pós-PCR, como por exemplo, a PCR em Tempo Real é extremamente útil para minimizar possíveis contaminações além de dar resultados mais confiáveis devido a sua alta sensibilidade (Chan e Lo, 2007).

Por não haver um consenso de protocolo, de tipo de amostra e a reprodutibilidade dos resultados já apresentados, isto é, outros grupos de pesquisa repetindo trabalhos já publicados e validando-os, é que a utilização do DNA Livre como marcador tumoral ainda não foi implantada como ferramenta médica. Diferentemente da sua utilização para sexagem fetal que, após inúmeros trabalhos com resultados confiáveis, passou a ser utilizada.

3 - OBJETIVOS

Objetivo Geral: Quantificar de forma direta fragmentos de DNA Livre no soro de pacientes portadores de câncer colorretal, utilizando o sistema SYBRGreen de PCR em Tempo Real.

Objetivos específicos:

- Determinar valores que caracterizem a condição de portador de tumor;
- Encontrar quais as quantidades de fragmentos presentes em pessoas saudáveis;
- Encontrar quais as quantidades de fragmentos presentes em pacientes não operados para retirada do tumor;
- Encontrar quais as quantidades de fragmentos presentes em pacientes que já se submeteram à cirurgia para retirada do tumor;
- Determinar qual o melhor marcador para análise através de fragmentos apoptóticos e não apoptóticos.

4 - MATERIAIS E MÉTODOS

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de Alagoas, com processo de número 014851/2006-84, com base no item VIII. 13, b, da Resolução nº. 196/96 (Apêndice A).

4.1 - AMOSTRA

4.1.1 - Características Gerais da Amostra

Foi analisada uma amostra constituída de 90 voluntários que concordaram em se submeter à pesquisa, assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice B) para doação de amostra de sangue periférico. A amostra é constituída de 3 grupos distintos:

- Grupo-controle = 30 indivíduos saudáveis.
- Grupo de Pacientes Não-Operados: 27 pacientes com câncer diagnosticado que ainda não haviam se submetido à cirurgia para retirada do tumor.
- Grupo de Pacientes Operados: 33 pacientes que já se submeteram à cirurgia para retirada do tumor.

4.1.2 - Critérios de Inclusão na Amostra

Para o grupo-controle foram aceitos os voluntários com idade entre 45 e 80 anos, correspondentes à idade apresentada dos pacientes dos grupos *Não-Operados* e *Operados* e sem histórico de câncer colorretal na família.

4.1.3 - Critérios de Exclusão na Amostra

Não participaram do grupo-controle gestantes, tabagistas e pessoas com histórico de câncer na família (parente de 1º ou 2º grau). Os portadores de CCR *Não-Operados* e *Operados* que se recusaram a participar da pesquisa, não tiveram suas informações usadas neste trabalho.

4.1.4 - Formação da Amostra

Os pacientes eram convidados a participar da pesquisa logo após realizarem sua consulta ao médico responsável Prof. Dr. Manoel Álvaro Lins Neto, no ambulatório de proctologia do Hospital Universitário. A metodologia, objetivos e forma de participação foram explicados de forma detalhada e, após o consentimento dos convidados, realizou-se a coleta da amostra doada.

4.2 - TRATAMENTO DA AMOSTRA PARA ANÁLISE – SORO

4.2.1 - Obtenção do soro

Em tubo bioquímico de 8 ml com gel separador de soro (BD - Becton, Dickinson and Company) foram coletados na prega do cotovelo, 4 ml de sangue por punção venosa à vácuo. Cada tubo ficou em temperatura ambiente até formação do coágulo. Após a coagulação, o tubo foi centrifugado por 10 min. a 1000g, para separação do soro através do gel. As amostras foram processadas antes de completarem 6 horas após a coleta para evitar perda de DNA Livre, como descrito na literatura (Umetani *et al.*, 2006).

4.2.2 - Filtragem do soro em membrana de 0,45 μ

Um conjunto para passagem do soro através da membrana de acetato celulose foi montado através do encaixe de uma unidade filtrante de 26mm de diâmetro e área de filtração de 5,3cm² (Minisart – Sartorius) em uma seringa de 3ml estéril (BD - Becton, Dickinson and Company).

4.2.3 - Tratamento do soro com tampão Tris-EDTA e Proteinase K

Do tubo contendo 1ml de soro filtrado foram transferidos 100 μ l para um novo microtubo de 1,5ml. Foi adicionado 100 μ l de tampão T.E. (10mM Tris, HCl pH 8,0 e 0,1mM de EDTA) e homogeneizado manualmente. Em seguida, adicionou-se 2 μ l de Proteinase K (Invitrogen) a 16 μ g/ μ l e a solução foi incubada em banho-maria por 1

hora à 56°C. A segunda parte do tratamento foi finalizada aquecendo o tubo à 100°C por 8 min. e ao término, o tubo foi centrifugado por 5 min. à 10.000g.

4.2.4 - Ensaio para confirmação de solução contendo apenas fragmentos de DNA Livre

Utilizando um conjunto de 7 primers (quadro 1) para confirmação de solução contendo apenas fragmentos de DNA Livre, foram realizados dois ensaios com moldes diferentes. No primeiro ensaio foi utilizado como molde o DNA extraído de leucócitos por Chelex 100 (Wash, 1994) e no segundo, o soro filtrado e tratado.

Para esta avaliação foram utilizados três primers para identificação humana, dois primers de genes humanos e os primers descritos por Umetani *et al.* (2006a) ALU115 e ALU247. Ambos os ensaios utilizaram para cada reação 1X tampão de PCR (10mmol/l Tris-HCL, pH 8,0, 50mmol/l KCL, 2mmol/l MgCl₂), 50mM de dNTP, 2μM de primers, e 1U. Taq DNA polimerase em volume total volume de 20μl em 35 ciclos com 30 segundos de desnaturação a 95°C, anelamento a 60°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2%.

Quadro 1: Conjunto de primers utilizados para confirmação de solução contendo apenas fragmentos de DNA Livre.

Conjunto de primers	Sequências <i>foward</i> e <i>reverse</i>
Para identificação Humana (TH01, LPL e FGA)	<u>TH01</u> foward 5'-ATTCAAAGGGTATCTGGGCTCTGG-3'; reverse 5'-GTGGGCTGAAAAGCTCCCGATTAT-3' <u>LPL</u> foward 5'-ATCTGACCAAGGATAGTGGGATATA-3'; reverse 5'-CCTGGGTAAGTACTGAGCGAGACTGTGTC-3' <u>FGA</u> foward 5'-GGCTGCAGGGCATAACATTA-3'; reverse 5'-ATTCTATGACTTTGCGCTTCAGGA-3'
Genes Humanos (Antígeno carcinoembrionário - CEA e Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase – GAPDH)	<u>CEA</u> foward 5'-AACTGGTGTCCCGGATATCA-3'; reverse 5'-ATATTCTTTGCTCCTTGCCA-3' <u>GAPH</u> foward 5'-CCTCAAGATCATCAGCAATGC-3'; reverse 5'-GGAAACTGTGGCGTGATGG-3'
Umetani <i>et al</i> (2006)	<u>ALU115</u> foward 5'-CCTGAGGTCAGGAGTTCGAG-3'; reverse 5'-CCCGAGTAGCTGGGATTACA-3' <u>ALU247</u> foward 5'-GTGGCTCACGCCTGTAATC-3'; reverse 5'-CAGGCTGGAGTGACGTGG-3'

4.3 - PREPARAÇÃO DE AMOSTRA PARA QUANTIFICAÇÃO ABSOLUTA

Do tubo com 200 μ l de soro tratado foram utilizados 10 μ l e adicionados 30 μ l de H₂O MilliQ. Destes 40 μ l de cada amostra, 12 μ l foram usados na quantificação dos fragmentos ALU115 e 12 μ l para quantificação dos fragmentos ALU247.

4.4 - PREPARAÇÃO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE REFERÊNCIA

Para quantificação absoluta dos fragmentos ALU115 e ALU247 foi utilizado o próprio DNA Livre do soro amplificado com os primers ALU115 e ALU247.

O DNA Livre foi amplificado em reação de PCR de 20 μ l através de utilizando 1X tampão de PCR (10mmol/l Tris-HCL, pH 8,0, 50mmol/l KCL, 2mmol/l MgCl₂), 50 mM de dNTP, 2 μ M de primers, e 1 U. Taq DNA polimerase em volume total em 35 ciclos com 30 segundos de desnaturação a 95°C, anelamento a 60°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos.

O DNA amplificado foi purificado com Fenol-Clorofórmio (FC 1:1) e sua concentração determinada por espectrofotometria. O DNA em seguida foi diluído e as seguintes concentrações foram utilizadas como referência (10ng; 5ng; 2,5ng; 1,25ng; 625pg; 312pg; 156pg; 78pg; 39pg; 19,5pg; 9,75pg; 4,87pg; 2,43pg; 1,21pg; 609fg; 304fg; 152fg; 76fg; 38fg; 19fg; 9,5fg; 4,75fg; 2,37fg; 1,18fg).

Para a escolha das cinco concentrações que seriam utilizadas para quantificar as amostras, foi realizada uma corrida na PCR em Tempo Real inicialmente com 3 concentrações diferentes (10ng, 19,5pg e 19fg), com 3 amostras de soro de pacientes não operados, 3 amostras de pacientes operados e 3 amostras de voluntários do grupo-controle escolhidas aleatoriamente. A avaliação foi feita observando as curvas de amplificação apresentadas no software 7500 SDS v.1.3.1.21 (Applied Biosystems) que analisa os ensaios de PCR em Tempo Real. As curvas que mais se aproximaram das 9 amostras foram as escolhidas. Desta avaliação inicial foi possível escolher 5 concentrações para quantificação dos fragmentos ALU115 (156pg, 39pg, 9,75pg, 1,21pg e 609 fg) e dos ALU247 (156pg, 39pg, 1,21pg, 304fg e 152fg).

4.5 - QUANTIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS ALU115 e ALU247 NAS AMOSTRAS DE SORO

A reação foi feita em PCR em Tempo Real modelo 7500 standard (Applied Biosystems) em modo de emulação com temperatura inicial de 95°C por 10 minutos, seguida de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto, sendo escolhida esta última parte do ciclo para captação do sinal do SYBRGreen®.

Em uma placa de 96 reações, cada amostra de soro foi quantificada através de 3 reações (tríplicas) de 20µl, totalizando 27 pessoas por placa. O mesmo para cada solução de fragmentos ALU115 e ALU247, cada concentração possuía 3 reações. Para cada reação utilizou-se 10µl de PCR Master MIX SYBR Green® (Applied Biosystems), 4µl de H₂O MilliQ, 4µl da solução de fragmentos ALU (115 ou 247) para referência e 2µl de primers ALU115 ou ALU247 a 2µM.

Ao final de cada ensaio eram analisadas as curvas das três reações de cada amostra, observando se eram semelhantes, apresentando mesmo comportamento de reação e, se estavam todas no mesmo ciclo no momento em que ultrapassaram o Cycle threshold (Ct). As amostras que apresentaram divergências entre as reações foram repetidas em novos ensaios até apresentarem resultados consistentes entre as três reações.

As concentrações de referência também deveriam apresentar o mesmo comportamento entre as três reações, bem como, respeitar a distância entre os ciclos, isto é, de uma solução mais concentrada para outra menos concentrada a diferença de ciclos deveria obedecer a diferença das concentrações. Sendo assim, as reações de 156pg ultrapassavam o Ct no 12º ciclo logo, as reações de 39pg deveriam ultrapassar o Ct no 14º ciclo. Placas cujas concentrações de referência falharam, foram totalmente repetidas.

4.6 - AVALIAÇÃO DE ERRO EXPERIMENTAL

Amostras de 5 voluntários do grupo-controle foram quantificadas e após 30 dias realizou-se nova coleta dos mesmos voluntários para uma segunda quantificação. Nesta segunda coleta, foram escolhidos aleatoriamente dos 5 voluntários, 2, para que de cada um deles fossem coletados dois tubos.

Tabela 2: Erro experimental - 1ª coleta

Avaliação de Erro Experimental 1º Coleta
Voluntário 1
Voluntário 2
Voluntário 3
Voluntário 4
Voluntário 5

Tabela 3: Erro experimental - 2ª coleta

Avaliação de Erro Experimental 2º Coleta (30 dias depois)	
Voluntário 1 (Tubo A)	Voluntário 1 (Tubo B)
Voluntário 2	
Voluntário 3	
Voluntário 4 (Tubo A)	Voluntário 4 (Tubo B)
Voluntário 5	

4.7 - ANÁLISE ESTÁTISTICA

A comparação das médias entre os grupos foi realizada através da análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey. Quando comparamos a quantificação dos fragmentos ALU115 e ALU247 de um mesmo grupo utilizou-se o teste *t* para variâncias desiguais. Os cálculos estatísticos foram realizados através dos softwares Epi Info v.3.3.2 (ANOVA e Tukey) e STATA Statistical Software v.10. Para todas as análises estatísticas adotou-se um nível de significância estatística de 5%, ou seja, $p \leq 0,05$.

5 - RESULTADOS

5.1 - VALIDAÇÃO DA TÉCNICA DE OBTENÇÃO DE SORO CONTENDO APENAS FRAGMENTOS DE DNA LIVRE

No primeiro ensaio, amplificando o DNA extraído de leucócitos de sangue periférico com os 7 conjuntos de primers, ocorreu a amplificação de todas as reações, visualizadas em gel de agarose 2% (figura 4).

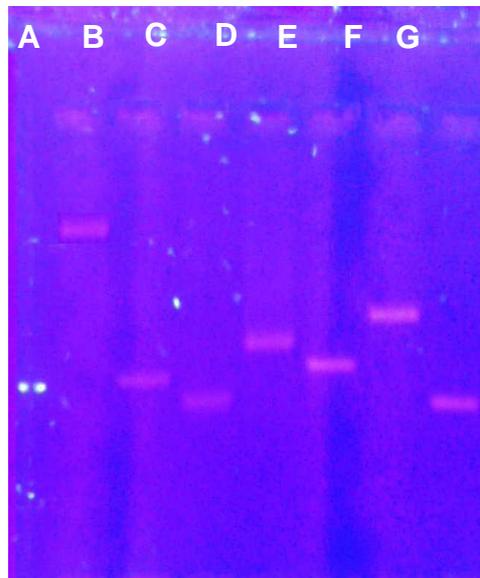


Figura 4: Fotografia do gel de agarose corado com brometo de etídio. Primeiro ensaio. A) CEA, B) GAPDH, C) ALU115, D) ALU247, E) TH01, F) FGA e G) LPL.

No segundo ensaio, amplificando o soro filtrado e tratado com proteinase K, com os mesmos 7 conjuntos de primers, tivemos como resultado a amplificação apenas do conjunto de primers ALU115 e ALU247, indicando que não havia a presença de DNA genômico após todo o protocolo de obtenção dos fragmentos (figura 5).

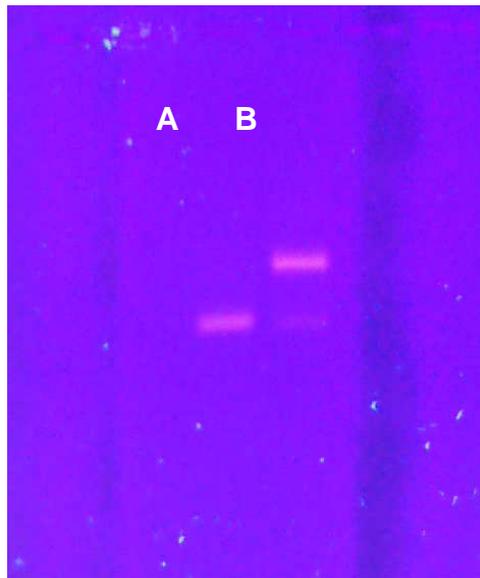


Figura 5: Fotografia do gel de agarose corada com brometo de etídio. Segundo ensaio. A) ALU115, B) ALU247.

5.2 - FRAGMENTOS DE DNA LIVRE ALU115 e ALU247 COMO CONCENTRÇÕES DE REFERÊNCIA

A utilização de fragmentos ALU115 e ALU247 nas soluções de referência apresentou reações de resultados constantes e reprodutíveis. Suas curvas respeitaram as diferenças de concentrações e de distância entre os ciclos.

Foram escolhidas aleatoriamente três amostras de soro. Uma de paciente não operado, uma de paciente já operado e uma amostra de um voluntário do grupo-controle. Foi feito então um novo ensaio com onze concentrações diferentes para escolher quais as cinco que seriam utilizadas como referência para quantificar todas as amostras. As soluções escolhidas foram 156pg, 78pg, 39pg, 19,5pg, 9,75pg, 4,87pg, 2,43pg, 1,21pg, 609fg, 304fg, 152fg por apresentarem excelente rendimento, boa reprodutibilidade entre as reações da triplicata e por se aproximarem das curvas do paciente não operado, do paciente operado e do voluntário de grupo-controle para ambos os conjuntos de primers (figura 6 e 7).

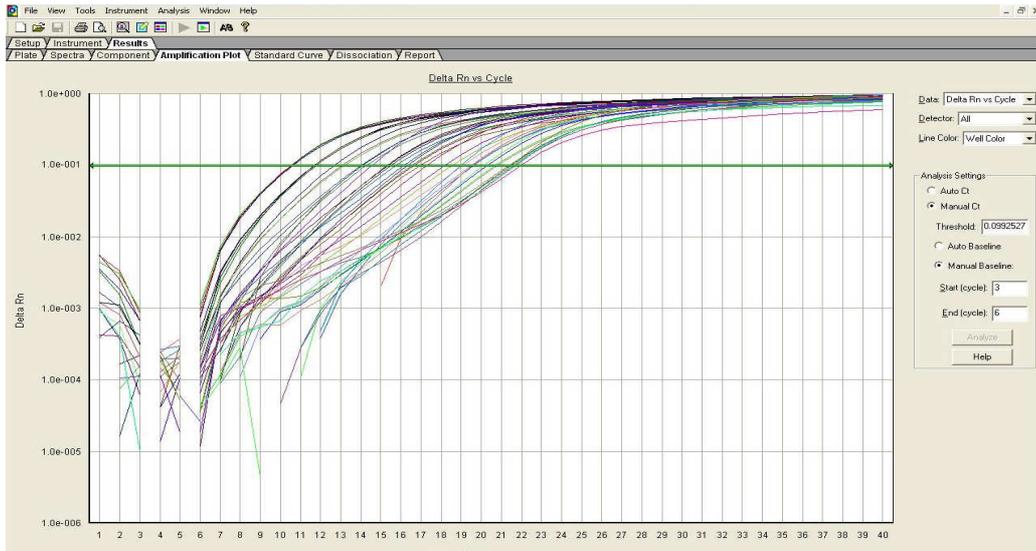


Figura 6: Tela representativa das curvas de amplificação das soluções de referência (156pg - 152fg), curvas do paciente *não-operado*, do paciente *operado* e do voluntário de grupo-controle. Nesta tela estão sendo utilizados os fragmentos e o conjunto de primers ALU247.

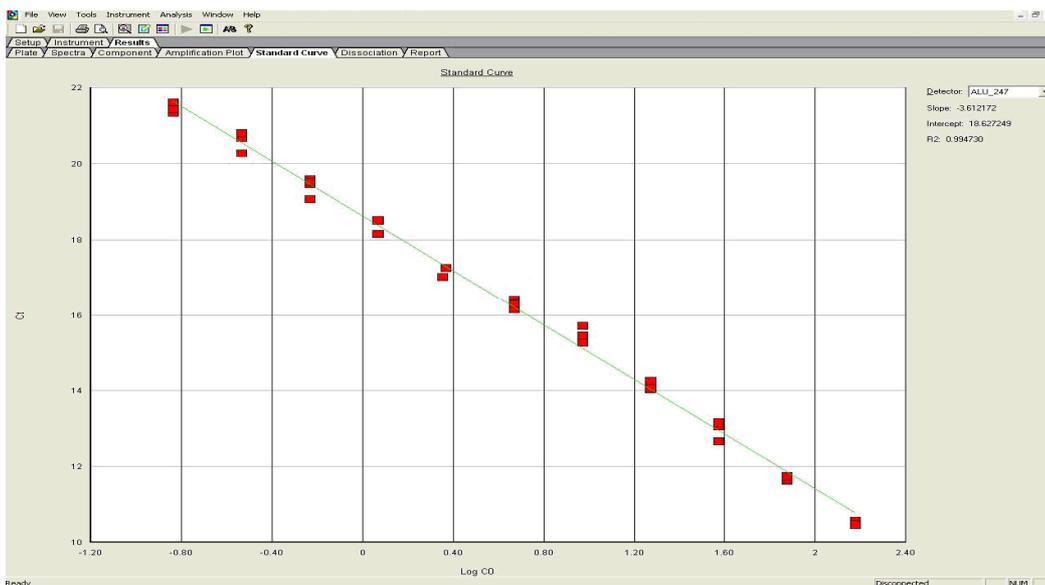


Figura 7: Tela representativa do coeficiente de correlação entre reações (R^2) de 0,994730 e o Slope de 3.61, indicando que a quantificação poderia ser realizada com alto índice de confiabilidade.

Foram então escolhidas entre as onze concentrações, as cinco que apresentaram melhor comportamento (reprodutibilidade entre as três reações). As concentrações escolhidas para quantificar os fragmentos ALU247 foram (156pg, 39pg, 1,21pg, 304 fg e 152 fg) e para ALU115 (156pg, 39pg, 9,75pg, 1,21pg e 609 fg). A partir destas definições iniciamos a quantificação absoluta e direta das amostras de soro (figura 8).

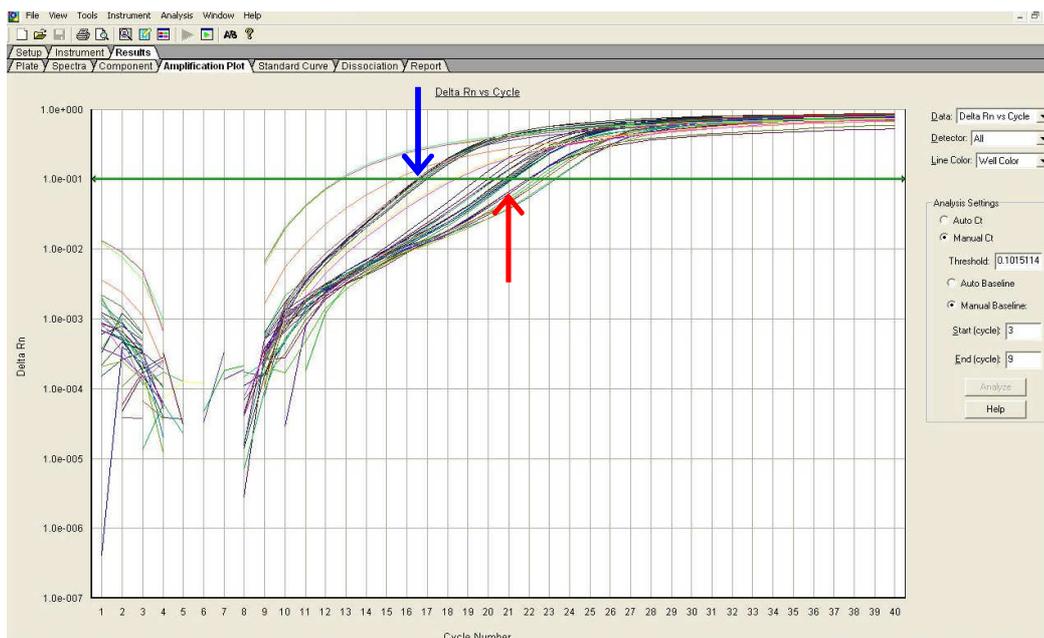


Figura 8: Tela representativa de reação das soluções de referência e amostras de voluntários do grupo-controle e pacientes *não-operados*, utilizando os primers ALU247. Seta azul - Grupo *Não-Operados*; Seta vermelha – Grupo-Controle.

5.3 - AVALIAÇÃO DE ERRO EXPERIMENTAL

Os resultados apresentados na avaliação de possíveis interferências da metodologia utilizada para obtenção de fragmentos de DNA Livre demonstram que o protocolo adotado não apresenta interferências durante sua realização. As tabelas 4 e 5 apresentam os valores encontrados em amostras coletadas no dia 3 de setembro de 2008 de cinco voluntários do grupo-controle.

Tabela 4: Tabela apresentando as quantificações ALU247 de cinco voluntários do grupo-controle para avaliação de erro experimental.

<u>Avaliação de Erro Experimental</u> Coleta realizada no dia 3 de Setembro de 2008	ALU 247
B. F. S.	0,09pg
L. N. F.	0,34pg
C. L. M. N.	0,38pg
M. G. V. S.	0,84pg
M. R.R. B. S.	0,96pg

Tabela 5: Tabela apresentando as quantificações ALU115 de cinco voluntários do grupo controle para avaliação de erro experimental.

<u>Avaliação de Erro Experimental</u> Coleta realizada no dia 3 de Setembro de 2008	ALU 115
B. F. S.	17,75 pg
L. N. F.	20,27 pg
C. L. M. N.	8,14 pg
M. G. V. S.	11,74 pg
M. R.R. B. S.	5,77 pg

As tabelas 6 e 7 apresentam os valores encontrados 30 dias após a primeira coleta. Nesta segunda quantificação, dois voluntários foram escolhidos ao acaso para que fossem coletados 2 tubos, chamados de tubo A e tubo B.

Tabela 6: Tabela apresentando as quantificações ALU247 de cinco voluntários do grupo controle para avaliação de erro experimental após 1 mês da primeira quantificação.

<u>Avaliação de Erro Experimental</u> Coleta realizada no dia 3 de Outubro de 2008	ALU 247	
B. F. S.	Tubo A 0,09pg	Tubo B 0,09pg
L. N. F.	0,40pg	
C. L. M. N.	0,55pg	
M. G. V. S.	Tubo A 4,69pg	Tubo B 4,95pg
M. R. R. B. S.	0,74pg	

Tabela 7: Tabela apresentando as quantificações ALU115 de cinco voluntários do grupo-controle para avaliação de erro experimental após 1 mês da primeira quantificação.

<u>Avaliação de Erro Experimental</u> Coleta realizada no dia 3 de Outubro de 2008	ALU 115	
B. F. S.	Tubo A 31,18pg	Tubo B 34,70pg
L. N. F.	14,56pg	
C. L. M. N.	5,77pg	
M. G. V. S.	Tubo A 19,92pg	Tubo B 18,37pg
M. R.R. B. S.	4,23pg	

5.4 - QUANTIFICAÇÃO DE FRAGMENTO ALU NOS GRUPOS

Os valores encontrados em cada amostra dos sete grupos analisados estão nas tabelas 8 e 9 (Grupo-Controle), 10 e 11 (Grupo Não-Operados) e 12 e 13 (Grupo Operados). As tabelas 14 e 15 comparam os grupos.

Tabela 8: Quantificações ALU247 do Grupo-Controle.

Grupo-Controle	ALU 247
C. F. C.	0,223pg
M.C.	1,38pg
M. Á. L. N.	0,168pg
M. A.	0,240pg
D.S.	1,02pg
J. R. S. P.	0,419pg
I.O. S.	0,780pg
L. M. C.	0,189pg
E. F. S. J.	1,55pg
B. F. S.	0,438pg
C. U. S.	0,150pg
M.C. S.C.	0,408pg
S. M. N. A.	0,171pg
A. B. S.	0,677pg
M. G. V. S.	0,840pg
M. R. R. B. S.	0,960pg
B. F. S.	0,088pg
L. N. F.	0,342pg
C. L. M. N.	0,381pg
I. H. H. F. S.	0,091pg
C. M. N.	0,474pg
J. D. B. A.	0,681pg
E. S. A.	0,096pg
L. S. C.	0,112pg
J. S. F. D.	0,670pg
E. G. F.	0,391pg
C. F. P.	0,337pg
P. S. S.	0,607pg
M. C. N.	0,105pg
J. B. N.	0,608pg

Tabela 9: Quantificações ALU115 do Grupo-Controle.

Grupo-Controle	ALU 115
C. F. C.	62,27 pg
M.C.	26,55 pg
M. Á. L. N.	30,08 pg
M. A.	38,60 pg
D.S.	49,96 pg
J. R. S. P.	52,17 pg
I.O. S.	69,45 pg
L. M. C.	26,34 pg
E. F. S. J.	24,12 pg
B. F. S.	27,71 pg
C. U. S.	45,17 pg
M.C. S.C.	58,55 pg
S. M. N. A.	23,08 pg
A. B. S.	27,35 pg
M. G. V. S.	33,10 pg
M. R. R. B. S.	58,70 pg
B. F. S.	17,75 pg
L. N. F.	20,27 pg
C. L. M. N.	8,14 pg
I. H. H. F. S.	32,35 pg
C. M. N.	2,64 pg
J. D. B. A.	4,67 pg
E. S. A.	5,55 pg
L. S. C.	4,37 pg
J. S. F. D.	7,21 pg
E. G. F.	2,00 pg
C. F. P.	2,69 pg
P. S. S.	7,02 pg
M. C. N.	20,95 pg
J. B. N.	9,16pg

Tabela 10: Quantificações ALU247 do Grupo Operados

Grupo Operados	ALU 247
N. F. M.	1,96 pg
E. M. F.	3,08 pg
J. M. G. B.	0,28 pg
E. L. S.	3,47 pg
E. L. S.	2,36 pg
L. P. F.	0,77 pg
S. M. S	0,16 pg
J.C. M.	0,43 pg
S. C.	0,09 pg
M. L. B.	0,13 pg
D. S. A.	0,14 pg
J. F. I.	0,63 pg
I. S.S.	0,18 pg
J. F. N.	5,95 pg
D. M. A.	0,92 pg
M. V. S. M.	0,46 pg
M. L. C.	0,68 pg
F. G. S.	0,14 pg
S. F. S.	0,27 pg
M. L. S.	0,36 pg
E. O. F.	0,46 pg
B. A. F.	0,13 pg
G. C. S.	0,08 pg
C. B. C. S.	0,15 pg
I. C. S.	0,12 pg
P. M. F	0,15 pg
E. J. S.	0,17 pg
J. V. S.	0,11 pg
P. F. S.	1,96 pg
J. L. C. G.	3,08 pg
I. M. L.	0,28 pg
J. S. S.	3,47 pg
I. F. P.	2,36 pg

Tabela 11: Quantificações ALU115 do Grupo Operados

Grupo Operados	ALU 115
N. F. M.	62,17 pg
E. M. F.	124,13 pg
J. M. G. B.	54,08 pg
E. L. S.	196,85 pg
E. L. S.	152,21 pg
L. P. F.	106,58 pg
S. M. S	18,44 pg
J.C. M.	10,69 pg
S. C.	18,44 pg
M. L. B.	10,69 pg
D. S. A.	23,94 pg
J. F. I.	21,08 pg
I. S.S.	16,38 pg
J. F. N.	188,35 pg
D. M. A.	124,67 pg
M. V. S. M.	20,76 pg
M. L. C.	101,39 pg
F. G. S.	13,91 pg
S. F. S.	13,34 pg
M. L. S.	14,81 pg
E. O. F.	18,38 pg
B. A. F.	27,29 pg
G. C. S.	24,07 pg
C. B. C. S.	19,41 pg
I. C. S.	36,01 pg
P. M. F	38,86 pg
E. J. S.	26,15 pg
J. V. S.	44,64 pg
P. F. S.	48,32 pg
J. L. C. G.	53,40 pg
I. M. L.	176,36 pg
J. S. S.	180,30 pg
I. F. P.	63,44 pg

Tabela 12: Quantificações ALU247 do Grupo *Não-Operados*

Grupo dos <i>Não-Operados</i>	ALU 247
F. S.	10,93pg
J. S. S.	15,91 pg
M. A. R. B.	17,00 pg
M. A. S. S.	12,83 pg
N. D. B.	13,17 pg
J. L. A. O.	20,69 pg
Â. M. S.	10,93 pg
J. J. O. S.	17,14 pg
N. M. R.	8,69 pg
S. V. A.	10,34 pg
J. T. A.	9,38 pg
G.S. C.	23,54 pg
G. M. C.	13,67 pg
M.M. A.	19,46 pg
P. A. P.	22,89 pg
J. P. C.	17,42 pg
A. M. C. S.	17,32 pg
M. J. S.	16,00 pg
L. M.P. F.	16,84 pg
M.J. M.	22,74 pg
L. C. M.	12,16 pg
J. B. F.	8,51 pg
I.M.	15,47 pg
H. R.	9,83 pg
A. M.	8,02 pg
M.E A.	9,45 pg

Tabela 13: Quantificações ALU115 do Grupo *Não-Operados*

Grupo dos <i>Não-Operados</i>	ALU 115
F. S.	14,55 pg
J. S. S.	207,66 pg
M. A. R. B.	81,04 pg
M. A. S. S.	211,48 pg
N. D. B.	248,28 pg
J. L. A. O.	97,17 pg
Â. M. S.	250,22 pg
J. J. O. S.	87,08 pg
N. M. R.	9,71 pg
S. V. A.	234,14 pg
J. T. A.	14,43 pg
G.S. C.	255,18 pg
G. M. C.	260,91 pg
M.M. A.	202,74 pg
P. A. P.	137,66 pg
J. P. C.	250,25 pg
A. M. C. S.	121,04 pg
M. J. S.	341,85 pg
L. M.P. F.	381,56 pg
M.J. M.	254,75 pg
L. C. M.	117,17 pg
J. B. F.	221,25 pg
I.M.	302,75 pg
H. R.	273,74 pg
A. M.	12,41 pg
M.E A.	264,45 pg

Os limites mostram claramente que os portadores de tumor (grupo *Não-Operados*) apresentam valores de ALU247 muito acima dos grupos *Controle* e *Operados* que possuem valores muito próximos. Observando os resultados podemos notar que os grupos se diferenciam principalmente através dos valores da quantificação ALU247. Para o grupo-controle, os limites ficaram entre 91 fentogramas e 1,55 picogramas. O grupo *Não-Operados* apresentou quantidades que vão de 8,02pg a 23,54pg e o grupo *Operados*, de 80fg a 5,95pg (figura 9).

De forma contrária os resultados apresentados pela quantificação ALU115 não permitem estabelecer limites definidos capazes de diferenciar pelo menos um dos grupos. O grupo-*controle* apresenta como limites 2pg e 69,45pg, o grupo *Não-Operados* 9,71pg e 381,56pg e, o grupo *Operados*, 10,69pg e 196,85pg (figura 10).

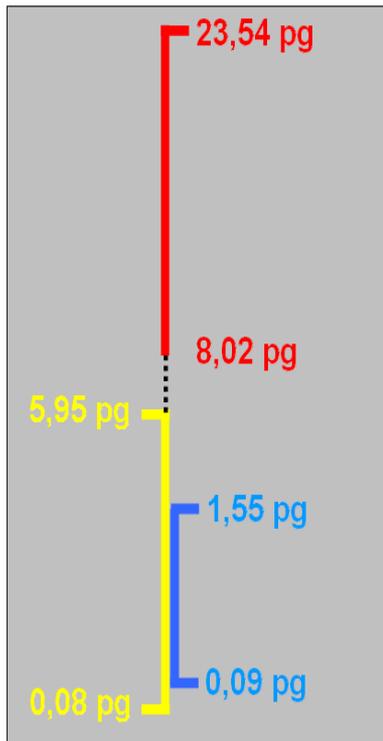


Figura 9: Concentração máxima e mínima em cada grupo de ALU247.

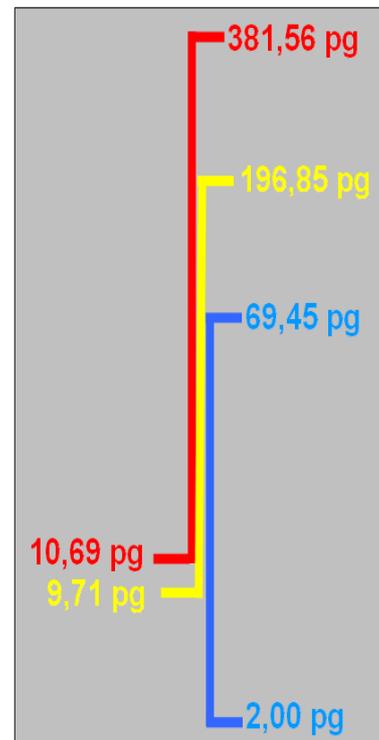


Figura 10: Concentração máxima e mínima em cada grupo de ALU115.

Tabela 14: Comparação entre as quantidades encontradas de cada grupo para ALU 247.

C. F. C.	0,223pg	N. F. M.	1,96 pg	F. S.	10,93pg
M.C.	1,38pg	E. M. F.	3,08 pg	J. S. S.	15,91 pg
M. A. L. N.	0,168pg	J. M. G. B.	0,28 pg	M. A. R. B.	17,00 pg
M. A.	0,240pg	E. L. S.	3,47 pg	M. A. S. S.	12,83 pg
D.S.	1,02pg	E. L. S.	2,36 pg	N. D. B.	13,17 pg
J. R. S. P.	0,419pg	L. P. F.	0,77 pg	J. L. A. O.	20,69 pg
I.O.S.	0,780pg	S. M. S	0,16 pg	Ã. M. S.	10,93 pg
L. M. C.	0,189pg	J.C. M.	0,43 pg	J. J. O. S.	17,14 pg
E. F. S. J.	1,55pg	S. C.	0,09 pg	N. M. R.	8,69 pg
B. F. S.	0,438pg	M. L. B.	0,13 pg	S. V. A.	10,34 pg
C. U. S.	0,150pg	D. S. A.	0,14 pg	J. T. A.	9,38 pg
M.C.S.C.	0,408pg	J. F. I.	0,63 pg	G.S. C.	23,54 pg
S. M. N. A.	0,171pg	I. S.S.	0,18 pg	G. M. C.	13,67 pg
A. B. S.	0,677pg	J. F. N.	5,95 pg	M.M. A.	19,46 pg
M. G. V. S.	0,840pg	D. M. A.	0,92 pg	P. A. P.	22,89 pg
M. R. R. B. S.	0,960pg	M. V. S. M.	0,46 pg	J. P. C.	17,42 pg
B. F. S.	0,088pg	M. L. C.	0,68 pg	A. M. C. S.	17,32 pg
L. N. F.	0,342pg	F. G. S.	0,14 pg	M. J. S.	16,00 pg
C. L. M. N.	0,381pg	S. F. S.	0,27 pg	L.M.P. F.	16,84 pg
I. H. H. F. S.	0,091pg	M. L. S.	0,36 pg	M.J. M.	22,74 pg
C. M. N.	0,474pg	E. O. F.	0,46 pg	L. C. M.	12,16 pg
J. D. B. A.	0,681pg	B. A. F.	0,13 pg	J. B. F.	8,51 pg
E. S. A.	0,096pg	G. C. S.	0,08 pg	I.M.	15,47 pg
L. S. C.	0,112pg	C. B. C. S.	0,15 pg	H. R.	9,83 pg
J. S. F. D.	0,670pg	I. C. S.	0,12 pg	A. M.	8,02 pg
E. G. F.	0,391pg	P. M. F.	0,15 pg	M.E A.	9,45 pg
C. F. P.	0,337pg	E. J. S.	0,17 pg		
P. S. S.	0,607pg	J. V. S.	0,11 pg		
M. C. N.	0,105pg	P. F. S.	1,96 pg		
J. B. N.	0,608pg	J. L. C. G.	3,08 pg		
		I. M. L.	0,28 pg		
		J. S. S.	3,47 pg		
		I. F. P.	2,36 pg		

Tabela 15: Comparação entre as quantidades encontradas de cada grupo para ALU 115.

C. F. C.	62,27 pg	N. F. M.	62,17 pg	F. S.	14,55 pg
M.C.	26,55 pg	E. M. F.	124,13 pg	J. S. S.	207,66 pg
M. A. L. N.	30,08 pg	J. M. G. B.	54,08 pg	M. A. R. B.	81,04 pg
M. A.	38,60 pg	E. L. S.	196,85 pg	M. A. S. S.	211,48 pg
D.S.	49,96 pg	E. L. S.	152,21 pg	N. D. B.	248,28 pg
J. R. S. P.	52,17 pg	L. P. F.	106,58 pg	J. L. A. O.	97,17 pg
I.O.S.	69,45 pg	S. M. S	18,44 pg	Ã. M. S.	250,22 pg
L. M. C.	26,34 pg	J.C. M.	10,69 pg	J. J. O. S.	87,08 pg
E. F. S. J.	24,12 pg	S. C.	18,44 pg	N. M. R.	9,71 pg
B. F. S.	27,71 pg	M. L. B.	10,69 pg	S. V. A.	234,14 pg
C. U. S.	45,17 pg	D. S. A.	23,94 pg	J. T. A.	14,43 pg
M.C.S.C.	58,55 pg	J. F. I.	21,08 pg	G.S. C.	255,18 pg
S. M. N. A.	23,08 pg	I. S.S.	16,38 pg	G. M. C.	260,91 pg
A. B. S.	27,35 pg	J. F. N.	188,35 pg	M.M. A.	202,74 pg
M. G. V. S.	33,10 pg	D. M. A.	124,67 pg	P. A. P.	137,66 pg
M. R. R. B. S.	58,70 pg	M. V. S. M.	20,76 pg	J. P. C.	250,25 pg
B. F. S.	17,75 pg	M. L. C.	101,39 pg	A. M. C. S.	121,04 pg
L. N. F.	20,27 pg	F. G. S.	13,91 pg	M. J. S.	341,85 pg
C. L. M. N.	8,14 pg	S. F. S.	13,34 pg	L.M.P. F.	381,56 pg
I. H. H. F. S.	32,35 pg	M. L. S.	14,81 pg	M.J. M.	254,75 pg
C. M. N.	2,64 pg	E. O. F.	18,38 pg	L. C. M.	117,17 pg
J. D. B. A.	4,67 pg	B. A. F.	27,29 pg	J. B. F.	221,25 pg
E. S. A.	5,55 pg	G. C. S.	24,07 pg	I.M.	302,75 pg
L. S. C.	4,37 pg	C. B. C. S.	19,41 pg	H. R.	273,74 pg
J. S. F. D.	7,21 pg	I. C. S.	36,01 pg	A. M.	12,41 pg
E. G. F.	2,00 pg	P. M. F.	38,86 pg	M.E A.	264,45 pg
C. F. P.	2,69 pg	E. J. S.	26,15 pg		
P. S. S.	7,02 pg	J. V. S.	44,64 pg		
M. C. N.	20,95 pg	P. F. S.	48,32 pg		
J. B. N.	9,16pg	J. L. C. G.	53,40 pg		
		I. M. L.	176,36 pg		
		J. S. S.	180,30 pg		
		I. F. P.	63,44 pg		

5.4.1 - Quantificação ALU115 entre os grupos

Os valores encontrados na quantificação ALU115 de cada grupo foram comparados entre si. O grupo dos *Não-Operados* apresentou média significativamente maior quando comparado aos outros dois grupos analisados ($p < 0,05$).

Tabela 16: Comparação entre as médias de quantificação ALU115 entre os grupos.

Grupos	n	Quantidade de DNA Livre		Média ± DP
		Mínimo	Máximo	
Controle	30	1,6pg	68,62pg	26,11pg ± 20,01
Não Operados	27	9,71pg	381,56pg	*186,71pg ± 106,25
Operados	33	10,69pg	196,85pg	62,10pg ± 59,43

*ANOVA - $p < 0,05$

5.4.2 - Quantificação ALU247 entre os grupos

Os valores encontrados na quantificação ALU247 de cada grupo foram comparados entre si. O grupo dos *Não-Operados* apresentou média significativamente maior quando comparado aos outros dois grupos analisados ($p < 0,05$).

Tabela 17: Comparação entre as médias de quantificação ALU247 entre os grupos.

Grupos	n	Quantidade de DNA Livre		Média ± DP
		Mínimo	Máximo	
Controle	30	0,08pg	1,55pg	0,48pg ± 0,38
Não-Operados	27	8,02pg	23,54pg	*14,62pg ± 4,73
Operados	33	0,08pg	5,95pg	1,06pg ± 1,41

*ANOVA - $p < 0,05$

6 - DISCUSSÃO

6.1 - VALIDAÇÃO DA TÉCNICA DE OBTENÇÃO DE SORO CONTENDO APENAS FRAGMENTOS DE DNA LIVRE

Os resultados demonstram que após separar o soro por centrifugação e filtrá-lo com unidade filtrante provida de membrana de $0,45\mu$ acoplada a uma seringa de 3ml, não houve contaminação com DNA genômico (figura 4 e 5). Caso houvesse a presença não só de fragmentos de DNA, mas de DNA íntegro (genômico) recém liberado das células, essa interferência iria modificar e influenciar diretamente nos resultados, uma vez que, estaríamos utilizando para quantificação por PCR em Tempo Real o SYBRGreen I, que é uma molécula que se intercala com qualquer DNA dupla fita.

Na literatura há vários relatos demonstrando que a quantidade de DNA Livre encontrada no plasma é menor que a encontrada no soro. Inúmeras hipóteses foram levantadas, mas ainda não há uma resposta plausível que justifique tal diferença.

Segundo Umetani *et al* (2006c), comparando amostras de plasma e soro filtradas com membrana de $0,45\mu$, a mesma utilizada neste trabalho, ele obteve melhor rendimento com as amostras de soro. Ele concluiu, baseado em seus resultados, que o soro tem 6 vezes mais DNA Livre que o plasma. Além disso, o plasma possui uma grande quantidade de inibidores quando comparado ao soro. Ainda segundo Umetani *et al* (2006), o soro é a melhor fonte para obtenção de DNA Livre.

Outros autores utilizam plasma como amostra para detecção de DNA Livre. Nossos resultados com plasma não apresentaram nenhum resultado, pois não houve detecção em gel ou sinal de DNA (dados não mostrados). Beránek *et al* (2006) fez uma comparação de 6 diferentes métodos de obtenção de DNA Livre de plasma e, concluiu que o protocolo que tinha melhor rendimento era o método por microcolunas. Nossa metodologia utiliza uma unidade filtrante com membrana de nitrocelulose (poro de $0,45\mu$, porém a amostra trabalhada foi o soro. Nós apresentamos valores absolutos de quantificação e não há ainda algum trabalho que faça a comparação entre os dois métodos.

Nosso protocolo utiliza apenas um tratamento com T.E e Proteinase K para diminuir a quantidade de inibidores encontrados ainda na amostra, mesmo após a

filtragem. Além disso, para utilização do soro como molde para PCR em Tempo Real houve a necessidade de diluí-lo em água purificada para melhorar o desempenho da reação. O plasma, mesmo sendo filtrado e tratado com T.E e Proteinase K, não apresentou nenhum resultado positivo para qualquer um dos alvos (dados não mostrados)

6.2 - FRAGMENTOS DE DNA LIVRE ALU115 e ALU247 COMO CONCENTRÇÕES DE REFERÊNCIA

Os trabalhos mais antigos quantificavam o DNA Livre através de radioimunoensaio e espectrofotometria. Hoje em dia, após o desenvolvimento da PCR em Tempo Real e comprovada sua alta sensibilidade de detecção de pequenas amostras de DNA, ela se tornou a principal metodologia empregada no estudo dos ácidos nucléicos circulantes em sangue periférico.

Chan e Lo (2007) apontaram que um dos fatores do DNA Livre ainda não ter sido implantado como marcador tumoral na prática clínica é devido à falta de padronização dos protocolos encontrados na literatura. Trabalhos de quantificação por PCR em Tempo Real possuem estratégias diferentes apresentando em alguns casos, adaptações ou cálculos posteriores para obtenção do resultado final.

Para quantificar uma amostra através de PCR em Tempo Real, o ideal é que para as soluções com concentrações de referência seja utilizado o mesmo conjunto de primers das amostras alvo (a serem quantificadas). Desta forma não haveria diferenças entre os rendimentos das reações. Uma forma alternativa é igualar o tamanho dos amplicons através do desenho de primers, quando for utilizado o SYBRGreen.

Os resultados apresentados por Jahr *et al* (2001) foram baseados na quantificação de fragmentos metilados e não metilados encontrados no plasma. A quantificação foi feita baseada numa curva padrão, onde as concentrações de referência foram obtidas de DNA extraído de linfócitos. Neste trabalho, as sondas contribuíram para que não houvesse o risco de emissão de sinal de outras fontes senão, o amplicon alvo. Em compensação houve um aumento nos custos, uma vez que são mais caras que o SYBRGreen.

Um trabalho que mostra uma diferença entre alvo e amostras de referência e, adaptação através de cálculos matemáticos para chegar a um resultado é o de

Wang *et al* (2003). Segundo o autor, por uma reação “semiquantitativa” de PCR em Tempo Real, obteve-se o resultado através da razão entre os valores encontrados para amplicons de 400pb *versus* 100pb da β -actina, presente em células normais e neoplásicas. A metodologia aplicada pelo autor não foi por sondas e sim, através do SYBRGreen I e do DNA de cultura de células OVCAR3 (American Type Culture Collection, Manassas, VA).

No presente trabalho foi feita uma quantificação direta, em que os primers, eram os mesmos, tanto para amostras de referência quanto para os alvos e, principalmente, o material que constituía as soluções de referência eram os próprios fragmentos ALU115 e ALU247 o que igualaria as reações.

Sozzi *et al* (2003a; 2003b), pelo sistema de sondas, quantificou o DNA Livre tendo como alvo o gene da subunidade catalítica da telomerase humana (*hTERT*). As concentrações de referência continham DNA genômico humano e foram amplificadas pelo mesmo gene. O gene *hTERT* é de cópia única no genoma humano, localiza-se no cromossomo 5, logo, mesmo que o autor trabalhasse com o SYBRGreen, não haveria diferenças entre as reações de referência e alvo.

O protocolo para quantificação de DNA Livre no plasma, feito por Herrera *et al* (2005), fez-se com uma reação extra de cada amostra, que consistia em misturar plasma com uma solução de 25ng de DNA genômico de levedura *S. cerevisiae*. Segundo o autor, uma das dificuldades em quantificar DNA no plasma é a incerteza do rendimento de extração de DNA de cada amostra. Dessa forma ele tinha um parâmetro conhecido (os 25ng de DNA da levedura) e, após a reação de quantificação, ele subtraía do valor os 25ng de DNA de levedura que foram adicionados. A utilização de sondas permitiu esse tipo de mistura, uma vez que é possível realizar multiplex com sistema *Taqman*, podendo diferenciar os amplicons de acordo com o fluoróforo que cada sonda carrega, porém aumenta os custos do experimento.

Na presente pesquisa não há nenhum artifício matemático para chegar aos resultados. Os testes feitos com plasma demonstraram que filtrá-lo e, em seguida tratá-lo com T.E e Proteinase K, não faz dele uma boa amostra para quantificar DNA Livre.

Schmidt *et al* (2008) diferenciou o tamanho dos amplicons através de um conjunto de 3 primers e de 3 sondas. O primeiro primer era o mesmo para todos os amplicons, apenas a sonda e o segundo primer é que diferenciava uma amplicon do

outro (135bp, 419bp e 618 bp respectivamente). A comparação entre as amostras foi realizada através de quantificação relativa, sendo calculado o $\Delta\Delta C_t$ de cada alvo. Portanto, ele pôde estudar o quanto havia de DNA Livre de uma amostra em relação à outra, mas sem determinar de forma absoluta o quanto cada uma tinha. O trabalho também apresenta resultados de quantificações absolutas, porém não informa como esta quantificação foi feita e nem que tipo de amostra de referência utilizou para fazê-la.

Umetani *et al* (2006a; 2006b; 2006c) teve como alvo para quantificação, as repetições ALU, utilizando dois conjuntos de primers e o sistema SYBRGreen I. Segundo o autor, o primeiro conjunto de primer amplifica fragmentos de origem “apoptótica” (nomeado pelo autor de ALU115 devido ao tamanho dos pares de base de seu amplicon) e também, os de origem “não apoptótica” (ALU247), teoricamente de origem tumoral. Para cada amostra ele realizou 2 reações separadas de cada conjunto de primers (uma com a mistura tendo como molde soro adicionado com 10ng de DNA genômico e a segunda, apenas soro). Ele calculou a integridade do DNA Livre (Y) através da equação:

$$Y = 1.0 - \frac{[Q247(p+s) - Q247(s)]}{[Q115(p+s) - Q115(s)]}$$

Onde Q(p+s) é a mistura de 10ng de DNA genômico mais soro como molde e, Q(s) é apenas a amostra de soro. A utilização de DNA genômico pode interferir nos resultados uma vez que, existem no genoma humano mais de um milhão de cópias. A quantificação foi feita utilizando como amostra de referência DNA genômico extraído de leucócitos.

A quantificação direta aplicada no atual trabalho impediu que eventuais desigualdades na emissão de sinal durante os ciclos da PCR influenciassem a quantidade apresentada em cada amostra. Além disso, o preparo da amostra através de filtragem do soro e tratamento com T.E e Proteinase K provou que os alvos quantificados não seriam “superestimados” por uma emissão de sinal extra de DNA genômico.

Através desta metodologia de quantificação direta, o rendimento das reações de referência foi o mesmo das amostras alvo, pois cada conjunto de primer estaria sob mesma concentração e variação de temperatura.

Não há uma forma de quantificação absoluta e direta da amostra descrita na literatura, por isso desenvolvemos uma estratégia que busca quantificar de forma absoluta e direta a quantidade de DNA Livre em cada amostra.

Através do estudo realizado à literatura, a reprodução ou adaptação de alguns protocolos já existentes representariam um aumento nos custos e isso iria de encontro a um dos objetivos traçados (utilizar o sistema SYBRGreen). Portanto, as metodologias com uso de sondas (Taqman) não foram testadas ou adaptadas à pesquisa. Os protocolos que dependiam de vários passos para chegar ao resultado final isto é, que realizavam mais de 3 reações por alvo, mesmo pelo sistema SYBRGreen, também foram descartados. A intenção era quantificar de forma direta, com baixo custo e da forma mais simples possível.

Inicialmente tentamos reproduzir a quantificação feita por Umetani *et al* (2006a), porém as soluções contendo DNA genômico extraído de leucócitos apresentavam resultados inconsistentes e não conseguiam apresentar a mesma curva de PCR por mais de 2 ensaios consecutivos. As reações com o conjunto de primers ALU115 e, principalmente, com os primers ALU247 não apresentavam reprodutibilidade (dados não mostrados).

Com o DNA genômico padrão da Applied Biosystems, a reprodutibilidade subiu para 3 ensaios consecutivos. Após estes ensaios, as amostras começavam a apresentar resultados duvidosos (dados não mostrados).

De forma contrária, as reações cujo molde foi apenas soro filtrado e tratado, apresentaram o mesmo rendimento e reprodutibilidade em todas as reações realizadas, indicando que os resultados das soluções contendo fragmentos de DNA Livre eram constantes, reprodutíveis e confiáveis, caso fosse necessário repetir alguma amostra.

Soluções de referência contendo apenas fragmentos ALU115 e ALU247 apresentaram reações com resultados constantes e reprodutíveis. Quando comparados ao DNA genômico, os fragmentos ALU demonstraram ser mais estáveis. Suas curvas respeitaram as diferenças de concentração e distância entre os ciclos, permitindo assim segurança nos resultados de quantificação.

6.3 - AVALIAÇÃO DE ERRO EXPERIMENTAL

Os resultados mostraram que a metodologia aplicada é adequada para o processo de obtenção dos fragmentos de DNA Livre. O teste dos tubos A e B da segunda coleta de dois voluntários, apresentaram quantificações com valores muito próximos, confirmando a reprodutibilidade e eficiência da técnica.

Nos primeiros trabalhos com DNA Livre constatou-se a sua presença no sangue periférico de pacientes com outras patologias além do câncer. Koffler *et al* (1973) mostraram que na artrite reumatóide e na glomerulonefrite crônica também há aumento na quantidade de DNA Livre. Além disso, mulheres grávidas possuem DNA fetal no sangue, logo, com base nessas informações, o aumento de DNA Livre pode ocorrer também por outros fatores.

Houve um aumento na quantidade de fragmentos ALU247 em um dos voluntários (voluntário M. G. V. S.) no espaço de tempo de um mês, porém este aumento não ocorreu por falha da técnica, uma vez que os demais voluntários apresentaram valores pouco discrepantes. Além disso, o teste com os tubos A e B deste voluntário indica que o aumento realmente não ocorreu devido à metodologia utilizada e sim, por algum fator fisiológico ainda não compreendido. Mesmo existindo esse aumento, observando-se os valores encontrados nos voluntários do *Grupo-Controle*, *Grupo Operados* e *Grupo Não-Operados*, o aumento encontrado neste voluntário ficou dentro dos limites dos voluntários saudáveis, o diferenciando dos demais grupos.

6.4 - QUANTIFICAÇÃO DE FRAGMENTOS ALU NOS GRUPOS

As quantificações foram consideradas válidas após análise dos valores do coeficiente de correlação (R^2) e do *Slope*. As curvas correspondentes às soluções de referência deveriam apresentar alta reprodutibilidade entre as reações, aproximando assim o valor de R^2 para 1. A distância entre os ciclos deveria ser respeitada de acordo com a diferença de cada concentração, aproximando o valor do *Slope* para 3.22. Os valores obtidos em cada ensaio ficaram entre 0.994730 e 0,979844 para R^2 . Para o *Slope*, o intervalo foi de 3.25 a 3.61.

Algumas quantidades encontradas nos ensaios ALU115 ficaram bem acima da primeira solução de referência (ex: voluntário L.M.P.F. ALU115 = 381,56pg).

Não houve a necessidade de mudar os limites pré-estabelecidos (concentrações utilizadas nas soluções de referência) pois, com as cinco soluções de referência apresentando índices (R^2 e *Slope*) dentro dos limites aceitáveis, o cálculo para quantificação de amostras acima de 156pg e abaixo de 152fg puderam ser quantificadas com segurança.

Segundo Umetani *et al* (2006a), os primers ALU115 amplificam tanto os fragmentos apoptóticos quanto os fragmentos não apoptóticos, representando a quantidade total de fragmentos de DNA Livre encontrada na amostra. Os primers ALU247 amplificam apenas os fragmentos não apoptóticos supostamente de origem tumoral. Com base nesses dados, os valores absolutos de fragmentos apoptóticos na amostra é a subtração dos valores da quantificação ALU247 pela quantificação ALU115. Os cálculos estatísticos foram feitos através dos valores absolutos dos fragmentos ALU247 e ALU115.

Os valores apresentados por Umetani *et al* (2006a) são a média de cada grupo analisado. Em seu grupo-controle, composto por 51 voluntários saudáveis, a concentração absoluta foi de 0,34ng/ μ l. Os 32 pacientes com câncer colorretal apresentaram uma média de 1,73 ng/ μ l. Nosso resultado também indicou que pacientes com câncer colorretal possuem mais DNA Livre que os voluntários saudáveis do grupo-controle, porém analisamos um grupo a mais, os de pacientes já submetidos à cirurgia para retirada do tumor.

Um dos indivíduos (voluntário J.S.S.) teve sua amostra analisada antes e depois da cirurgia de retirada do tumor, mostrando que seus valores para quantificação ALU247 diminuíram de forma significativa (antes da cirurgia = 15,91pg; após a cirurgia = 3,47pg), assim como os valores para ALU115 (antes da cirurgia = 207,66pg; após a cirurgia = 180,30pg).

Os limites demonstram claramente que os portadores de tumor (grupo *Não-Operados*) apresentam valores de ALU247 muito acima dos grupos *Controle* e *Operados*, que possuem valores muito próximos. Observando os resultados nota-se que os grupos se diferenciam principalmente através dos valores da quantificação ALU247.

De forma contrária, os resultados da quantificação ALU115 não permitem estabelecer limites definidos capazes de diferenciar pelo menos um dos grupos.

6.4.1 - Quantificação ALU115 entre os grupos

A quantidade de fragmentos ALU115 apresentou alta heterogeneidade dentro de cada grupo, sendo o grupo *Operados* com maior heterogeneidade, indicando grande variação nos valores e não definindo limites que caracterizassem cada um dos grupos estudados.

Existe um limite entre 196,85 pg e 9,71pg em que se encontram pessoas dos 3 grupos analisados. Algumas pessoas do *Grupo-Controle* apresentam valores maiores que os encontrados no *Grupo de Não-Operados*.

Esses dados impedem uma diferenciação clara entre os grupos e mostram que a quantificação dos fragmentos de origem apoptótica provavelmente não sofre alteração com a presença ou não de tumor.

6.4.2 - Quantificação ALU247 entre os grupos

A quantidade de fragmentos ALU247 revelou heterogeneidade nos grupos *Controle* e *Operados*, sendo a maior heterogeneidade para o grupo dos *Operados*. Existe um intervalo entre 5,95pg e 0,08pg em que sem encontram pessoas dos grupos *Controle* e *Operados*. O *Grupo dos Não-Operados* está distante deste grupo e o intervalo apresentado foi de 2,07pg de diferença entre quem tem tumor e quem não tem (ou já foi retirado por cirurgia).

Com base nestes resultados é possível a diferenciação do grupo que apresenta tumor (*Não-Operados*), dos grupos que não apresentam tumor (*Controle* e *Operados*). Alguns voluntários do grupo *Operados* possuem valores bem acima da grande maioria do grupo *Controle*, porém estes valores não se aproximam dos encontrados em voluntários portadores de tumor colorretal. Isso se reforça pelos valores de quantificação encontrados em um dos voluntários do grupo-controle que participou da avaliação do erro experimental, quando apresentou valores diferentes no espaço de 30 dias. Mesmo havendo um aumento, o maior valor encontrado do voluntário M. G. V. S. não se aproxima do menor valor encontrado no grupo *Não-Operados*.

7 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

O trabalho focou principalmente o desenvolvimento de um meio de quantificação direta de valores absolutos de DNA Livre. Mais especificamente, fragmentos de origem apoptótica e de origem não apoptótica, em pessoas saudáveis e em pacientes portadores de câncer colorretal.

Os resultados nos autorizam inferir que a metodologia empregada não interfere nos valores encontrados. Todas as amostras foram submetidas às mesmas condições de temperatura e tempo de processamento (centrifugação, filtragem, entre outros).

Estabelecemos um limite de idade durante a coleta para que os resultados não sofressem nenhum tipo de influência de variações fisiológicas. Porém um dos voluntários do grupo *Não-Operados* no momento da coleta tinha 10 anos de idade (voluntário F.S.). Após a quantificação de sua amostra os valores apresentados eram compatíveis com os demais e por isso, foi incluído também na análise estatística.

Houve uma única amostra de paciente *não-operado* que apresentou uma quantidade muito baixa de fragmentos ALU247 (voluntária I.R.S. ALU247 = 0,95pg). Para não deturpar a análise estatística, esta pessoa foi retirada da análise. Por não conhecermos em sua totalidade a origem e o porquê do aumento destes fragmentos, a retirada desta amostra da análise não deve ser considerada como perda de informação.

Para confirmação dos limites que caracterizam a presença ou não do tumor, iremos aumentar o número das amostras. Pretendemos também pesquisar quais as quantidades encontradas em diferentes faixas etárias, de ambos os sexos, de pessoas saudáveis e de pacientes já submetidos à cirurgia e, fazer uma comparação com os pacientes ainda não operados. Esses são trabalhos futuros que merecem atenção especial por conta dos resultados encontrados até o momento.

Por esse aumento não significar especificamente a existência de um câncer colorretal, essa metodologia não deve ser usada como método de diagnóstico.

Obter valores ALU247 acima de 8pg não significa necessariamente um câncer colorretal.

Esta metodologia deve ser uma ferramenta de acompanhamento e monitoramento de pacientes que já apresentaram algum tipo de tumor e que já se

submeteram a tratamentos sejam eles: quimioterapia, radioterapia e até a retirada cirúrgica do tumor.

Após a remoção cirúrgica do tumor, tratamento quimioterápico ou radioterápico, estes pacientes seriam monitorados a cada 3 ou 6 meses através de um simples exame de sangue. Caso os valores ALU247 se elevassem, o médico realizaria exames mais complexos como a colonoscopia para confirmação do tumor. É uma forma de reduzir a quantidade de procedimentos incômodos e invasivos e, não depender de marcadores cujos valores não são confiáveis, como o CEA.

Existem situações em que o CEA está acima do valor considerado como ideal ou de bom prognóstico (4ng no sangue periférico). Fumantes e gestantes, por exemplo, apresentam valores de CEA acima dos 4ng e não estão com câncer. Por outro lado, existem pacientes com câncer que apresentam os valores do CEA abaixo dos 4ng.

Em um futuro próximo e após a obtenção de mais dados e resultados positivos como esse, utilizando a mesma metodologia, poderemos substituir a utilização do CEA como referência para monitoramento dos pacientes que já se submeteram a algum tipo de tratamento para o combate ao câncer, pela quantificação dos fragmentos ALU247.

8 - CONCLUSÃO

- A quantificação direta usando os próprios fragmentos ALU115 e ALU247 mostrou-se uma metodologia simples e de baixo custo por utilizar o SYBRGreen, apresentando resultados confiáveis.
- A quantificação ALU247 é capaz de identificar quais são os portadores de tumor. Os valores encontrados foram de 8,02pg até 23,54pg.
- Foi detectada uma diminuição de fragmentos ALU247 em pacientes que se submeteram à cirurgia para retirada do tumor, com valores entre 0,08pg a 5,95 pg.
- Os valores encontrados para ALU247 devem ser utilizados como parâmetro para determinar a presença de tumor. Os limites apresentados permitem diferenciar os grupos analisados, mostrando que quantidades acima de 8,02pg de ALU247 são características de portadores de tumor colorretal.

9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA F.F.N, ARAUJO S.E.A., SANTOS F.P.S., FRANCO C.J.C.S., SANTOS V.R., NAHAS S.C., HABR-GAMA A. Colorectal cancer screening. Rev. Hosp. Clín. Fac. Med. S. Paulo 55 (1):35-42, 2000.

ANAZETTI M. C., MELO P. S. Morte Celular por Apoptose: uma visão bioquímica e molecular. Metrocamp Pesquisa, v. 1, n. 1, p. 37-58, jan./jun. 2007.

ANKER P., MULCAHY H., CHEN X. Q., STROUN M. Detection of circulating tumour DNA in the blood (plasma/serum) of cancer patients. Cancer and Metastasis Reviews 18: 65–73, 1999.

ARAUJO S.E.A., ALVES P. R. A., HABR-GAMA A. - Role of colonoscopy in colorectal cancer. REV. HOSP. CLÍN. FAC. MED. S. PAULO 56(1):25-35, 2001.

BALLANTYNE G. H., QUIN J., Surgical Treatment of Liver Metastases in Patients with Colorectal Cancer. CANCER Supplement June 15, 1993, Volume 71, No. 12.

BATZER M., DEININGER P.L. ALU repeats and human genomic diversity. NATURE Reviews GENETICS Vol. 3 May 2002.

BAZAN V., BRUNO L., AUGELLO C., AGNESE V. 1, CALO V., CORSALE S., GARGANO G., TERRASI M., SCHIRO V., DI FEDE G., ADAMO V., INTRIVICI C., CROSTA A., RINALDI G., LATTERI F., DARDANONI G., GRASSI N., VALERIO M. R., COLUCCI G., MACALUSO M., RUSSO A. Molecular detection of TP53, Ki-Ras and p16INK4 A promoter methylation in plasma of patients with colorectal cancer and its association with prognosis. Results of a 3-year GOIM (Gruppo Oncologico dell'Italia Meridionale) prospective study. Annals of Oncology 17 (Supplement 7): vii84–vii90, 2006.

BERÁNEK M., VLČKOVÁ J., HYPIUSOVÁ V., ŽIVNÝ P., PALIČKA V. Comparison of various methods used for extraction of cell-free genomic DNA from human plasma Klin. Biochem. Metab., 14 (35), 2006, No. 1, p. 21–24.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Falando sobre câncer do intestino / Instituto Nacional de Câncer, Sociedade Brasileira de Coloproctologia, Colégio Brasileiro de Cirurgiões, Associação Brasileira de Colite Ulcerativa e Doença de Crohn, Colégio Brasileiro de Cirurgia Digestiva, Sociedade Brasileira de Endoscopia Digestiva, Sociedade Brasileira de Cancerologia, Sociedade Brasileira de Oncologia Clínica. - Rio de Janeiro: INCA, 2003.

BREMMES R. M., SIRERA R., CAMPOS C. Circulating tumour-derived DNA and RNA markers in blood: a tool for early detection, diagnostics, and follow-up? Volume 49, Issue 1, Pages 1-12 (July 2005).

BURSCHE, W.; ELLINGER, A.; GERNER, C.H.; FRÖHWEIN, U.; Schulte-Hermann, R. Programmed cell death (PCD): apoptosis, autophagic PCD or others? In: Mechanisms Cell Death. Annals of the New York Academy of Sciences. v.926, p.1-12, 2000.

BUSTIN S. A., MUELLER R. Real-time reverse transcription PCR and the detection of occult disease in colorectal cancer. *Molecular Aspects of Medicine* 27 (2006) 192–223.

CHAN K.C.A., LO Y.M.D. Circulating tumour-derived nucleic acids in cancer patients: potential applications as tumour markers *British Journal of Cancer* (2007) 96(5), 681 – 685.

CHAN K.C. ALLEN, ZHANG J., HUI A. B.Y., WONG N., LAU T. K., LEUNG T. N., LO K.W., HUANG D. W.S., LO Y.M. D. Size Distributions of Maternal and Fetal DNA in Maternal Plasma. *Clinical Chemistry* 50, No. 1, 2004.

CHEN XQ, STROUN M, MAGNENAT JL, NICOD LP, KURT AM, LYAUTEY J, LEDERREY C, ANKER P. Microsatellite alterations in plasma DNA of small cell lung cancer patients. *Nat Med* 2: (1996) 1033–1035

CORDEIRO F., YAMAGUCHI N.H., HABR-GAMA A., CUTAIT R., REINAN R.J., ABRAMOFF R., PERDICARIS M., MORAES A., QUILICI F.A., SUGAHARA R., VALÉRIO F. Diagnóstico, Estadiamento e Tratamento Cirúrgico e Multidisciplinar do Câncer Colorretal. Projeto Diretrizes, Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina, 2001.

COURA R.S., ASHTON-PROLLA P., PROLLA J.C. Hereditary non-polipomatous colorectal cancer: hereditary predisposition, diagnosis and preventions. *Arq Gastroenterol.*, v 42 – nº 2 – abr./jun. 2005.

FEARON, E.R. AND B. VOGELSTEIN, A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 1990. 61(5): p. 759-67.

FIGLIOLA G., JUDITH K., SIMONA A., CARONE M. D., ANTONELLA S., ROBERTA D., ABBOLITO M. R., MAURIZIO C., FRANCO G., FABIO C., SANDRO C, PASQUALE P., FRANCESCO S., JOHN W. G., SYED V. S. K., SETH M. S., MARIO R., JEFFREY S. Detection of Blood-borne Cells in Colorectal Cancer Patients by Nested Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction for Carcinoembryonic Antigen Messenger RNA: Longitudinal Analyses and Demonstration of Its Potential Importance as an Adjunct to Multiple Serum Markers. *CANCER RESEARCH* 61, 2523–2532, March 15, 2001

GAUTSCHI O., BIGOSCH C., HUEGLI B., JERMANN M., MARX A., CHASSÉ E., RATSCHILLER D., WEDER W., JOERGER M., DANIEL C. BETTICHER. Circulating Deoxyribonucleic Acid As Prognostic Marker in Non–Small-Cell Lung Cancer Patients Undergoing Chemotherapy. *J Clin Oncol* 22:4157-4164. 2004.

GIRIBALDI G., PROCIDA S., ULLIERS D., MANNU F., VOLPATTO R., MANDILI G., FANCHINI L., BERTETTO O., FRONDA G., SIMULA L., RIMINI E., CHERCHI G.,

BONELLO L., MAULE M. M., TURRINI F. Specific Detection of Cytokeratin 20-Positive Cells in Blood of Colorectal and Breast Cancer Patients by a High Sensitivity Real-Time Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction Method. *J. Mol. Diagn.* 2006, 8:105–112; DOI: 10.2353/jmoldx.2006.050054.

GONZÁLEZ C. G., HOYOS M. G., TIEBAS M. J. T., SANCHEZ I. L., ALBA M. R., INFANTES F., GALLEGO J., RECASENS J. D., AYUSO C., RAMOS C. Application of Fetal DNA Detection in Maternal Plasma: A Prenatal Diagnosis Unit Experience. *J Histochem Cytochem* 53:307–314, 2005.

GRIVICICH I., REGNER A., ROCHA A. B. Morte Celular por Apoptose. *Revista Brasileira de Cancerologia* 2007; 53(3): 335-343.

GUADAGNI F., KANTOR J., ALOE S., CARONE M. D., SPILA A., D'ALESSANDRO R., ABBOLITO M. R., COSIMELLI M., GRAZIANO F., CARBONI F., CARLINI S., SCIARRETTA P. P F. Detection of Blood-borne Cells in Colorectal Cancer Patients by Nested Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction for Carcinoembryonic Antigen Messenger RNA: Longitudinal Analyses and Demonstration of Its Potential Importance as an Adjunct to Multiple Serum Markers. *CANCER RESEARCH* 61, 2523–2532, March 15, 2001.

HABR-GAMA A. Colorectal cancer – The importance of prevention. *Arq Gastroenterol* 2005; 42 (1):2-3.

HAGIWARA N., LEAH E. M., GLENWOOD E. T., HELEN L. C., TAGA M., ELISE D. B., KENSUKE K., PEIJUN H., MARK B, SAIRA D., MASAO M., TAKASHI T., KOJI S. T.N., HIROSHI M., KEN T., PERWEZ H, HARRIS C. Quantitative Detection of p53 Mutations in Plasma DNA from Tobacco Smokers. *Cancer Res* 2006; 66: (16).August 15, 2006.

HERRERA L. J., RAJA S., GOODING W. E., EL-HEFNAWY T.,¹ KELLY,L., LUKETICH J. D., GODFREY T. E. Quantitative Analysis of Circulating Plasma DNA as a Tumor Marker in Thoracic Malignancies. *Clinical Chemistry* 51, No. 1, 2005.

HUERTA S. Recent advances in the molecular diagnosis and prognosis of colorectal cancer. *Expert Rev Mol Diagn*, 2008. 8(3): p. 277-88.

Human Genome Project information. Disponível em <http://www.oml.gov/hgmis/>. Acesso em: 18 Setembro 2008.

IEDA S, WATATANI M, YOSHIDA T, KURODA K, INUI H, YASUTOMI M. Immunohistochemical analysis of p53 and ras p21 expression in colorectal adenomas and early carcinomas. *Surg Today*, 1996. 26(4): p. 230-5.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil 2008. Disponível em: <[http:// www.inca.gov.br](http://www.inca.gov.br)>. Acesso em: 25 set. 2008.

JAHN S., HENTZE H., ENGLISCH S., HARDT D., FACKELMAYER F. O., HESCH R. D., KNIPPERS R. DNA Fragments in the Blood Plasma of Cancer Patients: Quantitations and Evidence for Their Origin from Apoptotic and Necrotic Cells.

JAW-Y. W., CHAN H. W., CHIEN-YU L., JAN-SING H., DENG-CHYANG W., SUNG-YU H., SHIU-RU L. Molecular Detection of Circulating Tumor Cells in the Peripheral Blood of Patients with Colorectal Cancer Using RT-PCR: Significance of the Prediction of Postoperative Metastasis. *World J Surg* (2006) 30: 1007–1013

JOHNSON P.J., LO Y.M. D. Plasma Nucleic Acids in the Diagnosis and Management of Malignant Disease. *Clinical Chemistry* 48, No. 8, 2002.

JUNG R., PETERSEN K., KRÜGER W., WOLF M., WAGENER C., ZANDER A., NEUMAIER M. Detection of micrometastasis by cytokeratin 20 RT-PCR is limited due to stable background transcription in granulocytes. *British Journal of Cancer* (1999) 81(5), 870–873.

KOFFLER D., AGNELLO V., WINCHESTER R., KUNKEL H. G. The Occurrence of Single-Stranded DNA in the Serum of Patients with Systemic Lupus Erythematosus and Other Diseases. *The Journal of Clinical Investigation* Volume 52 January 1973.

KOPRESKI M. S, BENKO F. A., L., KWAK W., GOCKE C. D. Detection of Tumor Messenger RNA in the Serum of Patients with Malignant Melanoma. *Clinical Cancer Research*, Vol. 5, 1961–1965, August 1999.

LANGFORD M. P., REDENS T. B., HARRIS N. R., LEE S., JAIN S. K., REDDY S., MCVIE R. Plasma Levels of Cell-Free Apoptotic DNA Ladders and Gamma-Glutamyltranspeptidase (GGT) in Diabetic Children. *Exp Biol Med* 232:1160–1169, 2007.

LEI K. I. K., CHAN L. Y. S., CHAN W.Y., JOHNSON P. J., LO Y. M. D. Diagnostic and Prognostic Implications of Circulating Cell-free Epstein-Barr Virus DNA in Natural Killer/T-Cell Lymphoma. *Clin Cancer Research* Vol. 8, 29–34, January 2002.

LEON S. A., SHAPIRO B., SKLAROFF D. M., YAROS M. J. Free DNA in the Serum of Cancer Patients and the Effect of Therapy. *CANCER RESEARCH* 37, 646-650, March 1977.

LO Y. M. D, LEI K. I. K., CHAN L. Y. S., CHAN W.Y., JOHNSON P., HUANG D. P., Quantitative Analysis of Cell-free Epstein-Barr Virus DNA in Plasma of Patients with Nasopharyngeal Carcinoma. *CANCER RESEARCH* 59, 1188–1191, March 15, 1999.

LO Y. M. D, LEI K. I. K., CHAN L. Y. S., CHAN W.Y., JOHNSON P. J. Molecular Prognostication of Nasopharyngeal Carcinoma by Quantitative Analysis of Circulating Epstein-Barr Virus DNA. *CANCER RESEARCH* 60, 6878–6881, December 15, 2000.

MESH - Medical Subject Headings - National Library of Medicine. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/cgi/mesh/2008/MB_cgi?mode=&term=Alu+Repetitive+Sequences. Acesso em: 27 de outubro de 2008.

MONTEIRO EP, SALEM JB, TAGLIETTI EM, ALBUQUERQUE IC, FORMIGA GJS. Neoplasia colorretal até 40 anos - Experiência em cinco anos. *Rev bras Coloproct* 2006; 26(2): 156-161.

PINHO M. *Biologia molecular do câncer – fundamentos para a prática médica*. Livraria e Editora Revinter Ltda., Rio de Janeiro, 2005.

RAMOS E. S. DNA livre fetal em plasma materno e diagnóstico pré-natal não invasivo. *Rev Latino-am Enfermagem* 2006 novembro-dezembro; 14(6).

ROCHA B.P., FERRARI A.P., FORONES N.M.. Frequency of adenomatous polyps after surgical resection of colorectal cancer. *Arq Gastroenterol* 2000; 37(1): 31-4.

SANTOS JÚNIOR J.C.M. Contribuição à campanha nacional de conscientização sobre o câncer do intestino grosso - A questão da prevenção e do diagnóstico precoce. *Rev bras coloproct*, 2003; 23(1): 32-40.

SARASTE A., PULKKI K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovascular Research* 45 (2000) 528 –537.

SCHUSTER R., MAX N., MANN B., HEUFELDER K., THILO F., GRONE J., ROKOS F., BUHR H.J., THIEL E., KEILHOLZ U. Quantitative real-time RT-PCR for detection of disseminated tumor cells in peripheral blood of patients with colorectal cancer using different mRNA markers. *Int. J. Cancer*: 108, 219–227 (2004).

SCHMIDT B., WEICKMANN S., CHRISTIAN W., FLEISCHHACKER M. Integrity of Cell-Free Plasma DNA in Patients with Lung Cancer and Nonmalignant Lung Disease. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1137: 207–213 2008.

SJÖBLOM T., JONES S., WOOD L. D., PARSONS D. W., LIN J., THOMAS B., DIANA M., REBECCA J. LEARY, J. PTAK, N. S., STEVE S., PHILLIP B., CHRISTOPHER F.L, PAUL M., SANFORD D. M., JOSEPH W., DAWN D., JAMES K. V. W., ADI F. G., JAMES H., LEO WU, CHANGSHENG L., GIOVANNI P., BEN H. P., KURTIS E. B., NICKOLAS P., VOGELSTEIN B., KENNETH W. K., VICTOR E. V. The Consensus Coding Sequences of Human Breast and Colorectal Cancers. www.sciencexpress.org / 7 September 2006 / Page 2 / 10.1126/science.1133427

SOZZI G., CONTE D., LEON M. E., CIRINCIONE R., ROZ L., RATCLIFFE C., ROZ E., CIRENEI N., BELLOMI M., PELOSI G., PIEROTTI M. A., PASTORINO U. Analysis of Circulating Tumor DNA in Plasma at Diagnosis and during Follow-Up of Lung Cancer Patients. *CANCER RESEARCH* 61, 4675–4678, June 15, 2001.

SOZZI G., CONTE D., LEON M. E., CIRINCIONE R., ROZ L., RATCLIFFE C., ROZ E., CIRENEI N., BELLOMI M., PELOSI G., PIEROTTI M. A., PASTORINO U. Quantification of Free Circulating DNA as a Diagnostic Marker in Lung Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, Vol. 21, No 21 (November 1), 2003: pp 3902-3908.

STROUN M, ANKER P, MAURICE P, LYAUTEY J, LEDERREY C, BELJANSKI M. Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. *Oncology* 46: 318–322, 1989.

TABACK B., HOON D.S. Circulating nucleic acids and proteomics of plasma/serum: clinical utility. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1022:1–8.

TAKEMURA G., FUJIWARA H. Morphological aspects of apoptosis in heart diseases. *J. Cell. Mol. Med.* Vol 10, No 1, 2006 pp. 56-75

UMETANI N., HIRAMATSU S., HOON D.S.B. Higher Amount of Free Circulating DNA in Serum than in Plasma Is Not Mainly Caused by Contaminated Extraneous DNA during Separation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1075: 299–307 (2006).

UMETANI N., KIM J., HIRAMATSU S., REBER H.A., HINES O.J., BILCHIK A.J., HOON D.S.B. Increased Integrity of Free Circulating DNA in Sera of Patients with Colorectal or Periampullary Cancer: Direct Quantitative PCR for ALU Repeats. *Clinical Chemistry* 52, No. 6, 2006.

UMETANI N., KIM J., HIRAMATSU S., REBER H.A., HINES O.J., BILCHIK A.J., HOON D.S.B. Prediction of Breast Tumor Progression by Integrity of Free Circulating DNA in Serum. *J Clin Oncol* 24:4270-4276.2006.

VOGELSTEIN, B. AND KINZLER, K.W. Cancer genes and the pathways they control, *Nature Medicine* 10:789-799, 2004.

WANG BRANT G., HUANG H.Y., CHEN Y.C., BRISTOW R. E., KASSAUEI K., CHENG C.C., RODEN R., SOKOLL L. J., DANIEL W. C., SHIH M. Increased Plasma DNA Integrity in Cancer Patients. *CANCER RESEARCH* 63, 3966–3968, July 15, 2003.

WANG J.Y., WU C.H., LU C.Y., HSIEH J.S., WU D. C., HUANG S.Y., LIN S.R. Molecular Detection of Circulating Colorectal Cancer Cells. *World J Surg* (2006) 30: 1007–1013.

WANG J.Y., WU C.H., LU C.Y., HSIEH J.S., WU D.C., HUANG S.Y., LIN S.R. Molecular Detection of Circulating Tumor Cells in the Peripheral Blood of Patients with Colorectal Cancer Using RT-PCR: Significance of the Prediction of Postoperative Metastasis. *World J Surg* (2006) 30: 1007–1013.

WATSON JD, BAKER TA, BELL ST, GANN A, LEVINE M, LOSICK R. 2006. *Biologia Molecular do Gene*. Artmed, Porto Alegre, RS.

WINAWER S.J., FLETCHER R.H., MILLER L., et al. Colorectal cancer screer clinical guideline and rationale. *Gastroenterology* 1997; 112: 594-642.

WU T.L., ZHANG D., CHIA J. H., TSAO K.C., SUN C.F., WU J. T. Cell-free DNA: measurement in various carcinomas and establishment of normal reference range. *Clinica Chimica Acta* 321 (2002) 77–87.

XU D., LI X.F., ZHENG S., JIANG W.Z. Quantitative real-time RT-PCR detection for CEA, CK20 and CK19 mRNA in peripheral blood of colorectal cancer patients. *Journal Zhejiang Univ. SCIENCE B* 2006 7(6): 445-451.

XUE X., ZHU Y., WOLL P. J. Circulating DNA and Lung Cancer. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1075: 154–164 (2006).

ZIEGLER A., WITTKE U. Z., STAHEL R. A. Circulating DNA: a new diagnostic gold mine?. *Can Trat.* Volume 28, Issue 5, Pages 255-271 (October 2002).

ZITT M., MÜLLER H. M. ¹, ROCHEL M., SCHWENDINGER V., ZITT M., GOEBEL G., DEVRIES A., MARGREITER R., OBERWALDER M., ZEILLINGER R., ÖFNER D. Circulating cell-free DNA in plasma of locally advanced rectal cancer patients undergoing preoperative chemoradiation: A potential diagnostic tool for therapy monitoring. *IOS Press Disease Markers* Volume 25, Number 3 / 2008 159-165.

ZOLOTUKHINA T. V., SHILOVA N. V., VOSKOBEOVA E. Y. Analysis of Cell-free Fetal DNA in Plasma and Serum of Pregnant Women. *J Histochem Cytochem* 53:297–299, 2005.

APÉNDICES

APÊNDICE B

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (T.C.L.E.)

(Em 2 vias, firmado por cada participante-voluntári(o,a) da pesquisa e pelo responsável)

“O respeito devido à dignidade humana exige que toda pesquisa se processe após consentimento livre e esclarecido dos sujeitos, indivíduos ou grupos que por si e/ou por seus representantes legais manifestem a sua anuência à participação na pesquisa.” (Resolução. n° 196/96-IV, do Conselho Nacional de Saúde)

Eu,, tendo sido convidad(o,a) a participar como voluntári(o,a) do estudo Diagnóstico molecular de câncer colorretal por DNA livre no sangue periférico e RNAm de células neoplásicas., recebi d(o,a) Sr(a). Prof. Dr. Manoel Álvaro lins Neto, d(o,a) Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (ICBS) – Prof. De Medicina e oncologista do Hospital universitário (H.U.- UFAL), responsável por sua execução, as seguintes informações que me fizeram entender sem dificuldades e sem dúvidas os seguintes aspectos:

- Que o estudo se destina ao: Diagnóstico e prognóstico do câncer colorretal
- Que a importância deste estudo é a validação de marcadores genéticos detecção eacompanhamento do avanço de tumores.
- Que os resultados que se desejam alcançar são os seguintes: Definição de níveis de DNA livre correspondentes a presença (ou não) de tumores.
- Que esse estudo começará em 01/04/2007 e terminará em 28/02/2009
- Que o estudo será feito da seguinte maneira: Serão coletadas 80 amostras: 30 de voluntários saudáveis e 50 de pacientes com tumor ou já operados.
- Que eu participarei das seguintes etapas: Coleta de 8 ml de sangue sendo 4 para análise do DNA Livre e 4 para extração de RNAm.
- Que os outros meios conhecidos para se obter os mesmos resultados são as seguintes: não existe.
- Que os incômodos que poderei sentir com a minha participação são os seguintes: Uma leve dor, fraca e suportável na pega do cotovelo.
- Que os possíveis riscos à minha saúde física e mental são: Nenhum
- Que, se eu vier a sofrer algum dos danos previstos em virtude de minha participação na pesquisa, eu deverei ser indenizado das seguintes formas: Por não existir danos, não há formas de indenização.
- Que deverei contar com a seguinte assistência: Curativo imediato com algodão e anti-séptico , sendo responsáve(l, is) por ela Benisio Ferreira da Silva Filho.
- Que os benefícios que deverei esperar com a minha participação, mesmo que não diretamente são: Estar contribuindo para melhor conhecimento da tecnologia do DNA Livre

- Que a minha participação será acompanhada do seguinte modo: Será realizada a punção de sangue periférico na prega o cotovelo, com materiais estéreis e individuais, sendo para todos os participantes, materiais descartáveis. Portanto não há risco de nenhuma forma conhecida de contaminação. A punção será feita por uma pessoa experiente.
- Que, sempre que desejar, serão fornecidos esclarecimentos sobre cada uma das etapas do estudo.
- Que, a qualquer momento, eu poderei recusar a continuar participando do estudo e, também, que eu poderei retirar este meu consentimento, sem que isso me traga qualquer penalidade ou prejuízo.
- Que as informações conseguidas através da minha participação não permitirão a identificação da minha pessoa, exceto aos responsáveis pelo estudo, e que a divulgação das mencionadas informações só será feita entre os profissionais estudiosos do assunto.

Finalmente, tendo eu compreendido perfeitamente tudo o que me foi informado sobre a minha participação no mencionado estudo e estando consciente dos meus direitos, das minhas responsabilidades, dos riscos e dos benefícios que a minha participação implicam, concordo em dele participar e para isso eu DOU O MEU CONSENTIMENTO SEM QUE PARA ISSO EU TENHA SIDO FORÇADO OU OBRIGADO.

Endereço d(o,a) participante-voluntári(o,a)

Domicílio: (rua, praça, conjunto):

Bloco: /Nº: /Complemento:

Bairro: /CEP/Cidade: /Telefone:

Ponto de referência:

Contato de urgência: Sr(a).

Domicílio: (rua, praça, conjunto) aristides de andrade

Bloco: /Nº: /Complemento: 452

Bairro: /CEP/Cidade: /Telefone : 3336-6558

Ponto de referência: colégio batista algoano / museu de história natual -UFAL

Endereço d(os,as) responsável(is) pela pesquisa:

Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

Endereço: aristides de andrade

Bloco: 452 LABORATÓRIO DE DNA FORENSE

Bairro: Telefones p/contato: 3336-6558

ATENÇÃO: Para informar ocorrências irregulares ou danosas durante a sua participação no estudo, dirija-se ao:**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS:****Prédio da Reitoria, sala do C.O.C. , Campus A. C. Simões, Cidade Universitária****Telefone: 214-1053****(Informações obrigatórias)**

Maceió,

(Assinatura ou impressão datiloscópica d(o,a) voluntári(o,a) ou responsável legal - Rubricar as demais folhas)	Nome e Assinatura do(s) responsável(is) pelo estudo (Rubricar as demais páginas)