

**Pesquisa de Biomarcadores de Genotoxicidade em Sangue e Soro por
Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier**

HELDER SANTOS DA PAZ TEIXEIRA

**Trabalho Final de Mestrado para obtenção do Grau de
Mestre em Engenharia Biomédica**

Versão Definitiva

Orientadoras:

Dra. Cecília Ribeiro da Cruz Calado (ISEL)

Dra. Carina Ladeira (ESTeSL)

Outubro 2018

**Pesquisa de Biomarcadores de Genotoxicidade em Sangue e Soro por
Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier**

HELDER SANTOS DA PAZ TEIXEIRA

**Trabalho Final de Mestrado para obtenção do Grau de
Mestre em Engenharia Biomédica**

Orientadoras:

Dra. Cecília Ribeiro da Cruz Calado (ISEL)

Dra. Carina Ladeira (ESTeSL)

Júri

Presidente: Dra. Maria da Graça Andrade (ESTeSL)

Vogais: Dr. Pedro Nuno Sousa Sampaio (Universidade Lusófona)

Dra. Cecília Ribeiro da Cruz Calado (ISEL)

Outubro 2018

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, por me ter dado a força necessária para chegar onde estou hoje e para a concretização deste sonho. Além disso, agradeço-Lhe por todas as pessoas que se cruzaram no meu caminho e me ajudaram a percorrer o mesmo.

À minha orientadora, Professora Doutora Cecília Ribeiro da Cruz Calado pelo apoio incondicional e orientação, conselhos e sugestões disponibilizadas na realização deste trabalho e pelas muitas palavras de ânimo no decorrer de toda a dissertação. Irei recordar-me sempre do carinho e cordialidade com que me recebeu e das suas recomendações e opiniões pertinentes e relevantes ao trabalho realizado. Não é exagero algum afirmar que, se não fosse a Professora eu não estaria onde estou hoje e como tal tem o meu mais sincero e eterno agradecimento.

Agradeço também à Professora Doutora Carina Ladeira, por me ter concedido acesso às amostras relativas ao estudo, sem as quais este trabalho não teria sido de todo possível.

Deixo também uma palavra de agradecimento ao Instituto Politécnico de Lisboa, pelo financiamento dos projetos IDI&CA/IPL/2017/DrugsPlatf/ISEL, IDI&CA/IPL/2017/GenTox/ESTeSL e IDI&CA/IPL/2018/RenalProg/ISEL.

Ao Dr. Luís Ramallete pelo apoio na construção e interpretação na análise multivariada dos dados obtidos em laboratório e pela contínua motivação para solucionar problemas de interpretação de dados tanto de espectroscopia, como de estatística.

Aos meus colegas do laboratório, Rúben Araújo, Maria João Pereira e Viviana Caldeira que sempre me deram apoio e incentivaram, inclusive nos momentos mais complicados da minha vida pessoal e universitária.

O meu maior agradecimento descansa nos ombros de todos aqueles que dedicaram o seu tempo pessoal para me ajudarem em detrimento deles próprios e que sempre me apoiaram em todas as fases da minha vida. Um grande obrigado e bem-haja aos meus pais, irmãos e irmã.

Levo-os a todos no meu coração.

Dedicatória

Dedico esta dissertação a todos os quantos me ajudaram e fizeram acreditar no meu valor e na realização do meu sonho, em especial à minha família.

“Determinação, coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso. Se estamos possuídos por uma inabalável determinação, conseguiremos superá-los. Independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho.”

Dalai Lama

Resumo

Os biomarcadores de genotoxicidade têm sido amplamente utilizados na avaliação da exposição ambiental de trabalhadores a por exemplo agentes citostáticos, sendo estes geralmente determinados por análise de micronúcleos em linfócitos após bloqueio da citocinese. Devido à laboriosidade e complexidade desta técnica, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver um método de pesquisa de biomarcadores de genotoxicidade no sangue por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (*FTIR – Fourier-Transform Infrared spectroscopy*), dado esta última técnica ser muito sensível a diferenças na constituição molecular de amostras biológicas, e em simultâneo ser baseada num protocolo experimental simples de implementar, rápido, económico e aplicável em análises de elevado débito. No presente trabalho, foram consideradas amostras de sangue congelado de 92 pessoas, sendo 46 profissionais em hospitais exposto ao citostático 5-fluorouracil, identificados como Grupo Casos, e os restantes 46 participantes, profissionais que não trabalham em ambiente hospitalar e que não foram expostos ao agente citostático, identificados como Grupo Controlo. Para além destas amostras, estavam disponíveis dos mesmos participantes soro de 23 pessoas do grupo Casos e 35 do grupo Controlo. Foi avaliado o efeito da centrifugação, grau de diluição e solução de diluição do sangue após descongelação na razão sinal/ruído do espectro de FTIR. Foi também avaliado o efeito do grau de diluição de soro. Pesquisou-se biomarcadores espectrais em amostras de sangue total, soro e de extratos de metanol de sangue, através da avaliação do efeito de diversos pré-processamento de espectros (correção de linha de base, normalização, 1ª e 2ª derivada) na análise de componentes principais. Para estes 3 tipos de amostras, pesquisaram-se bandas espectrais que fossem diferentes na média da 2ª derivada dos espectros de Casos e Controlo. Com base nas diferenças observadas na 2ª derivada do espectro, e no trabalho de outros investigadores, avaliaram-se estatisticamente diversas razões de bandas espectrais. Não foi possível identificar razões de bandas dos espectros de soro estatisticamente diferentes entre as médias das populações de Casos e Controlos. Foi possível identificar nas amostras de sangue total e de extratos de metanol de sangue, diversas razões de bandas dos espectros significativamente diferentes entre as médias das populações de Casos e Controlos. Desta forma o método de espectroscopia FTIR desenvolvido neste trabalho pode constituir uma ferramenta relevante na pesquisa de biomarcadores de genotoxicidade em amostras biológicas como de sangue, e por consequência uma ferramenta no combate ao cancro.

Palavras-Chave: Biomarcadores, genotoxicidade, espectroscopia de FTIR, citostáticos

Abstract

Genotoxicity biomarkers have been widely used in the evaluation of environmental exposure of workers. These are usually determined by analysis of micronucleus in lymphocytes after cytokinesis block. Due to the complexity and time-consuming of this technique, this work aims to develop a new method to discover genotoxicity biomarkers in biological samples as blood, based on Infrared Fourier Transform (FTIR) spectroscopy, since this last technique is highly sensitive to differences in the molecular composition of biological samples, and simultaneously is based on an experimental protocol that is easy to implement, fast, economic and applicable in high throughput mode. In the present work, frozen blood samples from 92 people were considered, 46 being professionals in hospitals exposed to the cytostatic 5-fluorouracil, identified as the Cases group, while the remaining 46 participants are professionals that do not work in a hospital environment and that have not been exposed to the cytostatic environment, identified as Control group. Besides these samples, serum samples of the same participants of 23 people in the Cases group and 35 of the Control group were available. The effect of centrifugation, dilution factor and dilution solution after blood thawed in the signal to noise ratio of the FTIR spectra were evaluated. It was also analysed the effect of the dilution factor in serum. Spectral biomarkers in total blood samples, serum and methanol extract from blood were searched, through the evaluation of the effect of diverse spectra pre-processing methods (baseline correction, normalization, first derivative and second derivative) in the analysis of principal components. For these 3 types of samples, spectral bands that were different in the average of the second derivative spectra of Cases and Control groups were searched. Based on these differences and in the work of other researchers, various ratios of the spectral bands were evaluated statistically. It was not possible to identify ratios of spectral bands from serum that were statistically different between the Cases and Controls populations. In the blood samples and blood methanol extracts, it was possible to identify diverse spectral bands ratios, that were significative different between the Cases and Control groups. In conclusion, the FTIR spectroscopy method developed in this work proved that it can be a relevant tool in the search for genotoxicity biomarkers in biological samples, e.g. blood, and consequently a tool in the fight against cancer.

Keywords: biomarkers, genotoxicity, FTIR spectroscopy, cytostatic

Índice

Agradecimento	i
Resumo	iv
Abstract	v
Abreviaturas	viii
Lista de figuras	ix
Lista de tabelas	xi
1. Introdução.....	12
1.1. Enquadramento do trabalho e objetivos.....	12
1.2. Revisão bibliográfica	13
1.2.1. Conceitos gerais de cancro, citostáticos e de genotoxicidade	13
1.2.2. Biomarcadores.....	14
1.2.3. Método de deteção de micronúcleos em linfócitos por bloqueio de citocinese	15
1.2.4. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier	15
1.2.4.1. Modos de aquisição.....	19
1.2.4.2. Métodos de pré-processamento.....	19
1.2.4.3. Análise de componentes principais.....	20
2. Materiais e Métodos	21
2.1. Equipamentos gerais.....	21
2.2. Amostras biológicas	21
2.3. Aquisição dos espectros FTIR	21
2.4. Otimização do processamento de sangue	22
2.5. Pesquisa de biomarcadores em Sangue	22
2.6. Pesquisa de biomarcadores em Soro.....	22
2.7. Pesquisa de biomarcadores em extratos de metanol de sangue	22
3. Resultados e Discussão	23
3.1. Descrição dos participantes no estudo	24
3.2. Otimização do processamento de sangue	27
3.3. Pesquisa de biomarcadores em sangue	32
3.3.1. Análises de componentes principais	32
3.3.2. Análises das razões de bandas espectrais.....	36
3.4. Pesquisa de biomarcadores em soro	40
3.4.1. Análise de componentes principais.....	40

3.4.2. Análise das razões das bandas espectrais	42
3.5. Pesquisa de biomarcadores em extratos de metanol de sangue	45
3.5.1. Análise de componentes principais	45
3.5.2. Análise das razões das bandas espectrais	47
4. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS	51
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

Abreviaturas

5 -FU – 5-Fluorouracil

BMI – do inglês, *Body Mass Index*, que significa índice de massa corporal

CBMN – do inglês, *Cytokinesis-Block Micronucleus*, que significa micronúcleos em linfócitos após bloqueio da citocinese

DNA – do inglês, *DeoxyriboNucleic Acid*, que significa ácido desoxirribonucleico

EDTA – do inglês, *EthyleneDiamine Tetraacetic Acid*, que significa ácido etilendiamino tetra-acético

FD – Fator de diluição

FTIR – do inglês, *Fourier-Transform Infrared*, que significa Infravermelho por Transformada de Fourier

IV – Infravermelho

LSP – Linfócitos do sangue periférico

MN – Micronúcleo(s)

NPB – do inglês, *Nuclear Protusion Bridges*, que significa número de protusões nucleares

PBMC – do inglês, *Peripheral blood mononuclear cells*, que significa células mononucleares do sangue periférico

PBS – do inglês, *Phosphate Buffered Saline*, que significa tampão fosfato

PC – do inglês, *Principal Components*, que significa componentes principais

PCA – do inglês, *Principal Component Analysis*, que significa análises dos componentes principais

RSR – Relação sinal-ruído

RTA – Reflexão total atenuada

SNV – do inglês, *Standard Normal Variate*, que significa variável normal padrão

Lista de figuras

Figura 1.2.1 - Formação de micronúcleos.....	15
Figura 1.2.2 - Espectro de IV típico de células mostrando atribuições de pico a biomoléculas entre 4000-600 cm^{-1} , onde ν corresponde a vibrações de estiramento, δ a vibrações de flexão, $\underline{\nu}$ a vibrações simétricas e $\underline{\nu}_s$ a vibrações assimétricas.....	16
Figura 1.2.3 - Esquema do interferómetro de Michelson.....	18
Fig. 3.1.1 - Valores médios relativos das duas populações de participantes CASOS <i>versus</i> CONTROLOS, em relação às características de: Género, BMI, se era fumador e respetiva carga tabágica e se consumia álcool, o número de micronúcleos em linfócitos (MN Lymp), células mononucleadas (MN Mono) e multinucleadas (MN Mult), respetivamente, o número de pontes nucleoplasmática (NPB) de protusões nucleares (NBUP) e a percentagem de dano no DNA (% DNA Tail) em linfócitos.....	25
Fig. 3.1.2 - Gráficos de bigodes relativos a algumas características dos participantes no grupo de Casos e Controlos.....	25
Fig. 3.2.1 - Espectro médio de quintuplicados de análises de sangue diluído a 1/10 (linhas pretas) ou 1/20 (linhas cinzentas) em PBS, de sangue não centrifugado (linhas não tracejadas) e centrifugado (linhas tracejadas) a 3000 rpm, durante 15 min. a 20°C.....	27
Fig. 3.2.2 - Somas das médias de absorvância e desvios padrão das 3729 leituras de absorvância espectrais e respetivos coeficientes de variação e sinal/ruído médios, divididos (i.e. normalizados) por 3729, obtidas de quintuplicados de análises de sangue do 1º dador não centrifugado (colunas a azul) e centrifugado (colunas a vermelho) e diluído a 1/8, 1/10, 1/15 e 1/20 em PBS.....	28
Fig. 3.2.3 - Somas das médias de absorvância e desvios padrão das 3729 leituras de absorvância espectrais e respetivos coeficientes de variação e sinal/ruído médios, divididos (i.e. normalizados) por 3729, obtidas de quintuplicados de análises de sangue não centrifugado do 1º dador e diluído a 1/10, 1/20 e 1/40 em NaCl.....	30
Fig. 3.2.4 - Somas das médias de absorvância e desvios padrão das 3729 leituras de absorvância espectrais e respetivos coeficientes de variação e sinal/ruído médios, divididos (i.e. normalizados) por 3729, obtidas de pentuplicados de análises de sangue não centrifugado do 2º dador e diluído NaCl (colunas a azul) ou PBS (colunas a laranja) a 1/8, 1/10, 1/15 ou 1/20.....	30
Fig. 3.3.1 - Espectros de FTIR sem pré-processamento de sangue total de 92 pessoas diluído em NaCl 0,9% a 1/10, 1/20 e 1/40 e respetivos gráficos da PCA. Cada diluição foi efetuada em triplicado.....	32
Fig. 3.3.2 - PCA de espectros de amostras de sangue diluídas a 1/10 (A, D, G e J), 1/20 (B, E, H e K) e 1/40 (C, F, I e L) de pacientes do grupo Casos (vermelho) e Controlos (azul). Na análise considerou-se espectros sem pré-processamento e com pré-processamento por correção da linha de base e com normalização (à banda da amida II), 1ª e 2ª derivada.....	34
Fig.3.3.3 - PCA de 1ª derivada de espectros de sangue diluídos a 1/10 (A), de espectros com correção de linha da base 1/20 (B) e de 2ª derivada de espectros de sangue diluído 1/40 (C) de Casos (vermelho) e dos Controlos (azul)..	35
Fig. 3.3.4 - Segunda derivada do espectro médio do sangue dos participantes do grupo Casos (linha continua) e Controlos (linha a tracejado), respetivamente.....	37

Fig. 3.3.5 - Gráficos de bigodes relativos a razões de bandas espectrais de sangue entre o grupo de Casos (vermelho) e Controlos (azul)..	39
Fig. 3.4.1 - Espectros FTIR do soro de 58 pessoas após diluição em NaCl 0,9% a 1/4 e 1/8 e respetivos gráficos da PCA. Cada diluição foi efetuada em triplicado	40
Fig. 3.4.2 - PCA de espectros de soro diluídas a 1/8 do grupo de Casos (vermelho) e dos Controlos (azul). Na análise consideraram-se espectros sem pré-processamento e processamento por correção da linha de base e normalização (à banda da amida II) e da 1ª e 2ª derivada.	41
Fig. 3.4.3 – Segunda derivada do espectro médio do soro dos participantes do grupo Casos (linha continua a preto) e Controlos (linha a tracejado a vermelho), respetivamente	43
Fig. 3.5.1 – PCA do espectro de extrato de metanol do sangue 92 pessoas após diluição em NaCl 0,9% a 1/2. Cada diluição foi efetuada em triplicado.	45
Fig. 3.5.2 – PCA de espectros de extratos de metanol de sangue diluídas a 1/2. Nas análises considerou-se espectros com correção da linha da base (A), correção da linha da base com normalização (B), 1ª derivada (C) e 2ª derivada (D) dos pacientes do grupo Casos (vermelho) e Controlos (azul).	46
Fig. 3.5.2. Segunda derivada do espectro médio de amostras de sangue extraídas com metanol dos participantes do grupo Casos (linha continua a preto) e Controlos (linha a tracejado a vermelho), respetivamente.	49
Fig. 3.5.3 – Alguns gráficos de bigodes relativos a razões de bandas espectrais entre os Casos (vermelho) e Controlos (azul) do extrato do metanol de sangue.	50

Lista de tabelas

Tabela 1.2.1 – Principais bandas de absorção de biomoléculas na região do IV médio17

Tabela 3.1.1- Valores médios e respetivos desvios padrão da amostra do grupo Casos e Controlos assim como o *p-value* de testes *T-student* de comparação das médias populacionais de Casos e Controlos. O valor *p-value* da análise de *T-student* inferiores a 0,05 estão realçados a negrito e a amarelo26

Tabela 3.3.1 - Valores médios e respetivos desvio padrão de razões espectrais de amostras de sangue diluídas a 1/40 do grupo Casos e Controlos e *p-value* para testes *T-student* de comparação das médias populacionais de Casos e Controlos com uma significância de 5%38

Tabela 3.3.2 - Valores médios e respetivos desvios padrão de razões espectrais de soro diluído a 1/8 do grupo Casos e Controlos, assim como o valor de *p-value* da análise de Mann-Whitney de comparação das médias populacionais de Casos e Controlos. 44

Tabela 3.5.1. Valores médios e respetivos desvio padrão de razões espectrais de extratos de sangue de metanol do grupo casos e controlos assim como o *p-value* de testes *T-student* de comparação das médias populacionais de Casos e Controlos. O *p-value* da análise de *T-student* inferior a 0,05 estão realçados a negrito e a amarelo.48

1 INTRODUÇÃO

1.1 ENQUADRAMENTO DO TRABALHO E OBJETIVOS

O cancro constitui uma das principais causas de morte mundial, constituindo em Portugal a segunda causa de morte, logo a seguir às doenças cardiovasculares. A previsão de aumento de novos casos de cancro na Europa e em Portugal, efetuada pela *International Agency for Research on Cancer (IARC)*, é de 13,7% e de 12,6%, respetivamente. Este aumento deve-se ao elevado envelhecimento da população, isto apesar das melhorias quer a nível do diagnóstico precoce quer de terapias. A forma mais efetiva de redução de cancro, é a sua prevenção, por exemplo, através da identificação de fatores moleculares que mais contribuem para o processo de carcinogénese. Neste âmbito, a análise do potencial genotóxicos de substâncias é pertinente na previsão de risco de carcinogénese. A genotoxicidade de uma substância está relacionada com alterações do genoma da célula humana e que podem implicar mutações relevantes em processos de carcinogénese. Um dos métodos de análise de genotoxicidade mais utilizados e que indica uma ligação direta aos processos de carcinogénese é o baseado na deteção de micronúcleos em linfócitos após bloqueio da citocinese (CBMN, do inglês *cytokinesis-block micronucleus*). Este teste é amplamente utilizado, por exemplo, na biomonitorização ocupacional e ambiental, na biodosimetria da radiação, na indústria farmacêutica e em estudos nutricionais. No entanto, e apesar da sua ampla utilização, este método apresenta algumas limitações, sendo de destacar a elevada inter e intra-variabilidade para além da complexidade e laboriosidade da técnica analítica em si. Para a utilização de biomarcadores de genotoxicidade para epidemiologia molecular, aplicáveis em larga escala, é assim crucial desenvolver métodos alternativos de análise de genotoxicidade e que sejam sensíveis, simples, económicos, automatizáveis e aplicáveis em ensaios de elevado débito (*high-throughput*). A espectroscopia de infravermelho apresenta características que podem permitir alcançar estes objetivos.

O objetivo principal deste trabalho é identificar biomarcadores de genotoxicidade, em sangue, soro e em extratos de metanol de sangue, por métodos baseados em espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR, do inglês *Fourier-Transform Infrared*). Utilizaram-se amostras biológicas provenientes de trabalhadores que foram expostos ocupacionalmente, ou não, à droga citostática 5-fluorouracil (5-FU). O presente trabalho baseia-se num projeto de âmbito mais global, em que foram avaliados efeitos genotóxicos em linfócitos utilizando-se o método de CBMN, da exposição de trabalhadores em hospitais (como enfermeiros, farmacêuticos e auxiliares) a 5-FU designado grupo de Casos). O grupo de Controlos foi constituído por trabalhadores de uma instituição académica sem contato com drogas citostáticas (como descrito em Ladeira *et al.*, 2014). No atual trabalho, utilizou-se um método de espectroscopia FTIR baseado no protocolo desenvolvido por Rosa *et al.* (2016). De forma a identificar biomarcadores espectrais de genotoxicidade, foi otimizado o processamento de sangue de forma a obter-se espectros de elevada razão sinal/ruído e foi avaliado o efeito de diversos pré-processamento espectrais como correção de linha de base, normalização, 1ª e 2ª derivada, na análise de componente principais (PCA, do inglês *Principal Component Analysis*). Após análise da segunda derivada do espectro também foi avaliado por inferência estatística, se havia diferenças significativas entre as médias de razões de bandas de absorvância entre as populações Controlo e Casos.

1.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.2.1 Conceitos gerais de Cancro, Citostáticos e Genotoxicidade

Cancro ou tumor maligno é o termo médico utilizado para denominar um vasto conjunto de doenças caracterizadas por um crescimento anormal e descontrolado das células e que, na maioria das vezes, formam uma massa chamada tumor e que apresenta capacidade de invasão de outros tecidos (Carvalho, 2007). A multiplicidade de alterações genéticas observadas em células durante a evolução do processo de transformação maligna, não pode ser explicada com base apenas nas taxas de mutação espontânea (aquelas ocorridas na presença somente de fatores endógenos), tendo dado deste modo origem a outros estudos associados às alterações genéticas (Beckman & Loeb, 2005). A exposição a agentes mutagênicos físicos, químicos e biológicos, tem participação relevante na etiologia da doença, pois os mesmos agentes interagem direta ou indiretamente com o ácido desoxirribonucleico (DNA, do inglês *deoxyribonucleic acid*), podendo levar as mutações pontuais e alterações cromossômicas, estruturais ou numéricas, que aumentam a probabilidade de a célula evoluir para um quadro de instabilidade genômica característico de etapas iniciais do processo carcinogênico. Biomarcadores associados a estes eventos podem ser ferramentas para a detecção precoce de mudanças relacionadas com o cancro (Souza, 2013).

Citostáticos

Os fármacos citotóxicos ou citostáticos, também conhecidos como antineoplásicos, são utilizados no tratamento de neoplasias malignas quando a cirurgia ou a radioterapia não são possíveis ou se mostram ineficazes, ou ainda como adjuvantes da cirurgia ou da radioterapia como tratamento inicial. Os fármacos citotóxicos podem ser utilizados também como paliativo dos sintomas ou como meio de prolongar a vida do doente (Sá, 2013).

Os citostáticos podem ser definidos como substâncias capazes de inibir a evolução de neoplasias, restringindo a proliferação de células malignas, por atuação sobre fases específicas do ciclo celular. Por consequência, os citostáticos são ativos em células em processo de divisão celular. Este mecanismo faz com que sejam por si próprias, substâncias cancerígenas, mutagênicas e teratogênicas. São um grupo heterogêneo de substâncias de natureza química diferente. No processo de utilização de agentes citostáticos, o 5-FU e o metotrexato representam 81% dos agentes antineoplásicos utilizados (Sá, 2013).

Genotoxicidade

Muitos dos compostos químicos aos quais os organismos estão frequentemente expostos podem induzir modificações químicas no DNA. Estas modificações na estrutura do DNA são prejudiciais às células, uma vez que podem prejudicar processos vitais, tais como a replicação do DNA e a transcrição gênica. Estas substâncias também podem causar mutações e aberrações cromossômicas. As mutações em células somáticas podem levar ao cancro e em células germinativas à morte (aborto) ou a aberrações cromossômicas e consequentemente a doenças metabólicas congênitas (Rodrigues, 2014). A análise de genotoxicidade baseia-se na identificação de substâncias que causam alterações do genoma da célula humana e que podem implicar mutações hereditárias relevantes em processos de carcinogênese. Um dos métodos de análise de genotoxicidade mais utilizados e que indica uma ligação direta aos processos de carcinogênese, é a detecção de micronúcleos nos linfócitos do sangue periférico (LSP). Os micronúcleos consistem numa porção citoplasmática de cromatina de forma redonda ou oval, localizada perto do núcleo. A sua formação resulta de uma lise na molécula de DNA, dias ou semanas após a ação de carcinógenos, quando as células da camada basal estão em divisão. São constituídos, portanto, de

fragmentos de cromátídeos ou cromossomas acêntricos ou aberrantes que não foram incluídos no núcleo principal após a conclusão da mitose. Deste modo, células micronucleadas podem refletir a incidência de eventos genotóxicos (Andrade, 2005).

1.2.2 Biomarcadores

Os Biomarcadores foram definidos pela *National Academy of Sciences*, como uma alteração em componentes, processos, estrutura ou funções celulares ou bioquímicos mensuráveis num sistema ou amostra biológica (Ladeira *et al.*, 2012).

Para que, uma substância química ou uma alteração biológica seja, validada como um biomarcador, é desejável que apresente as seguintes características:

- Refletir a interação (qualitativa ou quantitativa) do sistema biológico com a substância química;
- Ter a sensibilidade e especificidade apropriada para a interação;
- Ser reprodutível qualitativamente e quantitativamente.;
- Estar dentro de um meio biológico possível de analisar, considerando a necessidade de manutenção da integridade da amostra entre a recolha e o procedimento analítico;
- A medição analítica tem de apresentar exatidão e precisão adequadas;
- Conhecer os valores normais do indicador em populações não expostas ao agente químico de interesse, assim como as variações intra e inter-individuais.

Os Biomarcadores podem ser usados para vários propósitos, dependendo da finalidade do estudo e do tipo da exposição química. Podem ter como objetivos avaliar a exposição (quantidade absorvida ou dose interna), avaliar os efeitos das substâncias químicas e avaliar a suscetibilidade individual. Além disso, podem ser utilizados independentemente da fonte de exposição, seja através da dieta, do meio ambiente geral ou ocupacional. A utilização destes biomarcadores pode ter como finalidade a de ilustrar a relação causa-efeito e dose-efeito na avaliação de risco à saúde para fins de diagnóstico clínico e para fins de monitorização biológica, realizada de maneira sistemática e periódica (Amorim, 2003).

A classificação tradicional de biomarcadores geralmente é dividida, em função do efeito toxicológico, em três categorias principais: exposição, efeito e suscetibilidade (Ladeira *et al.*, 2012):

- Os Biomarcadores de Exposição podem ser usados para confirmar e avaliar a exposição individual ou de um grupo, para uma substância em particular, estabelecendo uma ligação entre a exposição externa e a quantificação da exposição interna.
- Os Biomarcadores de Efeito podem ser usados para documentar as alterações pré-clínicas ou efeitos adversos à saúde decorrentes da exposição e absorção da substância química. Dessa forma, a ligação dos biomarcadores entre exposição e efeitos contribui para a definição da relação dose-resposta.
- Os Biomarcadores de Suscetibilidade permitem a compressão do grau de resposta da exposição provocada nos indivíduos.

1.2.3 O método de detecção de micronúcleos em linfócitos por bloqueio de citocinese

O Teste de Micronúcleo em linfócitos com Bloqueio da Citocinese é o método preferencial na medição da frequência de micronúcleos (MN) em cultura de linfócitos humanos (Souza, 2013). MN são estruturas resultantes de fragmentos cromossômicos ou de cromossomas inteiros que não foram incluídos no núcleo das células filhas durante a divisão celular. Refletem, portanto, a ocorrência de danos aneugênicos e clastogênicos. Os MN são formados por condensação de fragmentos de cromossomas acêntricos (efeito clastogênicos) ou por cromossomas inteiros (efeito aneugênicos) que se atrasam em relação aos restantes durante a anáfase do ciclo celular, não sendo incluídos no núcleo das células-filhas em telófase. Nesta fase, os fragmentos de cromossomas ou cromossomas inteiros são envolvidos por um invólucro nuclear formando estruturas tipicamente arredondadas, com cor e textura semelhantes ao núcleo principal e diâmetro a variar entre 1/20 e 1/5 do diâmetro do núcleo principal (Figura 1.2.1) (Pina, 2010).

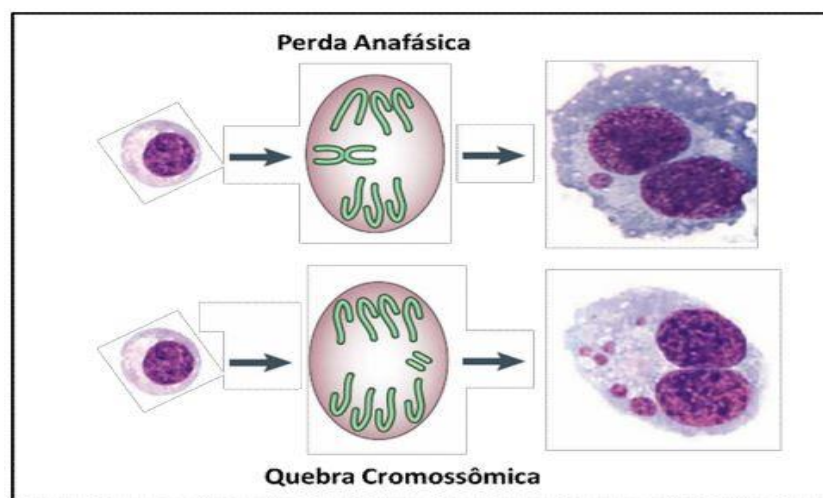


Fig. 1.2.1 - Formação de micronúcleos. Adaptado de Fenech *et al* (2007).

1.2.4 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier.

A espectroscopia de infravermelho (IV) médio abrange uma região espectral entre os números de onda de 400 cm^{-1} a 4000 cm^{-1} , onde são medidas fortes absorções devido a vibrações moleculares fundamentais. Considerando as mudanças nos modos vibracionais das moléculas, existem essencialmente dois tipos de vibrações, que podem ser classificadas dependendo das mudanças no comprimento ou ângulo de ligação: as vibrações de alongamento e de flexão (Figura 1.2.2) (Russo, 2017). O espectro de IV é assim característico de cada tipo de molécula, uma vez que depende principalmente da massa dos átomos, do seu arranjo geométrico e as forças de ligação entre eles. Dado que não há duas moléculas diferentes que possuam essas três mesmas características, cada molécula terá, em teoria, um espectro distinto. Os picos de absorção dentro da região de IV médio são geralmente mais nítidos quando comparados com os picos de absorção das regiões ultravioleta e visível. Deste modo, a espectroscopia no IV consegue ser muito sensível na determinação de grupos funcionais. Uma molécula pode ser identificada comparando o seu pico de absorção a uma base de dados de espectros. A espectroscopia de IV é muito útil na identificação e análise estrutural de uma elevada variedade de substâncias, incluindo compostos orgânicos e inorgânicos. Também pode ser usado para análise qualitativa e quantitativa de misturas complexas de compostos similares (Skoog *et al.*, 2007).

Uma vez que a certas regiões do espectro são atribuídas a ligações moleculares específicas, sabendo a composição de todas as biomoléculas, pode-se extrapolar esses resultados e associar essas biomoléculas a certas regiões do espectro de absorção do IV (Tabela 1.2.1) (Bellisola, 2012). Por exemplo, as proteínas são um dos principais constituintes de todas as células, sendo assim, as suas bandas de absorção são facilmente observadas na espectroscopia de FTIR. As bandas de vibração das ligações moleculares das proteínas são predominantemente observadas na região espectral entre 1800 a 1500 cm^{-1} . Os espectros de IV das proteínas exibem duas bandas principais, a amida I e amida II posicionadas a aproximadamente 1650 cm^{-1} e 1540 cm^{-1} , respectivamente. Estas são amplamente utilizadas em estudos sobre estruturas secundárias de proteínas e atribuídos principalmente ao modo vibracional de estiramento C=O e flexão NH (Venkatachalam *et al.*, 2008). Mudanças na banda amida I refletem diferenças nas resistências da ligação de hidrogénio e entre os dipolos inter e intra-moleculares, o que, por sua vez, torna a banda amida I sensível às mudanças conformacionais secundárias (Kar *et al.*, 2018).

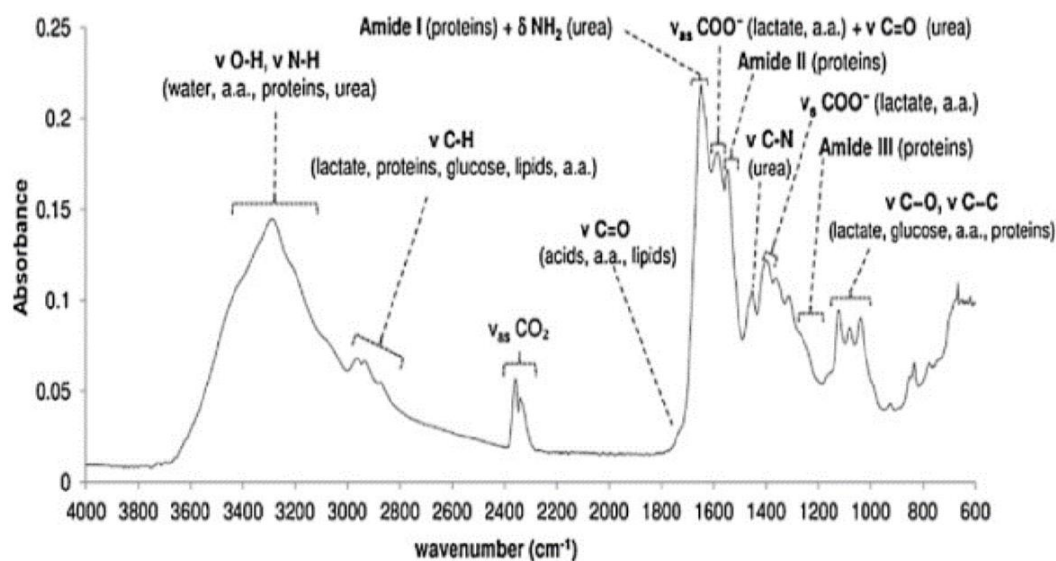


Fig. 1.2.2 - Espectro de IV típico de células mostrando atribuições de picos a biomoléculas entre 4000-600 cm^{-1} , onde v corresponde a vibrações de estiramento, δ a vibrações de flexão, s a vibrações simétricas e as a vibrações assimétricas (Russo, 2017).

Vantagens da espectroscopia FTIR

O uso de espectroscopia de IV teve início na década de 1950 por Wilbur Kaye, tendo projetado o equipamento que analisou o espectro do IV próximo e sugeriu a teoria para descrever os resultados. Karl Norris começou por usar espectroscopia de IV em química analítica na década de 1960 tendo padronizado a utilização da técnica. Houve muitos avanços no campo de espectroscopia de IV, sendo o mais notável, a aplicação da Transformada de Fourier a esta técnica, criando assim um método IV com maior resolução e menor ruído. A Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR, do inglês *Fourier-transform infrared spectroscopy*) é uma área que se tem desenvolvido rapidamente ao longo da última década com a promessa de um diagnóstico médico mais rápido e mais objetivo (Guidolin & Bachmann 2011).

Tabela 1.2.1 - Principais bandas de absorção de biomoléculas na região do IV médio adaptado de Movasaghi *et al.* (2008).

Pico de absorção (cm ⁻¹)	Modo vibracional	Constituinte biológico
3290	Estiramento do N-H, Amida A	Proteínas
3050	Amida B N – H flexão	Proteína
2960 – 2930	CH3 estiramento assimétrico	Lípidos e proteínas
2925 – 2920	CH2 estiramento assimétrico	Lípidos e proteínas
2874 – 2870	CH3 estiramento simétrico	Lípidos e proteínas
2855 – 2850	CH2 estiramento simétrico	Lípidos e proteínas
1735	Ester C=O estiramento	Lípidos
1717	purina C=O estiramento	Ácidos nucleicos
1666	pirimidina C=O estiramento	Ácidos nucleicos
1655 – 1650	Amida I C=O estiramento	Proteína (α -hélice)
1640 – 1630	Amida I C=O estiramento	Proteína (folha- β)
1468	Vibração anel fenólico	Iodotirosina-tiroglobulina
1580	COO-estiramento assimétrico	Proteínas
1560 – 1500	Amida II N – H flexão	Proteínas
1470 – 1405	CH2 flexão	Lípidos e proteínas
1400	COO- estiramento simétrico	Proteínas
1380 – 1250	CH3 flexão	Lípidos e proteínas
1280	Amida III e colágeno	Proteínas
1245 – 1220	PO2- estiramento assimétrico	Ácidos nucleicos, Lípidos
1240	Amida III e colágeno	Proteínas
1204	Amida III e colágeno	Proteínas
1155 – 1150	C=O estiramento	Glícidos
1085 – 1075	C=O estiramento	Glícidos
1028 – 1020	C – O – H deformação	Glícidos
1080	PO2 – estiramento simétrico	Ácidos nucleicos, Lípidos

As medições de espectroscopia FTIR são realizadas no domínio do tempo, onde a radiação de uma fonte IV de banda larga é direcionada para um divisor do feixe, dividindo o feixe de luz em dois. Os espelhos refletem a luz que retorna ao divisor de feixe, onde os dois feixes se combinam e o feixe modulado passa através da amostra e atinge o detetor. Num interferómetro típico, um espelho permanece fixo e o outro afasta-se do divisor de feixe a uma velocidade constante. À medida que o espelho se move, os feixes entram e saem de fase um com o outro (padrão de interferência repetitivo), o que dá origem a um gráfico de intensidade *versus* diferença no percurso do feixe - chamado interferograma. O interferograma pode ser convertido no domínio da frequência através de uma transformada de Fourier, que produz um espectro único e facilmente reconhecível. A resolução desse espectro é determinada pela distância percorrida pelo espelho em movimento. (Figura 1.2.3) (Smith & Smith, 2003).

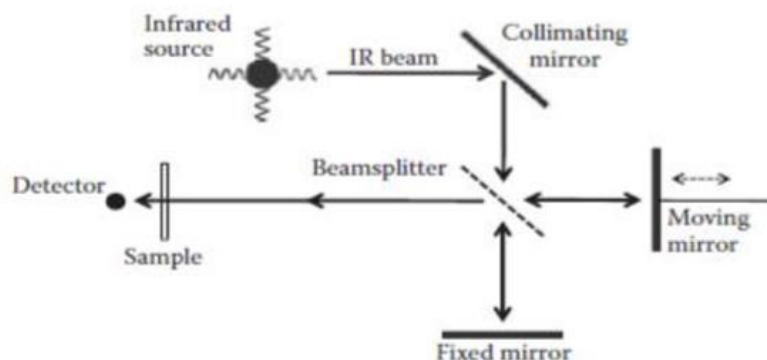


Fig. 1.2.3 - Esquema do interferômetro de Michelson (Smith, 2011).

A espectroscopia de FTIR apresenta uma diminuição no tempo necessário para aquisição de espectros, sendo estes adquiridos na escala de segundos em vez de minutos, tendo uma elevada sensibilidade que permite um rendimento ótico muito maior, com varreduras mais rápidas, o que resulta na redução dos níveis dos ruídos, isto em relação a equipamentos dispersivos. Todas essas vantagens transformam a espectroscopia de FTIR numa técnica extremamente precisa e reprodutível, sendo um método muito utilizado em química analítica, e atualmente a ser explorado noutras áreas como para diagnóstico médico. Na indústria farmacêutica e alimentar, a espectroscopia FTIR é uma ferramenta poderosa para o controle da qualidade, seja para comparações lote a lote com padrões de qualidade ou simplesmente da análise de contaminantes. A sensibilidade e precisão dos detetores de espectroscopia FTIR, juntamente com uma grande variedade de algoritmos de *software* disponíveis, tem aumentado o uso prático da radiação infravermelha (Pereira, 2018; Liu *et al.*, 2017).

Em resumo, a espectroscopia FTIR apresenta as seguintes vantagens em relação a métodos dispersivos:

- Mais preciso;
- Mais rápido;
- Maior;
- Mecanicamente simples mais simples.

Aplicação da espectroscopia FTIR

São diversos os exemplos de aplicação de espectroscopia FTIR, sendo de realçar os seguintes exemplos:

- Nanotecnologia, nomeadamente nanomaterias e nanoestruturas (Dendisová *et al.*, 2018);
- Investigação Biomédica (Bunaciu *et al.*, 2014);
- Investigação forense (Ewing & Kasarian, 2017);
- Investigação Alimentar (Li *et al.*, 2018);
- Análise de qualidade ambiental e da água (Singh, *et al.*, 2018);
- Análise de medicamentos (Bunaciu *et al.*, 2010);
- Identificação de biomarcadores de sangue e de leucemia (Guidolin & Bachmann, 2011);
Caracterização biomolecular de leucócitos (Liu & Scott, 2007);
- Investigação de biomarcadores de cancro da mama através da análise de células mononucleares de sangue periférico e de plasma (Zelig *et al.*, 2015);
- Investigação de biomarcadores de cancro colorretal através da análise de células mononucleares de sangue periférico e de plasma (Darlev *et al.*, 2016);

1.2.4.1 Modo de aquisição

Dependendo das propriedades da amostra, os espectros podem ser adquiridos nas seguintes três configurações básicas: transmissão, reflexão-absorção ou reflexão total atenuada (RTA). O primeiro opera por detecção da radiação transmitida através de amostra, enquanto que na reflexão-absorção a radiação interage com a amostra e é refletida de volta, sendo parte dela também absorvida pela amostra. Finalmente, no modo RTA, a amostra é colocada em contato com um cristal com um índice de refração maior do que a amostra, induzindo reflexão interna total da radiação incidente, que é atenuada e penetra na amostra como uma onda evanescente (Lima, 2015). Na reflexão-absorção, as lâminas de baixa emissividade, normalmente usadas como substratos refletivos, contribuem para a formação de uma onda estacionária perpendicular à superfície da amostra que origina mudanças espectrais não relacionadas com as propriedades bioquímicas da amostra. No modo de transmissão, os espectros recolhidos são submetidos a uma variedade de efeitos físicos ocorrendo ao mesmo tempo com a absorção e requer correções para fenômenos, como dispersão de luz, refração, dispersão e outros efeitos óticos especificamente relacionados com a análise de filmes finos. O modo de amostragem RTA apresenta geralmente uma alta relação sinal-ruído (RSR) em comparação com as obtidas pelas configurações de reflexão-absorção e transmissão (Russo, 2017). No entanto, para amostras diluídas, a RSR também pode ser baixa. Neste trabalho foi utilizado o modo de transmissão, por ser o mais adequado para o tipo de amostras utilizadas (filmes desidratados), também devido à sua capacidade de ser analisada em modo de elevado débito (isto é, de *high-throughput*).

1.2.4.2 Métodos de Pré-processamento

A aplicação de técnicas de pré-processamento é um passo muito importante na análise de dados espectrais, pois permite a eliminação de fenômenos físicos devido a variações indesejáveis, como ruído e diferenças ao longo da espessura. Este procedimento tem como objetivo minimizar as informações irrelevantes presentes nos espectros finais (Russo, 2017). Neste estudo foram avaliados vários métodos de pré-processamento espectral como correção da linha de base, normalização, primeira e segunda derivada.

Correção da linha de base

O tipo de algoritmo utilizado para correção da linha de base depende do tipo de sinal em si e do que se pretende. Os espectros que são deslocados de zero por um valor constante são os casos mais simples, uma vez que subtrair o valor em questão do espectro é geralmente suficiente. Para os casos mais complexos, em que os dados estão afastados da linha de base por uma inclinação, ou mesmo por uma curvatura, utilizam-se funções de correção como funções lineares ou polinomiais. A principal dificuldade da correção da linha de base, é assim encontrar a função adequada a este ajuste, existindo atualmente bons algoritmos para este fim (Smith, 2011).

Normalização

A normalização utilizada foi a *maximum normalization* cujo objetivo é minimizar o efeito da quantidade da amostra no espectro obtido. Geralmente, a banda Amida I, $\sim 1650 \text{ cm}^{-1}$, é usada para normalizar os espectros (Smith, 2011). Outro método de normalização é a variação normal padrão (SNV, do inglês, *Standard Normal Variate*), que considera que nem todos os dados espectrais contribuem igualmente para o processo de normalização. O SNV calcula o desvio padrão de todos os dados de um espectro, em que posteriormente, todos os dados são normalizados por este valor. Esse processo de normalização é ponderado para considerar os valores que se desviam mais do valor do desvio padrão do que os valores próximos ao mesmo (Pereira, 2018).

1ª e 2ª Derivadas

As derivadas são usadas para aumentar a resolução de bandas sobrepostas. Normalmente, somente a primeira e segunda derivada são avaliadas em dados de espectroscopia FTIR. A primeira e a segunda derivada podem assim ser úteis para destacar diferenças subtis entre os espectros, permitindo extrair mais informação dos dados espectrais. No entanto, antes de se aplicarem derivadas, é importante ter em conta que as derivadas dos espectros irão apresentar mais ruído do que o espectro original. Desta forma, a primeira e segunda derivada apenas devem ser aplicadas a dados espectrais com alta RSR (Rosa, 2014). De forma a minimizar a ampliação de ruído, antes de se aplicarem as derivadas aplicam-se filtros a, sendo o mais conhecido NIPALS, tendo-se usado 11 pontos com um polinómio de 2º grau no método de Savitzky-Golay.

1.2.4.3 Análise de componentes principais

A análise de componente principais é uma técnica multivariada de análise de dados. A técnica foi inicialmente descrita por Pearson (1901), sendo a sua adaptação para métodos computacionais práticos introduzidos por Hotelling (1933, 1936). Esta técnica estatística transforma linearmente um conjunto original de variáveis, inicialmente correlacionadas entre si, num conjunto substancialmente menor de variáveis não correlacionadas que contém a maior parte da informação do conjunto original. É a técnica multivariada mais utilizada e está associada à ideia de redução de dimensão, com a menor perda possível de informação. Procura-se deste modo redistribuir a variação observada nos eixos originais de forma a ser obtido um conjunto de eixos ortogonais não correlacionados (Hongyu, *et al.* 2015).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Equipamentos Gerais

- Espectrômetro de FTIR (Vértex 80, Bruker) associado a um módulo HTX (Bruker);
- Bomba de vácuo (Vacum Brand M2);
- Estufa (MIR-162, Sanyo);
- Vórtex Mix20, Falc);
- Centrífuga (Mikro com rotor 1195/L ambos da Hettich Zentrifugen)
- Microplacas de 96 poços de silício (Bruker);
- Balança (AB204-S, Metler Toledo).

Soluções:

- Cloreto de sódio (SIGMA) 0,9% (p/v);
- Tampão de fosfato 10mM pH 7,4 (PBS);

2.2 Amostras biológicas

Para o trabalho de otimização de processamento de sangue, utilizou-se sangue periférico de dois doadores saudáveis com o anticoagulante ácido etilendiamino tetra-acético (EDTA, do inglês *Ethylenediamine tetraacetic acid*) e mantido congelado a -20°C .

Para o restante trabalho utilizou-se sangue (com EDTA) e soro mantidos a -20°C de 92 participantes num ensaio clínico, tal como descrito em Ladeira *et al.*, 2014, sendo respeitado as boas condutas éticas de manipulação de amostras biológicas humanas. Foram considerados 46 trabalhadores em hospitais eventualmente expostos ao citostático 5-FU, sendo estes, 27 enfermeiros, 11 técnicos de farmácia, 6 farmacêuticos e 2 auxiliares. Esta amostra, que engloba participantes expostos a citostáticos, foi referida como **grupo de CASOS**. Os restantes 46 participantes não eram profissionais hospitalares, eram elementos de uma escola. Sem exposição a citostáticos, sendo designados como **grupo de CONTROLOS**.

2.3 Aquisição dos espectros FTIR

Transferiu-se $25\mu\text{L}$ das amostras de sangue, soro ou extratos de metanol de sangue para placas de silício de 96 poços. Deixou-se sempre o primeiro poço (A1) da placa de Si sem amostra, de forma a obter-se um espectro de referência do ar. Cada amostra, exceto se dito algo em contrário, foi analisada em triplicado, ou seja, colocou-se em 3 poços independentes da microplaca $25\mu\text{L}$ de amostra. Desidrataram-se as amostras por colocação das placas num exsiccador em vácuo durante cerca de 2h:30 minuto. Os espectros foram subsequentemente adquiridos utilizando-se um espectrômetro FTIR (Bruker, HTS-XT) com um acessório HTS em modo de transmissão. Cada espectro resulta da média de 40 espectros entre 400 e 4000 cm^{-1} com uma resolução de 2 cm^{-1} . Os espectros foram manipulados com o *software* OPUS 6.5 (Bruker). A análise multivariada foi realizada pelo *software* The Unscrambler[®] X, versão 10.4, 64-bit (CAMO Software).

2.4 Otimização do processamento de sangue

Utilizou-se sangue periférico de dois doadores saudáveis, com o anticoagulante EDTA e mantido a -20°C. No processo de otimização do processamento de sangue total, de forma a obter-se um espectro de FTIR com elevada razão sinal/ruído, estudou-se o efeito:

- Da centrifugação do sangue;
- Do grau de diluição do sangue;
- Do meio da diluição.

Realizaram-se os seguintes procedimentos:

Procedimento I: Descongelou-se o sangue a temperatura ambiente colocou-se num eppendorfe, foi feito o vortex e efetuou-se uma diluição triplicado a 1/8, 1/10, 1/15 e 1/20, e seguida foi feito a centrifugação do sangue a 300 rpm, durante 15 min. a 20°C. Dilui-se o sobrenadante em PBS.

Procedimento II: Descongelou-se o sangue a temperatura ambiente colocou-se num eppendorfe, foi feito o vortex e efetuou-se uma diluição triplicado a 1/10, 1/20 e 1/40 em NaCl.

Procedimento III: Descongelou-se o sangue a temperatura ambiente colocou-se num eppendorfe, foi feito o vortex e efetuou-se uma diluição quintuplicado a 1/10, 1/20 e 1/40 em PBS e em NaCl.

Após os procedimentos de I a III, (ou seja, após centrifugações ou não e após diluição) as amostras de sangue foram analisadas em triplicado (exceto se dito algo em contrario) por espectroscopia de FTIR.

2.5 PESQUISA DE BIOMARCADORES EM SANGUE

Descongelou-se o sangue à temperatura ambiente, foi feito vortex e efetuou-se uma diluição a 1/10 em NaCl (0,9%, p/v), para tal num eppendorfe, adicionou-se a 14µL de sangue, 126µL de NaCl (0,9%, p/v). Foram feitas diluições seriadas a partir desta (1/10) de 1/20 e 1/40 em solução de NaCl (0,9%, p/v). Foram efetuadas análises de espectroscopia FTIR em triplicado para cada diluição.

2.6 PESQUISA DE BIOMARCADORES EM SORO

Descongelou-se o soro à temperatura ambiente, foi feito vortex e colocou-se num eppendorfe 35µL do soro a 105µL de uma solução de NaCl. Efetuou-se uma diluição seriada a partir desta (1/4) para 1/8. Efetuou-se este procedimento em triplicado para cada amostra de soro.

2.7 PESQUISA DE BIOMARCADORES EM EXTRATOS DE METANOL DE SANGUE

Descongelou-se o sangue a temperatura ambiente, foi feito o vortex. Num eppendorfe foi colocado 150µL de sangue a 225µL do metanol frio fez-se um vortex durante 30 segundos e deixou-se 10 minutos na bancada a temperatura ambiente, depois foi feito uma centrifugação a 14000 rpm durante 10 min a 4°C. Após isto foi retirado 112,5µL de sobrenadante e juntou-se a 112,5µL de solução de NaCl (0,9%). Foram efetuadas análises de espectroscopia FTIR em triplicado para cada amostra.

3 RESULTADO E DISCUSSÃO

De forma a procurar biomarcadores de genotoxicidade no sangue, através de espectroscopia de FTIR, consideraram-se amostras de sangue de 92 pessoas, 46 eventualmente expostas a 5-FU em ambiente hospitalar e 46 não expostas a este ambiente. As principais características destes participantes estão descritas no capítulo 3.1.

As amostras dos 92 participantes foram mantidas congeladas (a -20°C) em EDTA. A congelação de sangue total sem qualquer agente crioprotector implica a disrupção de células como eritrócitos e leucócitos, inviabilizando a separação do soro ou do plasma das células após a descongelação da amostra. Apenas para 58 amostras de sangue é que antes destas serem congeladas, se efetuou a separação de soro sendo estas pertencentes a 23 casos e a 35 controlos.

Em relação às amostras de sangue congeladas foi necessário efetuar a otimização do processamento de sangue antes da análise por espectroscopia de FTIR de forma a obterem-se espectros com uma boa razão sinal/ruído. Para tal, avaliou-se o efeito da centrifugação do sangue e da sua diluição em soluções de NaCl ou de PBS (Capítulo 3.2). Foi também avaliada a possibilidade de extração de substâncias do sangue utilizando-se metanol. A pesquisa de biomarcadores de amostras de sangue, soro e de extratos de metanol foi baseada num método de espectroscopia de FTIR, tal como apresentado e discutido nos capítulos 3.3, 3.4 e 3.5, respetivamente.

3.1 DESCRIÇÃO DOS PARTICIPANTES NO ESTUDO

Em relação aos 92 participantes no estudo, contemplaram-se 46 trabalhadores em hospitais eventualmente expostos ao citostático 5-FU, sendo estes 27 enfermeiros, 11 técnicos de farmácia, 6 farmacêuticos e 2 auxiliares. Esta amostra, que engloba participantes expostos a citotóxicos, foi referida como **grupo de CASOS**. Os restantes 46 participantes não eram profissionais que trabalhassem em ambiente hospitalar e sem exposição a citostáticos, sendo designados como **grupo de CONTROLOS**. A Figura. 3.1.1 representa os valores médios relativos das duas populações de participantes CASOS *versus* CONTROLOS, em relação às características de: Género (houve 87% e 74% de mulheres no grupo de casos e controlos, respetivamente); índice de massa corporal (BMI, do inglês *body mass index*), se era fumador, respetiva carga tabágica e se consumia álcool. A título de exemplo a Figura 3.1.2 apresenta os gráficos de bigodes dos dados da amostra de algumas destas características. Por análise *T-student* das variáveis acima referidas, observou-se que apenas a idade e a carga tabágica são estatisticamente diferentes a um nível de significância de 5% entre as populações de Casos e Controlos (Tabela 3.1.1).

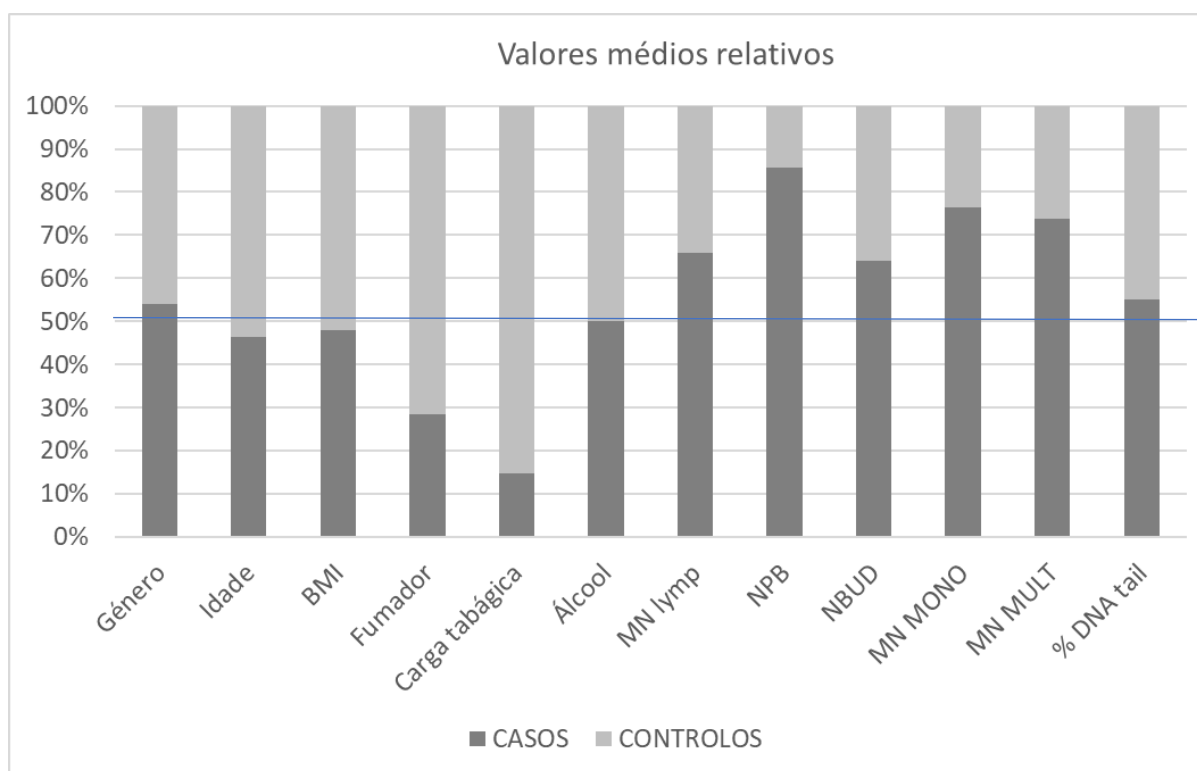


Fig. 3.1.1 Valores médios relativos das duas populações de participantes CASOS *versus* CONTROLOS, em relação às características de: Género, BMI, se era fumador e respetiva carga tabágica e se consumia álcool, o número de micronúcleos em linfócitos (MN Lymp), células mononucleadas (MN Mono) e multinucleadas (MN Mult), respetivamente, o número de pontes nucleoplasmática (NPB) de pontes protusões nucleares (NBUD) e a percentagem de dano no DNA (% DNA Tail) em linfócitos.

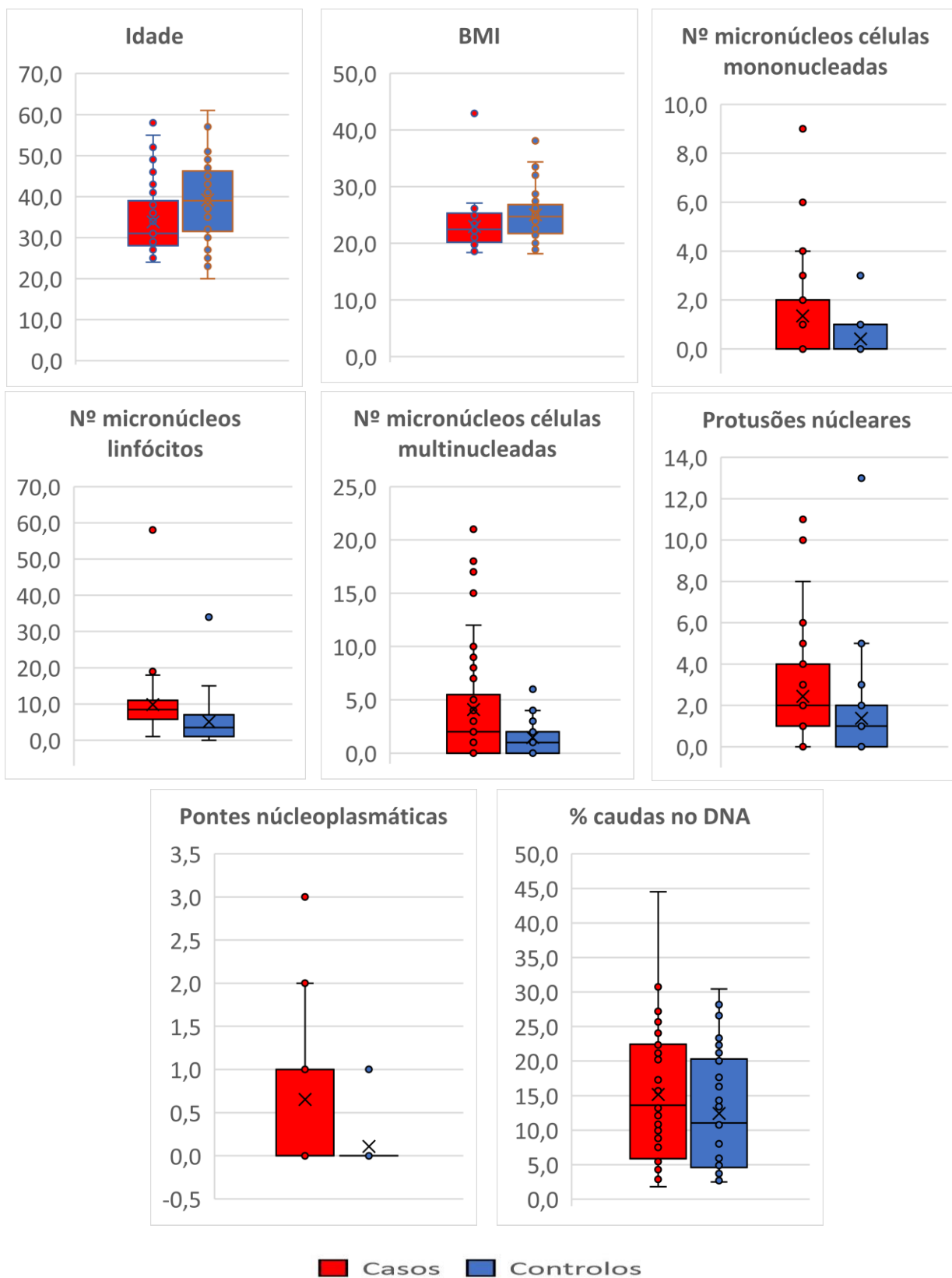


Fig. 3.1.2. Gráficos de bigodes relativos a algumas características dos participantes no grupo de Casos e Controlos.

Tabela 3.1.1. Valores médios e respetivos desvios padrão de algumas características da amostra do grupo casos e controlos assim como o *p-value* de testes *T-student* de comparação das médias populacionais de casos e controlos. O *p-value* da análise de *T-student* inferior a 0,05 estão realçados a negrito e a amarelo.

	CASOS		CONTROLOS		<i>P-value</i> da análise de <i>t-student</i>
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	
Género (Feminino)	87%	34%	74%	44%	0,1173
Idade	34,8	8,2	39,2	9,6	0,0053
Índice de massa corporal (BMI)	22,9	3,9	25,0	4,4	0,0211
Fumador	0,08	0,28	0,22	0,42	0,0837
Carga Tabágica	0,39	1,49	2,23	5,01	0,0202
Álcool	0,26	0,44	0,26	0,44	1,000
Tempo de exposição a citostáticos (anos)	6,62	6,40	-	-	-
Número de micronúcleos em linfócitos (MN Lymp)	9,82	8,65	5,09	6,00	0,0031
Número de micronúcleos em células mononucleadas (MN Mono)	1,35	2,15	0,41	0,71	0,0071
Número de micronúcleos em células multinucleadas (MN Mul)	4,09	5,29	1,46	1,47	0,0020
Protusões nucleares (NBUD)	0,65	0,98	0,11	0,31	0,00051
Pontes nucleoplasmáticas (NPB)	2,43	2,50	1,37	2,17	0,0218
Percentagem de dano no DNA (% DNA Tail)	15,2	9,5	12,4	8,4	0,1419

Nestas amostras foram analisadas as seguintes características: o número de micronúcleos em linfócitos, em células binucleadas, mononucleadas e multinucleadas respetivamente, o número de protusões nucleares, de pontes nucleoplasmáticas e o dano no DNA em linfócitos. Observou-se que a média relativa e a mediana de qualquer uma destas características nas amostras de estudo é superior no grupo Casos em relação ao grupo Controlos (Figura 3.1.1, 3.1.2). Observou-se da análise *t-student*, que as médias populacionais destas características, com exceção do género, fumador, álcool e da percentagem de caudas de DNA, são estatisticamente diferentes a uma significância de 5% (Tabela 3.1.1), indicando um potencial dano genotóxicos devido à exposição de 5-FU nas pessoas do grupo Casos, devido à contaminação de superfícies por esta substância de acordo com Ladeira *et al.* (2014).

3.2 Otimização do processamento de sangue

Para otimizar o processamento de sangue para a obtenção de espectros com uma razão sinal/ruído elevada estudou-se o efeito da centrifugação, do grau de diluição e do meio de diluição de sangue periférico humano armazenado a -20°C com EDTA.

Diluiu-se o sangue inicialmente em PBS (**Procedimento I**) de forma a obter-se uma suspensão num meio com uma concentração salina e pH constante. Da análise inicial dos espectros, não se observaram diferenças significativas entre o espectro do sangue centrifugado e não centrifugado, tal como indicado na Figura 3.2.1 de sangue diluído a 1/10 e 1/20.

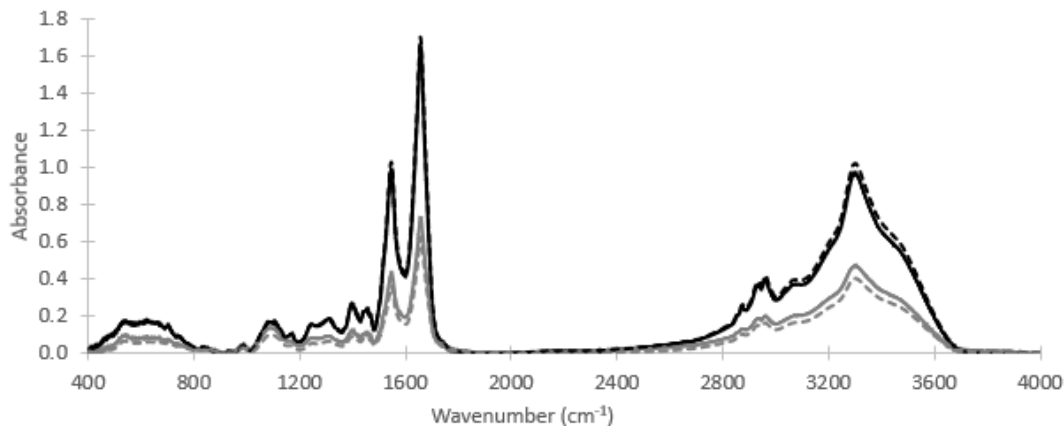


Fig. 3.2.1. Espectro médio de quintuplicados de análises de sangue diluído a 1/10 (linhas pretas) ou 1/20 (linhas cinzentas) em PBS, de sangue não centrifugado (linhas não tracejadas) e centrifugado (linhas tracejadas) a 3000 rpm, durante 15 min. a 20°C .

De forma a melhor analisar o efeito da centrifugação e grau de diluição na razão sinal/ruído do espectro consideraram-se os valores médios de absorvância e respetivos desvios padrão de quintuplicados de análises espectrais. Tendo em conta a resolução de aquisição espectral, considerou-se um total de 3729 absorvância por espectro. Considerou-se o somatório de todas as 3729 médias de absorvância assim como o somatório dos respetivos desvios padrão, coeficientes de variação e razão sinal/ruído de quintuplicados de análises espectrais. De forma a normalizar os valores de somatórios, dividiram-se estes valores pelo número total de absorvância, i.e., por 3729. De acordo com o esperado, à medida que o grau de diluição aumenta, o somatório das médias de absorvância normalizado diminui (Figura 3.2.2). Em 3 das 4 diluições estudadas, o somatório do desvio padrão normalizado do sangue não centrifugado foi igual ou inferior ao do sangue centrifugado. A diluição 1/20 foi a que apresentou um menor desvio padrão, independentemente da centrifugação do sangue. No entanto, como à medida que a diluição aumenta, os valores de absorvância diminuem, pode acontecer que o erro percentual em relação ao sinal diminua. No entanto, o coeficiente de variação foi, regra geral, menor para as diluições com sangue não centrifugado, obtendo-se o valor mais reduzido para a maior diluição de 1/20. Por consequência a razão sinal/ruído obtida como o inverso do coeficiente de variação, apresenta um máximo para a diluição 1/20 independentemente da centrifugação do sangue.

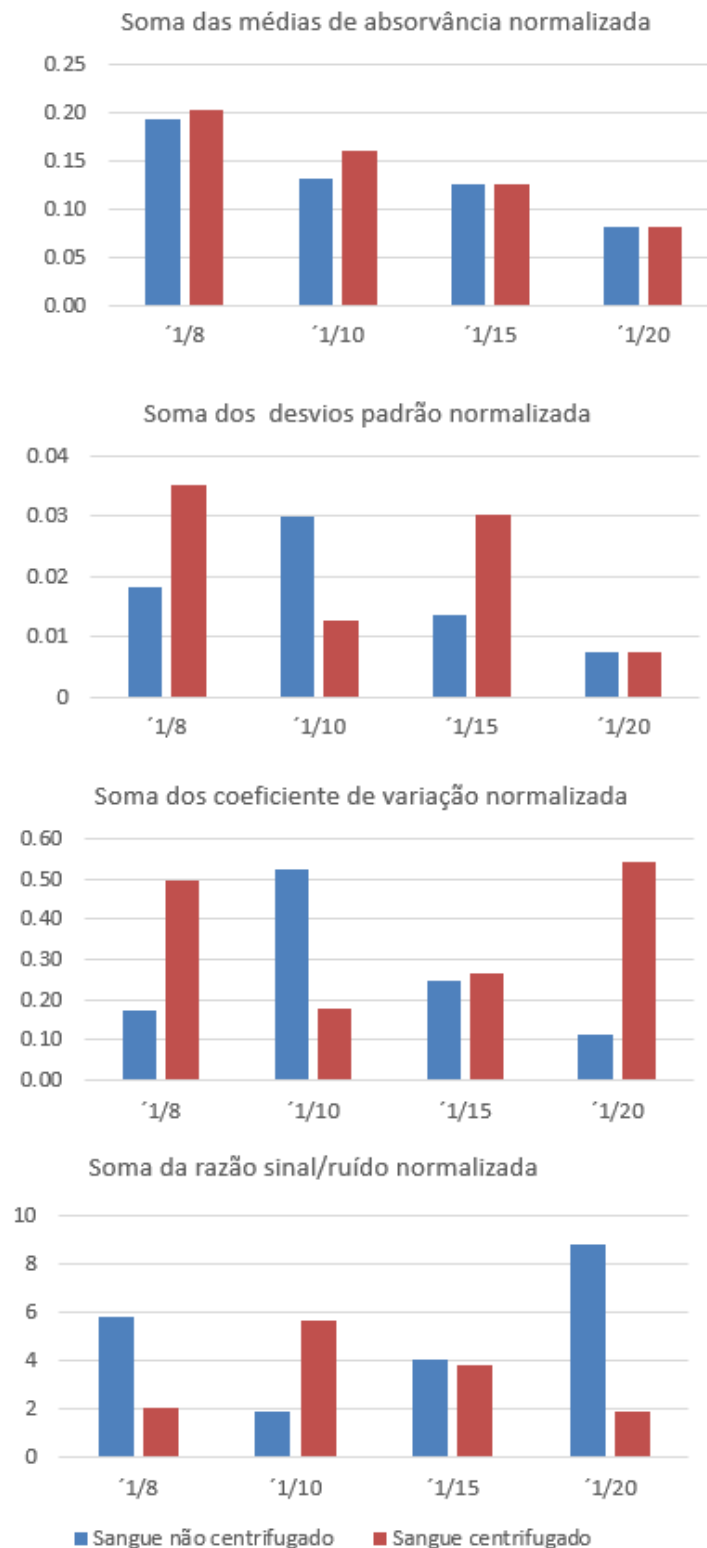


Fig. 3.2.2. Somas das médias de absorvância e desvios padrão das 3729 leituras de absorvância espectrais e respectivos coeficientes de variação e sinal/ruído médios, divididos (i.e. normalizados) por 3729, obtidas de quintuplicados de análises de sangue do 1º dador não centrifugado (colunas a azul) e centrifugado (colunas a vermelho) e diluído a 1/8, 1/10, 1/15 e 1/20 em PBS.

Todas estas observações indicam que a centrifugação do sangue pode implicar uma variabilidade no espectro em relação ao espectro obtido de sangue não centrifugado, sendo essa variabilidade minimizada para graus de diluição elevados como de 1/20. Por consequência, nas experiências subsequentes utilizou-se sempre sangue não centrifugado.

No ponto seguinte (**Procedimento II**) avaliou-se o efeito do grau de diluição em NaCl (0,9%, p/v) a diluições de sangue de 1/10, 1/20 e 1/40 (Figura 3.2.3). Observou-se, como esperado, que à medida que o grau de diluição aumenta, o somatório das médias de absorvância diminui e o coeficiente de variação diminui ligeiramente da diluição 1/10 para 1/20, mas aumenta significativamente para a diluição 1/40, indicando o grau de diluição ótimo de 1/20, a que correspondeu uma razão sinal/ruído de 2.

De forma a se comparar melhor o efeito do meio de diluição (NaCl *versus* PBS) e o grau de diluição, efetuaram-se novas diluições, (**Procedimento III**) desta vez em pentaplicados de sangue não centrifugado de um novo dador. Por curiosidade, o sangue deste dador revelou valores de absorvância para o sangue diluído em PBS superiores aos observados para o dador representado na Figura 3.2.4. Observou-se que os valores de absorvância para o sangue diluído em PBS são sempre superiores em relação aos do sangue diluído em NaCl, sendo que à medida que o grau de diluição aumenta, o valor de absorvância diminui. Nos casos de diluições em PBS observou-se uma diminuição do desvio padrão à medida que o grau de diluição aumenta. No entanto, e como o valor global de absorvância diminui com o aumento da diluição, a razão sinal/ruído em PBS é quase independente do grau de diluição. Observou-se que a diluição em NaCl, apesar de implicar valores de absorvância inferiores do que em PBS, implicou desvios padrão menores e por consequência razões sinal/ruído superiores em relação à diluição em PBS. Isto foi observado em todas as quatro diluições avaliadas. É de realçar que a maior razão sinal/ruído foi obtida para sangue diluído em NaCl a 1/20. Com base nas observações efetuadas nas análises subsequentes efetuaram-se sempre as diluições em NaCl.

Os valores sinal/ruído dependeram do dador de sangue, sendo que para as diluições em PBS a 1/10 e 1/20 de sangue não centrifugado obtiveram-se razões sinal/ruído para o 1º dador de cerca de 2 e 9, respetivamente, enquanto que para o 2º dador se obteve sempre de 2. No casos das diluições em NaCl a 1/10 e 1/20 de sangue não centrifugado, obteve-se razões sinal/ruído para o 1º dador de cerca de 2 e para o 2º dador de 3 e 9, respetivamente. Desta forma optou-se por efetuar as diluições de 1/10, 1/20 e 1/40 em NaCl antes da aquisição espectral, para as amostras de sangue dos pacientes.

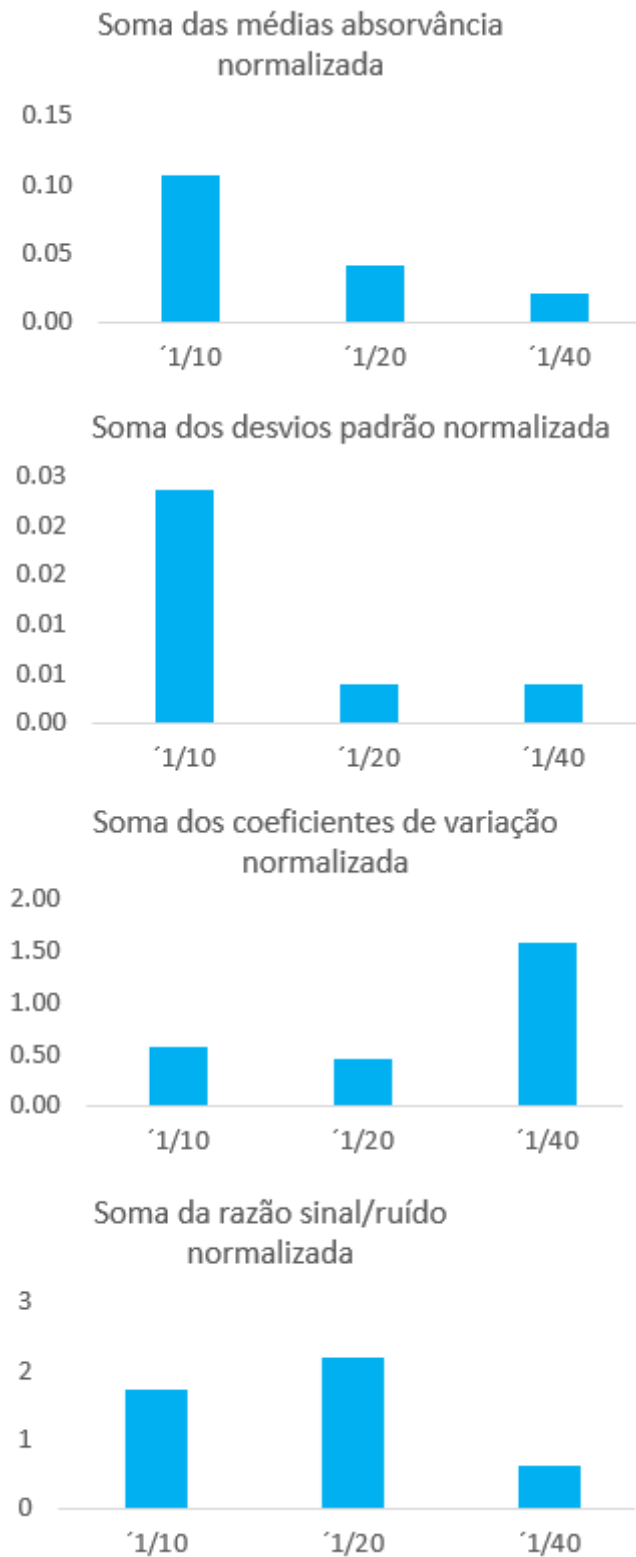


Fig. 3.2.3 - Somas das médias de absorvância e desvios padrão das 3729 leituras de absorvância espectrais e respectivos coeficientes de variação e sinal/ruído médios, divididos (i.e. normalizados) por 3729, obtidas de quintuplicados de análises de sangue não centrifugado do 1º dador e diluído a 1/10, 1/20 e 1/40 em NaCl.

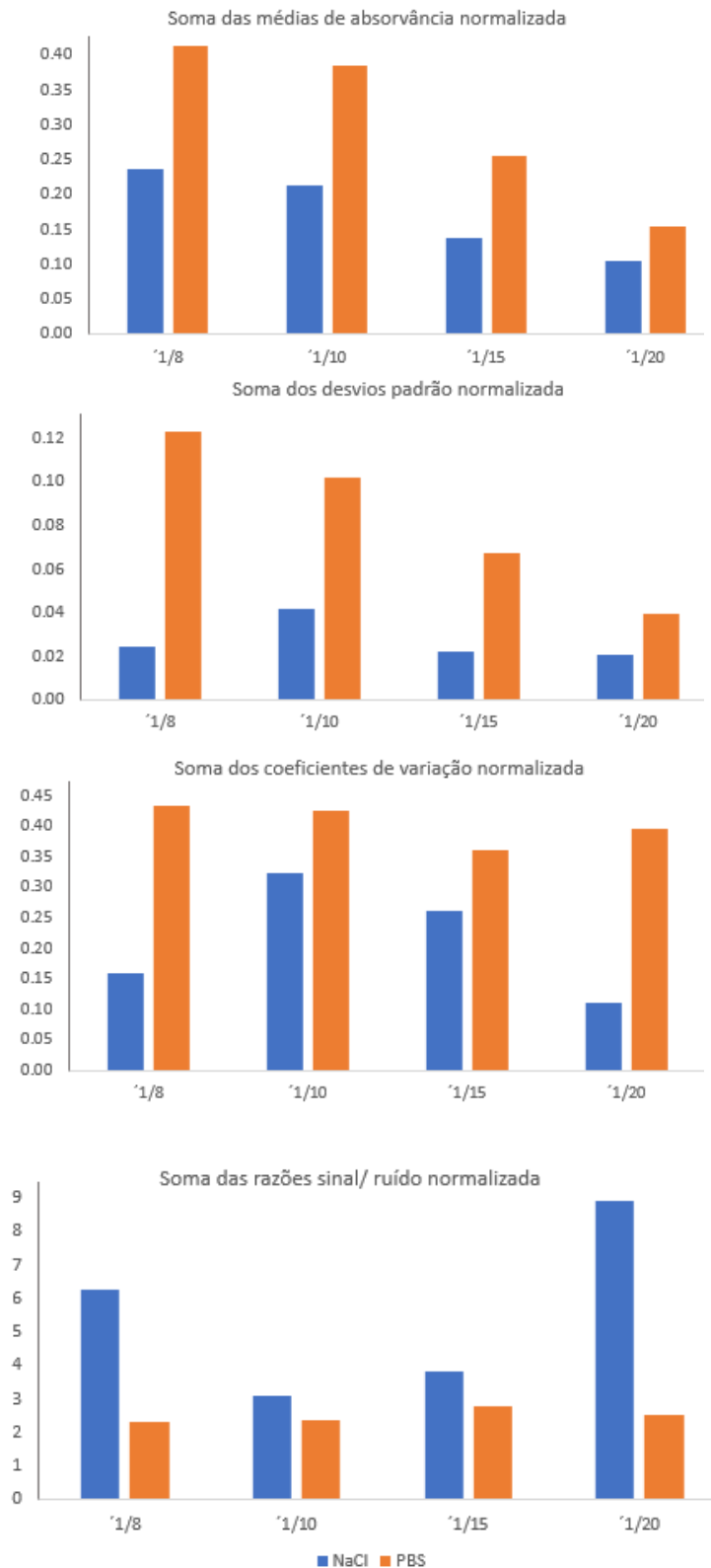


Fig. 3.2.4. Somas das médias de absorvância e desvios padrão das 3729 leituras de absorvância espectrais e respectivos coeficientes de variação e sinal/ruído médios, divididos (i.e. normalizados) por 3729, obtidas de pentaplicados de análises de sangue não centrifugado do 2º dador e diluído em NaCl (colunas a azul) ou PBS (colunas a laranja) a 1/8, 1/10, 1/15 ou 1/20.

3.3 Pesquisa de Biomarcadores em sangue

3.3.1 Análise de componentes principais

A variabilidade intrínseca de amostras biológicas juntamente com a elevada dimensão de dados obtidos a partir dos espectros de FTIR, tornam a análise dos dados de espectroscopia num processo complexo. A PCA, constitui uma forma simples de redução de dimensões dos dados, permitindo a análise geralmente em gráficos 2D ou 3D dos componentes principais (PC, do inglês *Principal Components*). Uma PCA converte um conjunto de variáveis correlacionadas num novo conjunto de variáveis não correlacionadas, chamadas PC. Cada PC contribui para a variância total do conjunto de dados sendo ordenados de acordo com a sua contribuição mais alta para a variância total. Nos gráficos de PCA, quanto mais próximas as amostras estão uma da outra, mais características comuns existem entre elas. A Figura 3.3.1 representa os espectros e a respetiva PCA de espectros de sangue total de 92 participantes diluído a 1/10, 1/20 e 1/40, respetivamente. Observou-se, como seria de esperar, que à medida que o grau de diluição aumenta, o valor de absorvância diminui, sendo que os dados no gráfico de PCA estão cada vez mais próximos uns dos outros, indicando um valor aparente ideal de diluição de sangue de 1/40.

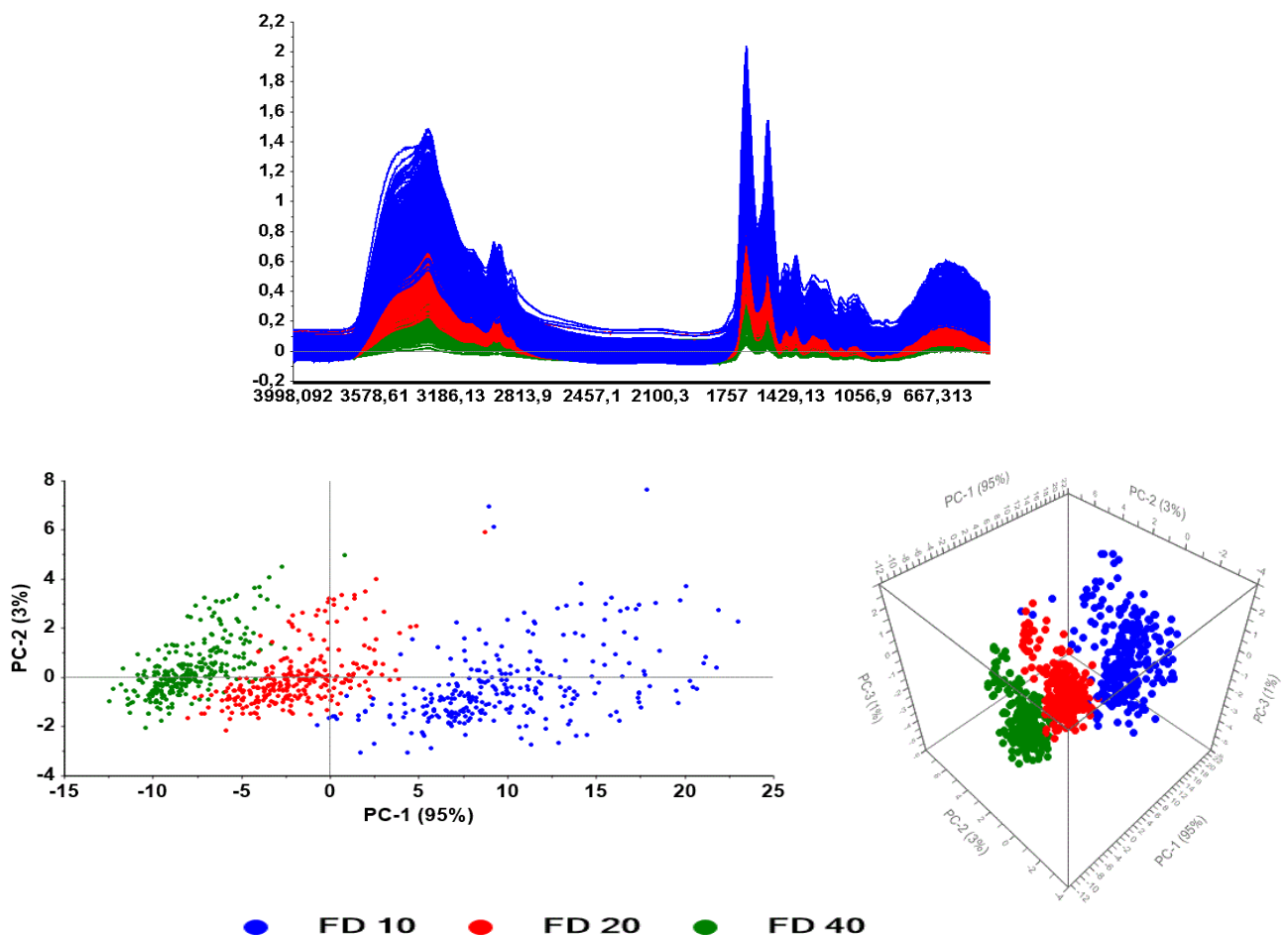


Fig. 3.3.1 - Espectros de FTIR sem pré-processamento de sangue total de 92 pessoas diluído em NaCl 0,9% a 1/10, 1/20 e 1/40 e respetivos gráficos da PCA. Cada diluição foi efetuada em triplicado

De forma a melhor compreender o efeito da diluição na qualidade do espectro, efetuaram-se novas PCA, efetuando-se análises independentes para cada um dos fatores de diluição das amostras de sangue, e considerando-se espectros:

- Sem pré-processamento;
- Com correção da linha de base e com normalização à amida II;
- 1ª derivada;
- 2ª derivada.

Da análise dos gráficos da PCA (Figura 3.3.2), de espectros de amostras de sangue diluídas a 1/10, observou-se que a melhor separação entre as amostras de Casos e Controlos foi obtida na representação PC1 vs. PC2 da 1ª derivada dos espectros. Para amostras diluídas a 1/20 a melhor separação foi obtida na representação PC2 vs. PC3 com espectros com correção de linha de base e normalização. Para a diluição de 1/40 a melhor separação foi obtida na representação PC1 vs. PC3 com a 2ª derivada dos espectros. A Figura 3.4.3, representa os gráficos 2D da PCA de 1ª derivada de espectros de amostras de sangue diluídos a 1/10, da correção de linha da base 1/20 e de 2ª derivada 1/40, observando-se de novo que a melhor separação entre as amostras de Casos e Controlos é com sangue diluído a 1/40.

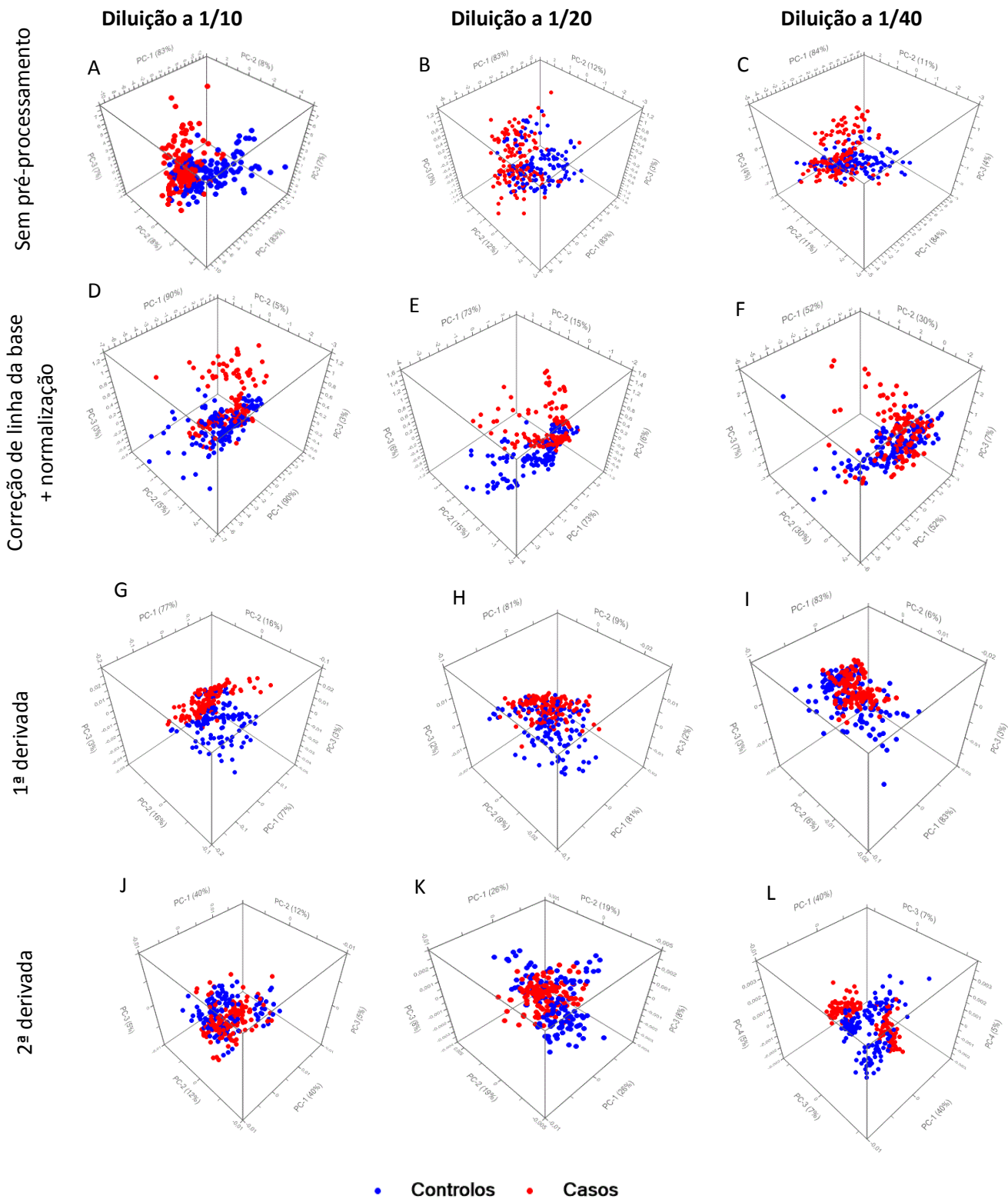


Fig. 3.3.2. PCA de espectros de amostras de sangue diluídas a 1/10 (A, D, G e J), 1/20 (B, E, H e K) e 1/40 (C, F, I e L) de pacientes do grupo Casos (vermelho) e Controlos (azul). Na análise considerou-se espectros sem pré-processamento e com pré-processamento por correção da linha de base e com normalização (à banda da amida II), 1ª e 2ª derivada.

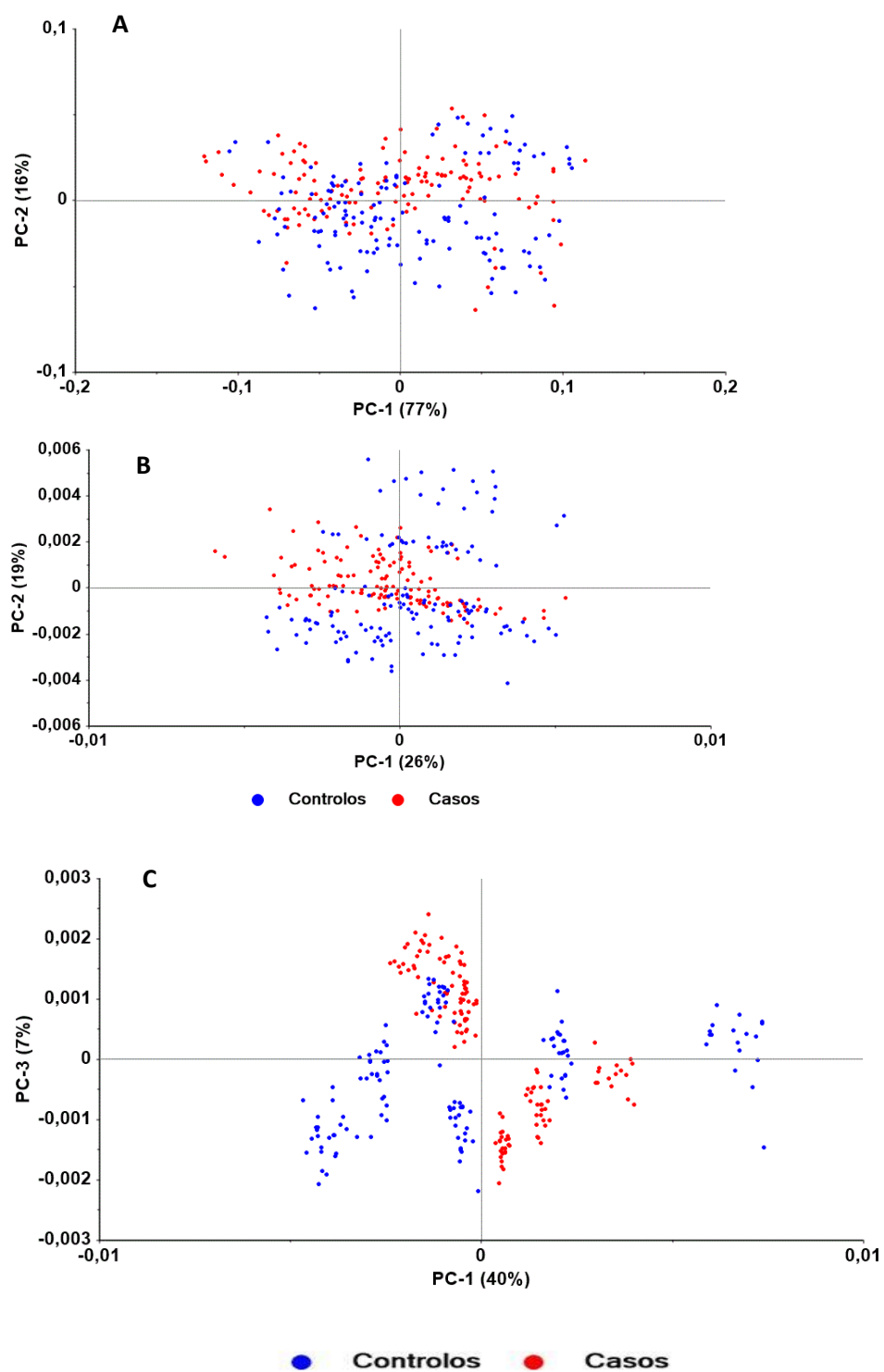


Fig.3.3.3 - PCA de 1ª derivada de espectros de sangue diluídos a 1/10 (A), de espectros com correção de linha da base e normalização de sangue diluído a 1/20 (B) e de 2ª derivada de espectros de sangue diluído 1/40 (C) de Casos (vermelho) e dos Controlos (azul).

3.3.2 Análise de Razões de Bandas Espectrais

Foi avaliado se razões entre diversas bandas do espectro de sangue total dos 46 participantes expostos a 5-FU apresentavam diferenças significativas em relação ao sangue total dos 46 participantes não expostos. A utilização de razões de absorvância em alternativa à análise de valores individuais de absorvância, minimiza diferenças da linha de base ou de outras interferências físicas como fenómenos de difração. Por simplificação, as absorvâncias serão representadas pela letra A, seguida do número de onda a que correspondem. Por exemplo, A1248, irá corresponder à absorvância obtida a 1248cm^{-1} .

De forma a identificar as regiões do espectro que eventualmente apresentam diferenças entre os Casos e Controlos, analisou-se a segunda derivada do espectro médio do sangue do grupo Casos e do grupo Controlos, respetivamente. Observaram-se diferenças entre estes dois grupos nas seguintes regiões espectrais (Figura 3.3.4): A458, A619, A934, A973, A987, A1088, A1105, A1128, A1171, A1549, A1658, A2855, A2872, A2922, A2960, A3298, A3564, A3628.

Determinaram-se as seguintes razões de absorvância do espectro normal, considerando-se as regiões mais próxima identificadas no espectro da 2ª derivada, mas também as indicadas por Rosa et al. (2016): A3628/A3564, A3564/A3298, A3302/A3067, A3302/A2960, A3302/A2930, A3298/A2960, A3067/A2930, A3067/A2892, A2960/A2930, A2960/A2922, A2960/A2892, A2930/A2892, A2930/A2855, A2930/A2872, A2922/A2872, A2872/A2855, A2872/A1658, A2855/A1658, A2871/A1656, A2871/A1547, A2855/A1658, A2852/A1656, A2852/A1547, A1658/A1653, A1658/A1575, A1658/A1557, A1658/A1549, A1658/A1545, A1658/A1520, A1653/A1575, A1656/A1469, A1656/A1547, A1575/A1557, A1575/A1553, A1575/A1549, A1553/A1549, A1553/A1545, A1549/A1171, A1549/A1545, A1549/A1520, A1547/A1469, A1520/A1470, A1470/A1457, A1457/A1418, A1418/A1401, A1401/A1362, A1469/A1171, A1362/A1172, A1240/A1080, A1172/A1156, A1240/A1150, A1171/A1128, A1156/A1108, A1188/A1088, A1128/A1105, A1105/A1088, A1088/A1040, A1080/A1030, A1088/A987, A1033/A1023, A1015/A995, A987/A973, A973/A934, A964/A948, A934/A619, A702/A682, A702/A682, A702/A668, A702/A649, A619/A458

Por forma a avaliar se a média da razão de bandas estatisticamente diferente entre a população Casos e Controlos, efetuou-se um teste *T-student*. A Tabela 3.3.1 representa o *p-value* do teste *T-student* para todas estas razões. Observou-se que um elevado número de razões de absorvância do espectro FTIR das amostras de sangue dos Casos é estatisticamente diferente dos Controlos, a uma significância a 5% e alguns mesmo a 1%. Curiosamente, as razões de absorvância que apresentaram valores estatisticamente diferentes entre a população exposta à substância genotóxica em relação à população não exposta, incluem regiões das principais biomoléculas da célula, como os: lípidos (A2960/A2930, A1470/1457, A1362/A1172), as proteínas (A1549/A1520, A1240/A1080, A3067/A2892, A1658/A1653), os glícidos (A1088/A1040, A1033/A1023) e os ácidos nucleicos (A1080/1030, A1240/1150). Desta forma o método baseado em espectroscopia FTIR pode ser utilizado como biomarcador de efeitos genotóxicos.

A observação efetuada está de acordo com observações de outros investigadores que conseguiram identificar regiões espectrais que discriminavam em PBMC (do inglês *Peripheral blood mononuclear*), biomarcadores de cancro da mama Zelig *et al.* (2015), ou em plasma biomarcadores de cancro de colórectal Barlev *et al.* (2016).

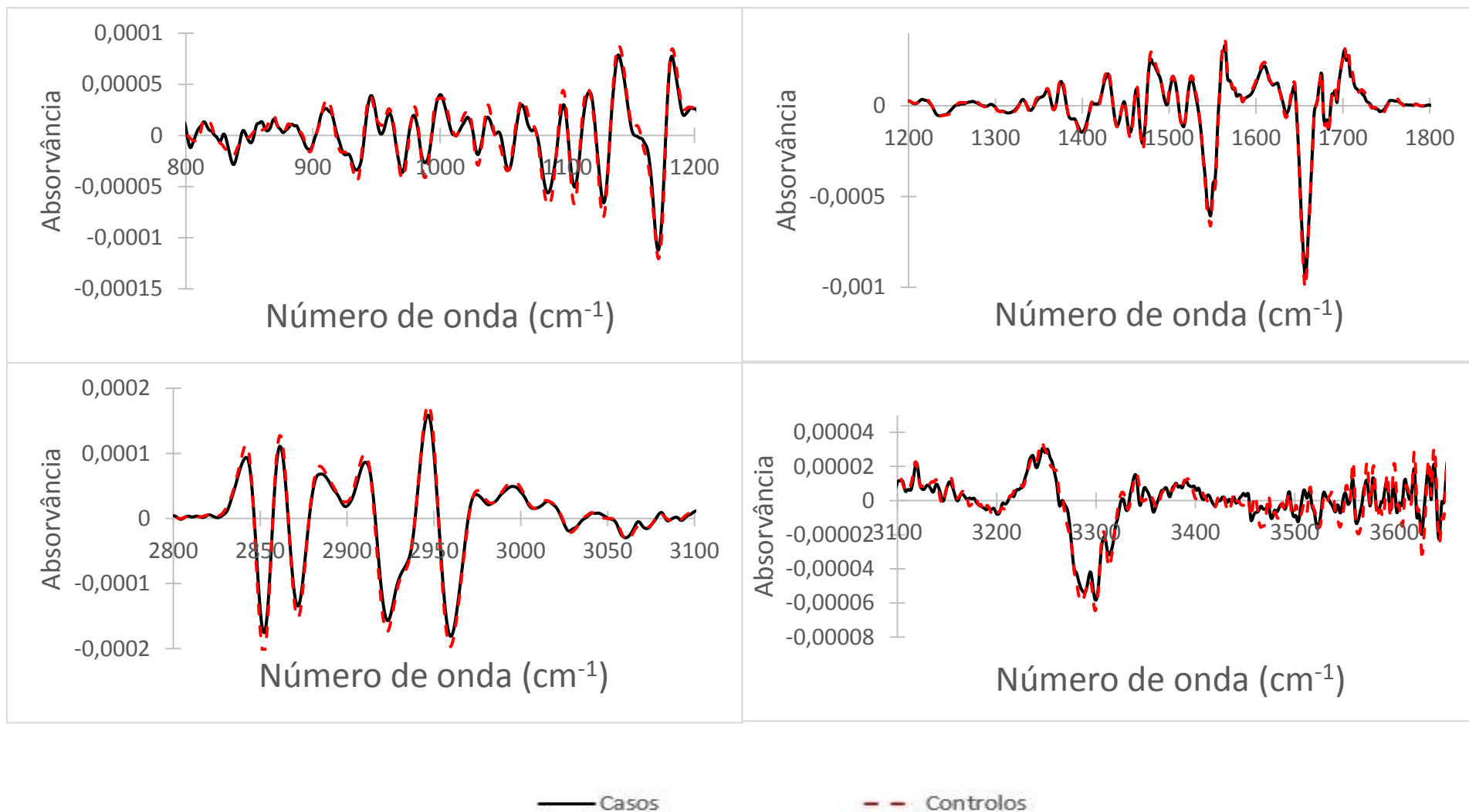


Fig. 3.3.4 - Segunda derivada do espectro médio do sangue dos participantes do grupo Casos (linha contínua a preto) e Controlos (linha a tracejado vermelha), respetivamente.

Tabela 3.3.1 - Valores médios e respetivos desvio padrão de razões espectrais de amostras de sangue diluídas a 1/40 do grupo Casos e Controlos e *p-value* para testes *T-student* de comparação das médias populacionais de Casos e Controlos com uma significância de 5%.

Razões espectrais	CASOS		CONTROLOS		<i>p-value</i> da análise de <i>t-student</i>
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	
A3628/A3564	0,625	0,058	0,571	0,032	1,63E-09
A3564/A3298	0,456	0,038	0,459	0,025	1,85E-03
A3302/A3067	2,178	0,172	2,315	0,137	2,99E-07
A3302/A2960	2,189	0,175	3,337	0,394	4,49E-08
A3302/A2930	1,959	0,128	2,104	0,111	2,06E-13
A3298/A2960	1,936	0,120	2,095	0,089	1,26E-16
A3067/A2930	0,902	0,044	0,910	0,055	1,15E-02
A3067/A2892	1,315	0,059	1,380	0,035	8,68E-15
A2960/A2930	0,897	0,044	0,902	0,056	4,91E-02
A2922/A2872	1,399	0,089	1,462	0,078	8,48E-05
A2960/A2892	1,309	0,057	1,368	0,035	4,53E-13
A2930/A2892	1,462	0,086	1,520	0,073	1,00E-04
A2930/A2855	1,555	0,091	1,622	0,051	1,06E-07
A2930/A2872	1,420	0,082	1,478	0,071	3,07E-05
A2855/A1658	0,234	0,039	0,212	0,023	1,82E-04
A2872/A1658	0,257	0,040	0,233	0,025	2,86E-04
A2855/A1658	0,237	0,040	0,212	0,024	9,83E-05
A1658/A1653	1,010	0,015	0,997	0,010	2,26E-02
A1658/A1575	2,516	0,174	2,391	0,192	4,50E-04
A1658/A1557	1,741	0,069	1,671	0,079	1,81E-05
A1658/A1549	1,491	0,037	1,449	0,044	4,43E-06
A1658/A1520	2,302	0,145	2,258	0,152	9,29E-01
A1549/A1520	1,543	0,067	1,555	0,059	4,33E-03
A1549/A1171	5,508	1,235	4,869	0,743	1,16E-06
A1362/A1172	1,131	0,145	1,087	0,061	7,74E-05
A1240/A1080	1,340	0,190	1,226	0,0817	5,75E-09
A1240/A1150	1,691	0,264	1,518	0,126	2,48E-10
A1171/A1128	1,071	0,063	1,017	0,038	5,81E-10
A1128/A1105	0,887	0,0306	0,909	0,0216	8,34E-06
A1105/A1088	0,963	0,027	0,974	0,0245	1,64E-03
A1088/A1040	1,574	0,230	1,486	0,128	4,54E-06
A1080/A1030	1,732	0,339	1,601	0,163	2,02E-07
A1088/A987	2,984	1,848	2,061	0,4687	2,88E-07
A1033/A1023	1,201	0,126	1,161	0,048	1,02E-05
A1015/A995	1,241	0,303	1,058	0,092	1,17E-05
A973/A934	0,048	0,297	0,103	0,258	1,56E-04
A964/A948	1,260	0,640	1,063	0,044	4,08E-04
A934/A619	1,000	0,019	0,995	0,008	5,02E-08
A702/A682	1,014	0,036	0,990	0,015	6,35E-03
A702/A668	0,920	0,053	0,834	0,038	1,03E-03
A619/A458	1,445	0,525	1,315	0,160	4,25E-02

Das análises dos gráficos de bigodes (figura 3.3.5) observa-se a variação dos valores da razão de bandas da absorvância.

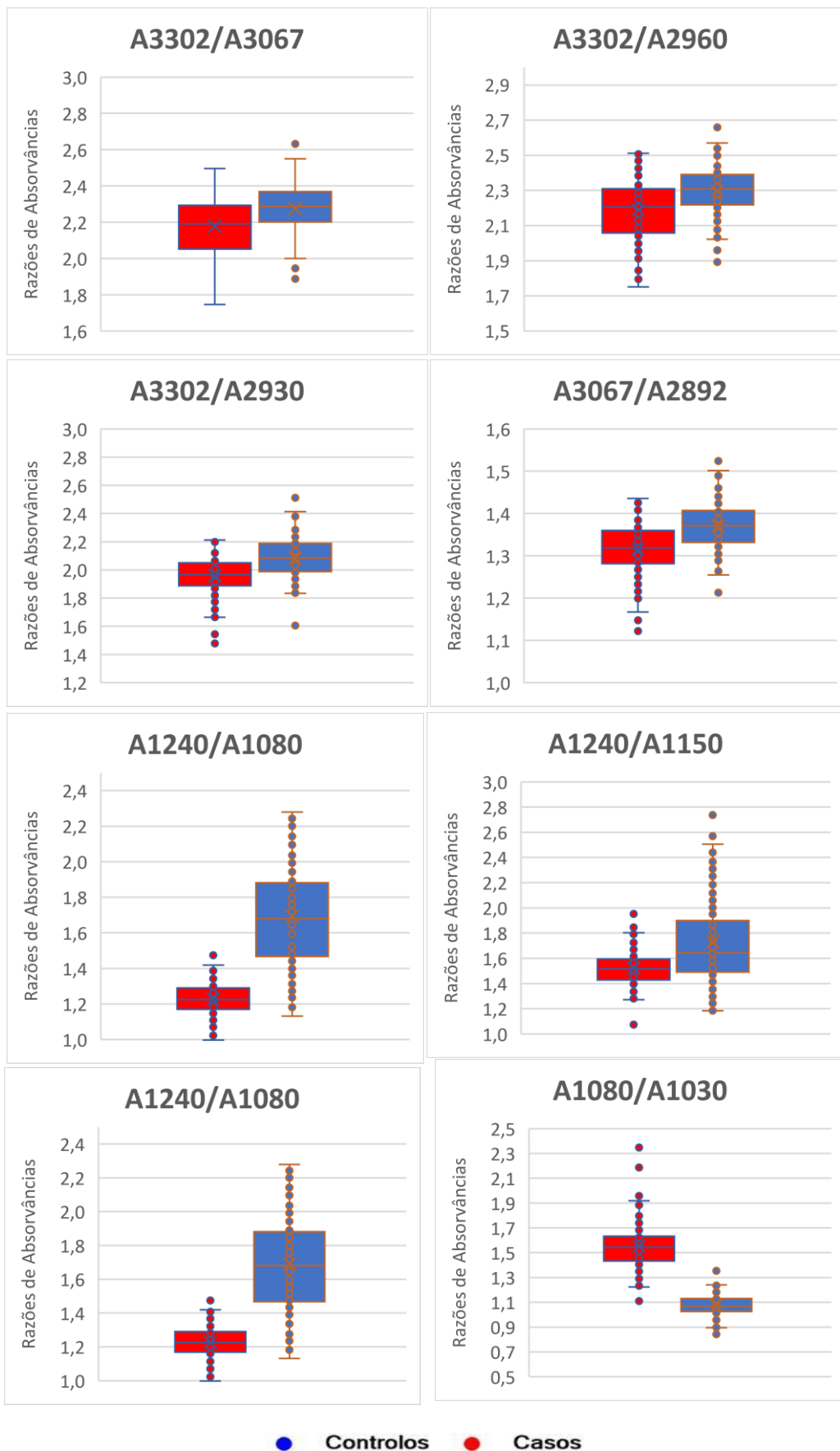


Fig. 3.3.5 Gráficos de bigodes relativos a razões de bandas espectrais de sangue entre o grupo de Casos (vermelho) e Controlos (azul).

3.4 PESQUISA DE BIOMARCADORES EM SORO

3.4.1 Análise de Componentes Principais

A Figura 3.4.1 representa os espectros e respectivos PCA obtidos de soro diluído a 1/4 e 1/8, respetivamente, disponível de 58 participantes, sendo 23 amostras de Casos e 35 de Controlos. Observou-se, como seria de esperar, que as amostras com maior diluição, implicam valores de absorvância inferiores. Observou-se que os valores no gráfico de PCA estavam mais dispersos para o grau de diluição 1/4 em relação a 1/8. Nas análises subsequentes consideraram-se as amostras de soro diluídas a 1/8, quer devido ao menor grau de dispersão das amostras no gráfico de PCA, quer devido às amostras diluídas a 1/4 apresentarem valores de absorvância superiores a 1.

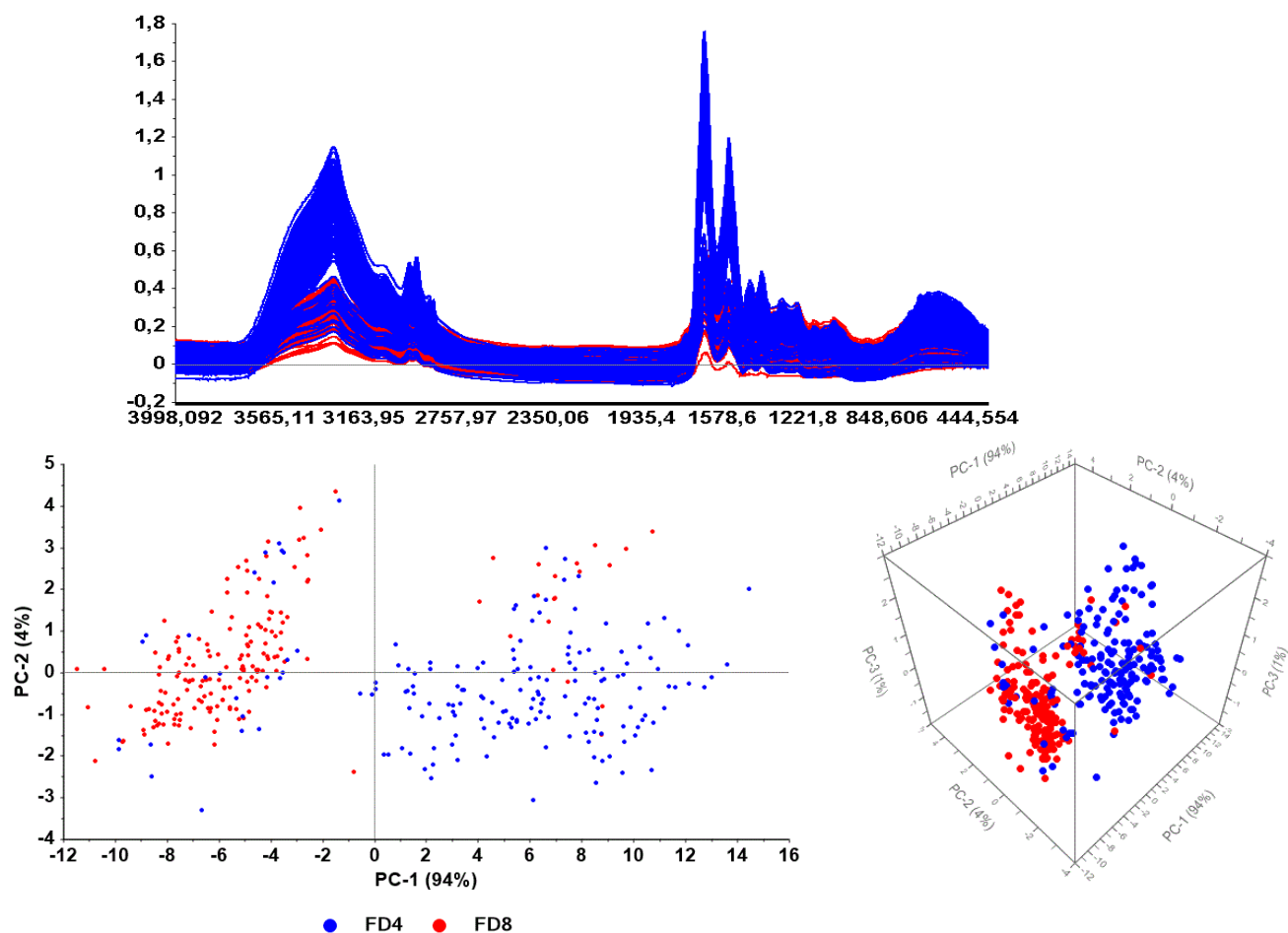


Fig. 3.4.1 - Espectros FTIR do soro de 58 pessoas diluídas em NaCl 0,9% a 1/4 e 1/8 e respetivos gráficos de PCA. Cada diluição foi efetuada em triplicado.

Avaliaram-se os seguintes pré-processamento de espectros de amostras de soro diluídas a 1/8, na separação entre Casos e Controlos nos gráficos de PCA:

- Sem pré-processamento;
- Correção de linha de base com normalização à amida II;
- 1ª derivada;
- 2ª derivada.

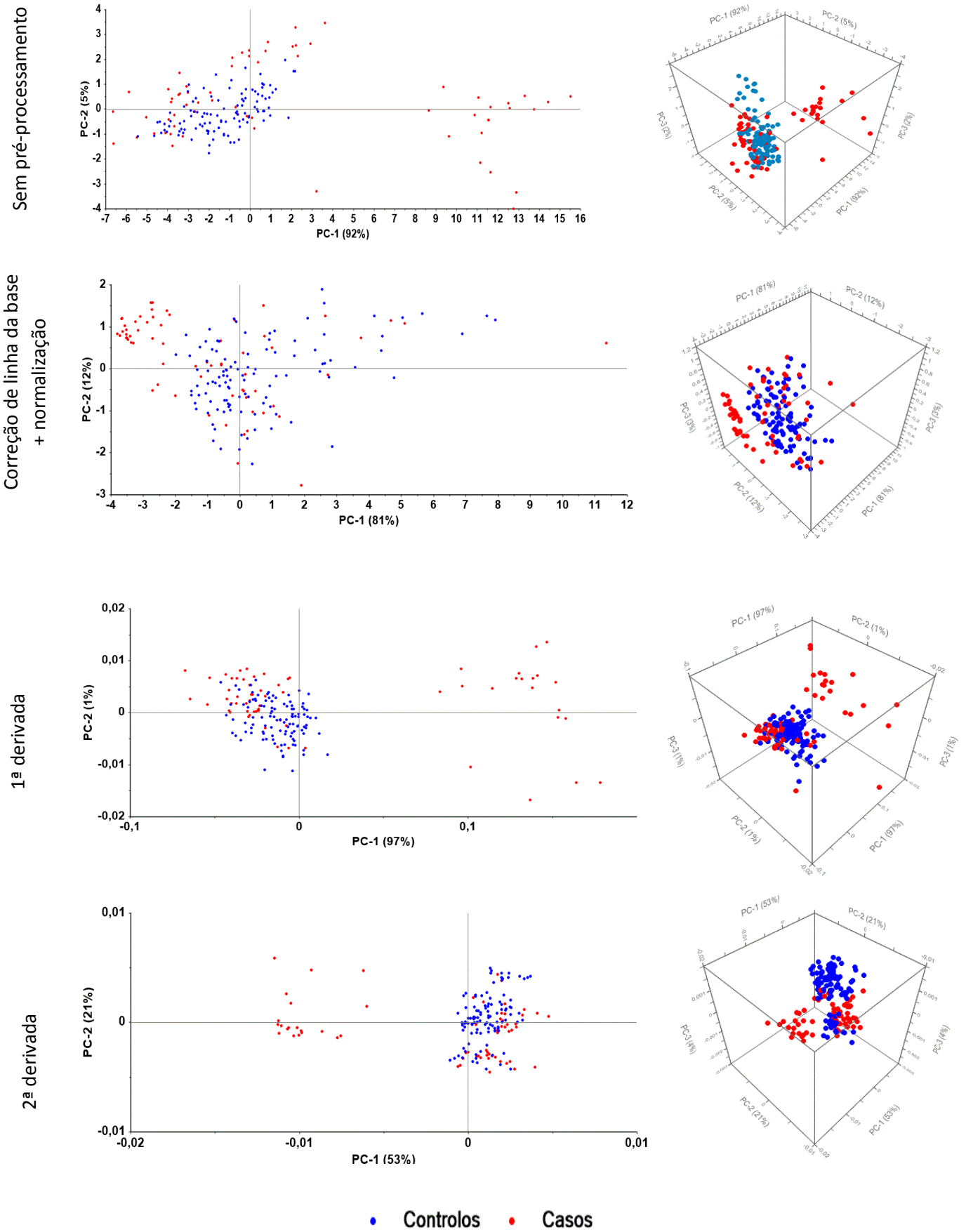


Fig. 3.4.2 - PCA de espectros de soro diluídas a 1/8 do grupo de Casos (vermelho) e dos Controlos (azul). Na análise consideraram-se espectros sem pré-processamento e processamento por correção da linha de base e normalização (à banda da amida II) e da 1ª e 2ª derivada.

Da PCA dos espectros do soro diluído a 1/8 (figura 3.4.2) observa-se que a melhor separação entre as amostras de Casos e de Controlos foi obtida com a 2ª derivada dos espectros.

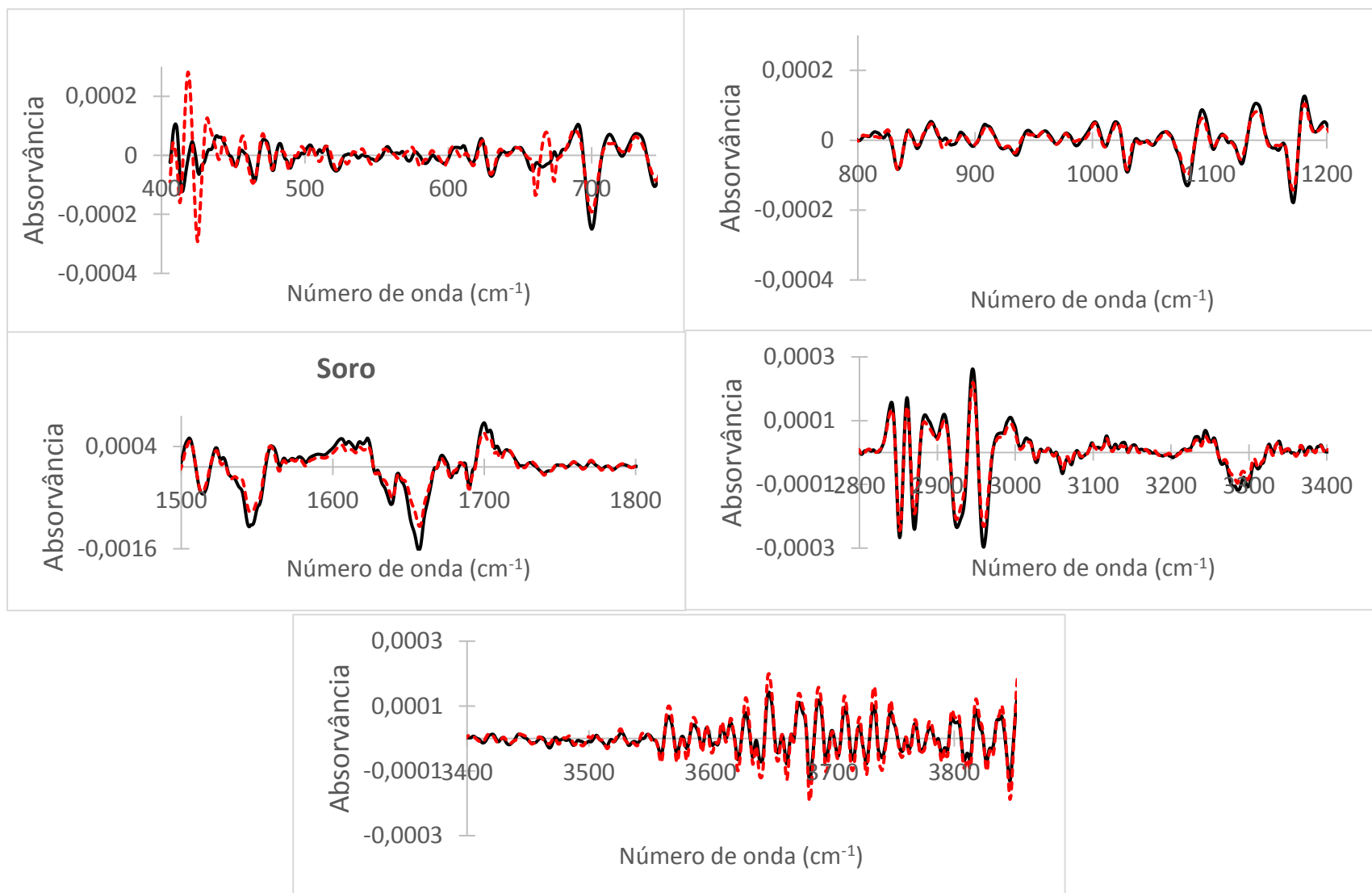
3.4.2 Análise de Razões de Bandas Espectrais

Da análise da segunda derivada do espectro médio do soro do grupo Casos e Controlo, observaram-se diferenças nas seguintes regiões espectrais (Figura 3.4.3): A413, A701, A745, A1082, A1172, A1547, A1565, A1584, A1616, A1640, A1657, A1702, A1713, A2852, A2960, A3286, A3298, A3560, A3680, A3846.

Determinaram-se as seguintes razões de absorvância do espectro normal, considerando-se as regiões mais próximas identificadas no espectro da 2ª derivada, mas também as indicadas por Rosa et al. (2016):

A3846/A3680, A3680/A3560, A3560/A3298, A3304/A3065, A3304/A2960, A3298/A3286, A3286/A2960, A3065/A2931, A2960/A2852, A2960/A2931, A2960/A2873, A2873/A2858, A2852/A1713, A2858/A1739, A1739/A1655, A1713/A1702, A1702/A1657, A1657/A1616, A1657/A1249, A1657/A1178, A1657/A1133, A1657/A1089, A1657/A1029, A1657/A940, A1616/A1584, A1584/A1565, A1565/A1547, A1549/A1249, A1549/A1089, A1549/A1178, A1549/A1133, A1549/A1029, A1549/A940, A1547/A1172, A1456/A1438, A1402/A1412, A1313/A1247, A1247/A1175, A1172/A1082, A1082/A1027, A1082/A745, A745/A701, A701/A413

De forma a avaliar se a média da razão de bandas era significativamente diferente entre a população Casos e Controlos, efetuou-se um teste de *Mann-Whitney*, observando-se que não houve uma diferença significativa entre a média da razão da população dos Casos e Controlos para um grau de significância a 5%. Este resultado pode ser por exemplo devido ao número reduzido de amostras de casos (n=23), tendo em conta a elevada variabilidade de amostras entre pessoas. Outra razão pode ser que os biomarcadores espectrais de genotoxicidade não estejam nos componentes do soro.



— Casos - - - Controlos

Fig. 3.4.3. Segunda derivada do espectro médio do soro dos participantes do grupo Casos (linha contínua a preto) e Controlos (linha a tracejado a vermelho), respetivamente.

Tabela 3.3.2 - Valores médios e respectivos desvios padrão de razões espectrais de soro diluído a 1/8 do grupo Casos e Controlos, assim como o valor de *p-value* do teste de *Mann-Whitney* de comparação das médias populacionais de Casos e Controlos.

Razões espectrais	CASOS		CONTROLOS		<i>p-value</i> da análise de <i>Mann-Whitney</i>
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	
A3846/A3680	0,486	0,5410	1,135	0,127	0,810
A3680/A3560	0,123	0,130	0,201	0,062	0,764
A3560/A3298	0,189	0,184	0,367	0,043	0,496
A3304/A3065	2,311	0,223	2,183	0,118	0,215
A3304/A2960	2,168	0,198	2,048	0,121	0,280
A3065/A2931	0,946	0,054	0,937	0,055	0,834
A2960/A2931	1,006	0,028	0,997	0,025	0,912
A2960/A2873	1,489	0,083	1,442	0,047	0,246
A2873/A2858	1,111	0,036	1,092	0,026	0,128
A2858/A1739	2,813	0,936	3,195	0,628	0,258
A1739/A1655	0,071	0,014	0,072	0,014	0,726
A1657/A1249	5,843	0,671	5,769	0,642	0,857
A1657/A1178	10,430	2,750	10,330	2,087	0,873
A1657/A1133	11,110	2,998	10,832	2,383	0,889
A1657/A1089	9,365	1,670	8,923	1,840	0,771
A1657/A1029	12,701	2,984	12,354	3,533	0,834
A1657/A940	48,027	54,008	49,350	59,006	0,712
A1549/A1249	3,908	0,374	3,876	0,378	0,617
A1549/A1089	6,261	1,029	5,990	1,168	0,719
A1549/A1178	6,964	1,683	6,935	1,321	0,696
A1549/A1133	7,418	1,840	7,270	1,514	0,582
A1549/A1029	8,487	1,885	8,287	2,278	0,503
A1549/A940	31,892	35,107	32,901	38,984	0,529
A1456/A1438	1,062	0,029	1,062	0,022	0,711
A1402/A1412	1,474	0,087	1,475	0,064	0,756
A1313/A1247	1,056	0,025	1,059	0,033	0,787
A1247/A1175	1,679	0,178	1,689	0,144	0,889
A1085/A1027	1,507	0,139	1,535	0,168	0,727
A1082/A745	0,337	0,373	0,733	0,088	0,952
A745/A701	0,323	0,339	0,746	0,073	0,312
A701/A413	0,923	1,366	1,978	0,241	0,603

3.5 PESQUISA DE BIOMARCADORES EM EXTRATOS DE METANOL DO SANGUE

3.5.1 Análise de Componentes Principais

A Figura 3.5.1 - representa a PCA dos espectros de FTIR obtidos de extrato de metanol do sangue diluído a 1/2, dos 92 participantes, sendo 46 amostras de Casos e 46 de Controlos.

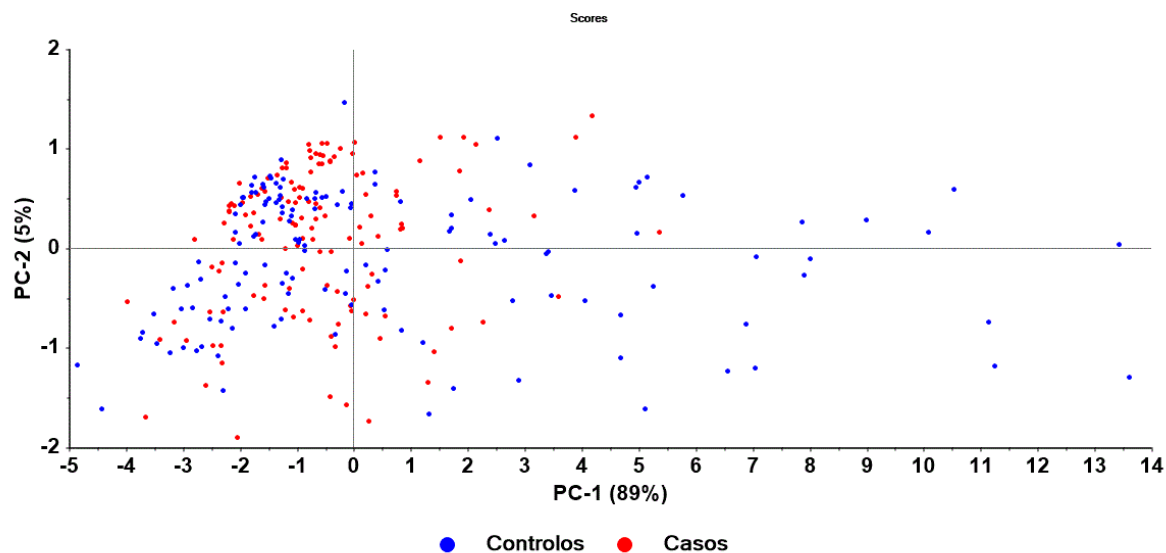


Fig. 3.5.1 – PCA do espectro de extrato de metanol do sangue de 92 pessoas após diluição em NaCl 0,9% a 1/2. Cada diluição foi efetuada em triplicado.

Avaliaram-se os seguintes pré-processamento de espectros das amostras diluídas a 1/8, na separação entre Casos e Controlos:

- Correção de linha de base;
- Correção de linha de base com normalização à amida II;
- 1ª derivada;
- 2ª derivada.

Da análise dos gráficos da PCA (Figura 3.5.2), de espectros de extrato de metanol de sangue diluídas a 1/2, observou-se que a melhor separação entre as amostras de Casos e Controlos foi obtida na representação PC1 vs. PC3 da correção da linha de base dos espectros.

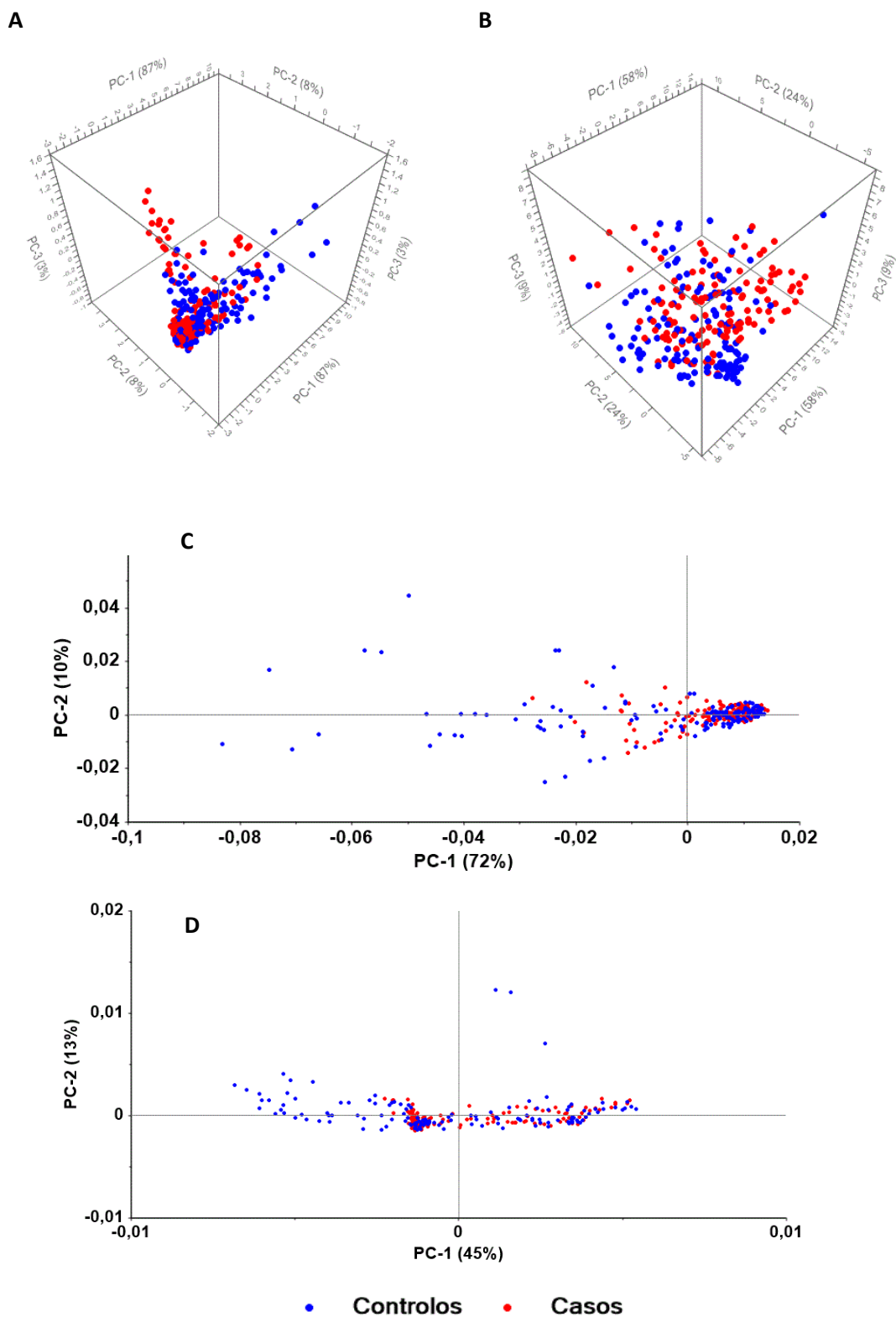


Fig. 3.5.2. PCA de espectros de extratos de metanol de sangue diluídas a 1/2. Nas análises considerou-se espectros com correção da linha da base (A), correção da linha da base com normalização (B), 1ª derivada (C) e 2ª derivada (D) dos pacientes do grupo Casos (vermelho) e Controlos (azul).

3.5.2 Análise de Razões de Bandas Espectrais

Da análise da segunda derivada do espectro médio de extratos de metanol do sangue dos Casos e Controlos, (figura 3.5.2) observaram-se diferenças nas seguintes regiões espectrais: A914, A922, A928, A934, A963, A972, A987, A1518, A1597, A1672 A1682 A1699.

Determinaram-se assim as seguintes razões de absorvância do espectro normal, considerando-se as regiões mais próximas identificadas no espectro da 2ª derivada, mas também as indicadas por Rosa et al. (2016):

A3434/A2963, A2921/A2875, A2875/A2852, A2852/A1735, A1699/A1682, A1682/A1672, A1672/A1597, A1657/A1557, A1557/A1519, A1597/A1518, A1518/A987, A1504/A1494, A1494/A1468, A1469/A1460, A1460/A1448, A1448/A1422, A1412/A1354, A1354/A1295, A1262/A1124, A1124/A1083, A1121/A1040, A1083/A989, A1041/A993, A993/A931, A989/A929, A1587/A972, A972/A963, A931/A861, A861/773, A693/A934

De forma a avaliar se a média da razão alvo era significativamente diferente entre a população Casos e Controlos efetuou-se um teste T-student. A Tabela 3.5.1 representa a *p-value* do teste T-student para todas estas razões, assim como os valores médios e desvios padrão.

Observou-se que um elevado número de razões de absorvância do espectro FTIR do extrato de metanol de sangue dos casos é estatisticamente diferente dos controlos, a uma significância a 5% e alguns mesmo a 1%. Curiosamente, as razões de absorvância que apresentaram valores estatisticamente diferentes entre a população exposta à substância genotóxica em relação à população não exposta, incluem regiões das principais biomoléculas da célula, como os lípidos (A2963/A2923, A2921/A2875, A1469/A1460). Desta forma o método baseado em espectroscopia FTIR pode ser utilizado como biomarcador de efeitos genotóxicos em extrato de metanol do sangue.

Tabela 3.5.1. Valores médios e respetivos desvio padrão de razões espectrais de extratos de sangue de metanol do grupo Casos e Controlos assim como a *p-value* de testes *T-student* de comparação das médias populacionais de Casos e Controlos. O *p-value* da análise de *T-student* inferior a 0,05 estão realçados a negro e a amarelo.

Razões espectrais	CASOS		CONTROLOS		<i>p-value</i> da análise de <i>t-student</i>
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	
A3434/A2963	1,997	0,460	2,268	0,925	0,001
A2963/A2923	0,947	0,066	0,964	0,078	0,025
A2921/A2875	1,286	0,121	1,316	0,169	0,042
A2875/A2852	0,943	0,059	0,954	0,087	0,119
A2852/A1735	4,178	1,763	4,143	1,841	0,437
A1699/A1682	0,619	0,070	0,592	0,062	0,0005
A1682/A1672	0,819	0,042	0,806	0,041	0,005
A1672/A1597	0,650	0,090	0,680	0,127	0,013
A1657/A1557	1,886	0,346	1,917	0,491	0,272
A1557/A1519	1,871	0,333	1,902	0,469	0,260
A1518/A987	2,986	2,553	3,977	3,540	0,004
A1504/A1494	1,098	0,088	1,115	0,116	0,084
A1494/A1468	0,790	0,090	0,783	0,135	0,310
A1469/A1460	0,968	0,054	0,952	0,058	0,011
A1460/A1448	0,926	0,061	0,907	0,057	0,005
A1448/A1422	0,746	0,085	0,736	0,099	0,197
A1412/A1354	1,308	0,250	1,369	0,256	0,024
A1354/A1295	2,462	0,950	2,497	1,302	0,401
A1262/A1124	0,772	0,181	0,794	0,245	0,201
A1124/A1083	0,844	0,100	0,867	0,136	0,056
A1121/A1040	1,136	0,237	1,245	0,346	0,001
A1083/A989	1,751	0,558	1,928	0,744	0,013
A1041/A993	1,527	0,472	1,603	0,593	0,123
A993/A931	0,942	0,185	0,923	0,189	0,194
A989/A929	0,993	0,184	0,989	0,216	0,436
A963/A934	3,084	1,321	3,449	1,410	0,015
A931/A861	0,795	0,139	0,829	0,1603	0,037
A861/A773	0,585	0,104	0,547	0,126	0,004

Das análises dos gráficos de bigodes (figura 3.3.5) observa-se a variação dos valores da razão de bandas da absorvância.

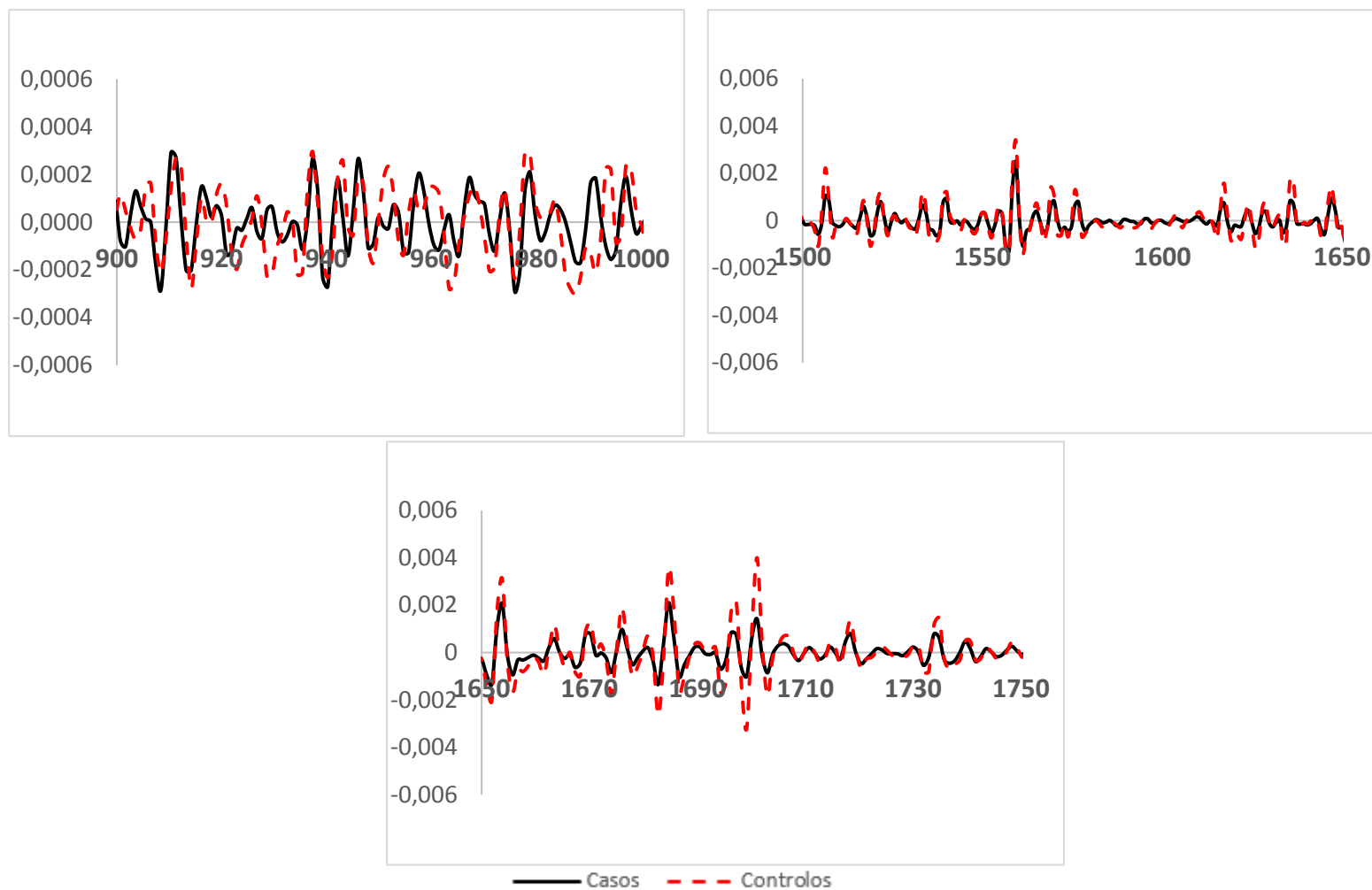


Fig. 3.5.2. Segunda derivada do espectro médio de amostras de sangue extraídas com metanol dos participantes do grupo Casos (linha continua a preto) e Controlos (linha a tracejado a vermelho), respetivamente.

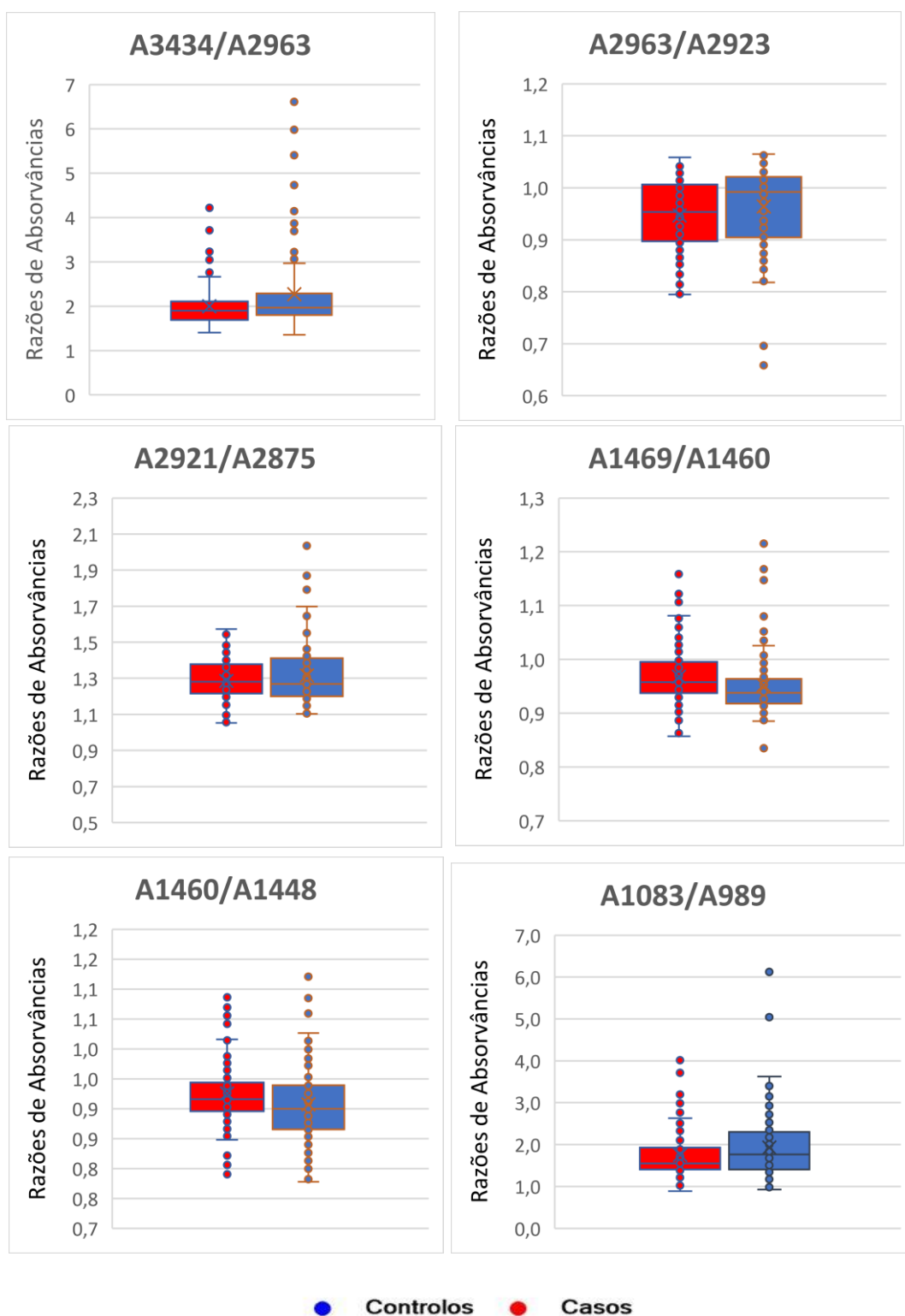


Fig. 3.5.3 - Alguns gráficos de bigodes relativos a razões de bandas espectrais entre os Casos (vermelho) e Controlos (azul) do extrato do metanol de sangue.

4 CONCLUSÕES E PERSPETIVAS

São muitos os fatores ambientais que nos rodeiam que contribuem para o aumento da taxa de cancro, sendo este uma das principais causas de morte a nível mundial, e em Portugal a segunda causa de morte, sendo apenas ultrapassada pelas doenças cardiovasculares. Atualmente, a forma mais eficiente de diminuição do número de cancros é desenvolver formas de prevenção, como seja através da identificação de fatores ambientais que mais contribuam para o processo de carcinogénese. De forma a identificar estes fatores, é por exemplo avaliado o impacto genotóxicos de determinados ambientes e moléculas através da análise de CMBN. No entanto, esta técnica apresenta elevadas limitações, quer devido à sua complexidade quer da sua elevada inter e intra-variabilidade. Deste modo, torna-se essencial o desenvolvimento de métodos alternativos para a análise de genotoxicidade, mais simples, económicos e com maior capacidade de serem automatizados.

Tendo em vista a descoberta e utilização de biomarcadores de genotoxicidade, que possam ser analisados por métodos aplicáveis em larga escala, este trabalho avaliou a aplicação de métodos baseados de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) para descobrir biomarcadores de genotoxicidade em amostras biológicas como sangue e soro. Este trabalho englobou-se num projeto de âmbito mais geral de avaliação de efeitos genotóxicos, devido à exposição ao agente citostático 5-FU, em profissionais que trabalham em ambiente hospitalar, e utilizando-se o método de CMBN. No presente trabalho, foram consideradas amostras de sangue e algumas de soro de 96 trabalhadores, 46 de trabalhadores hospitalares expostos ocupacionalmente a 5-FU, referidos como Grupo de Casos, e 46 trabalhadores não hospitalares e não expostos a 5-FU, referidos como Grupo Controlo.

O trabalho foi iniciado com o estudo do efeito da centrifugação, grau de diluição e solução de diluição de sangue na razão sinal/ ruído do espectro de FTIR. Observou-se que a centrifugação do sangue introduz variabilidade no espectro em relação à não centrifugação. Observou-se também que esta variabilidade poderia ser minimizada para graus de diluição elevados como de 1/20 e 1/40. Após esta otimização foram avaliadas amostras de sangue diluído a 1/40 e os respetivos extratos de metanol. Posteriormente à avaliação do efeito de diversos pré-processamento espectrais (correção de linha da base + normalização, 1ª derivada e 2ª derivada), na análise de componentes principais, observou-se diferenças entre o Grupo Controlo e Casos. Com base na análise da segunda derivada do espectro foi possível identificar regiões do espectro, do sangue e de extratos de metanol do sangue, que são diferentes entre estes dois grupos de amostras. Foi possível identificar para estes dois tipos de amostras biológicas, razões de bandas espectrais estatisticamente diferentes (a 5% e mesmo a 1% de significância) entre o Grupo Casos e Controlo. Em relação às amostras de soro, não foi possível identificar razões de bandas espectrais estatisticamente diferentes a 10% de significância entre o Grupo Casos e Controlo, indicando que os biomarcadores espectrais de genotoxicidade estão em componentes do sangue que não do soro. Estes últimos resultados podem também ser devido ao número mais limitado de amostras de soro disponíveis, já que havia apenas metade de amostras de soro ($n=23$) do Grupo de Casos em relação às amostras de sangue disponíveis ($n=46$). Em resumo, foi possível identificar biomarcadores espectrais a partir de amostras de sangue e de amostras de extratos de metanol de sangue que permitem discriminar amostras de pessoas que indicaram efeitos de genotoxicidade pelo método de CMBN. A combinação de razões de bandas do espectro de FTIR com análise de componentes principais do espectro pode proporcionar um método para monitorizar o risco de genotoxicidade de exposição.

Como trabalho futuro, seria interessante a realização de um estudo de avaliação da exposição ao 5-FU que abrangesse um maior número de indivíduos. Analisar as amostras sem serem congeladas ou com uma congelação num curto intervalo de tempo e também fazer avaliação estatística de mais razões para discriminar os grupos em estudo.

5. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- Amorim, L. Biomarkers for evaluating exposure to chemical agents present in the environment. *Rev. Bras. Epidemiol.* (2003); (2): 158-170.
- Andrade, M. Reis, S. Robinson, W. Borges, M. Micronúcleo. Um importante marcador biológico intermediário na prevenção do câncer bucal. *Revista Odonto Ciência* (2005); 48: 137-141.
- Barlev, E. Zelig, U. Bar, O. Segev, C. Mordechai, S. Kapelushnik, J. Nathan, I. Flomen, F. Kashtan, N. Dickman, R. Madhala, O. Wasserberg, N. A novel method for screening colorectal cancer by infrared spectroscopy of peripheral blood mononuclear cells and plasma. *J Gastroenterol* (2016); 51:214–221.
- Beckman, R & Loeb, L. Genetic instability in cancer: theory and experiment. *Semin Cancer Biol.* (2005); (15) 423-435.
- Bellisola, G. Sorio, C. Infrared spectroscopy and microscopy in cancer research and diagnosis. *Am J Cancer Res.* (2012); 2 (1): 1-2.
- Bunaciu, A. A., Aboul-Enein, H. Y., & Fleschin, S. Application of Fourier Transform Infrared Spectrophotometry in Pharmaceutical Drugs Analysis. *Appl Spectrosc Rev.* (2010); 45(3), 206–219.
- Carvalho, T. Aprender sobre o cancro – Sociedade Portuguesa de Oncologia (2007).
- Casadio, F and L. Toniolo, “The analysis of polychrome works of art: 40 years of infrared spectroscopic investigations,” *J Cult Herit* (2011);71–78, 2001
- Dendisová, M., Jenišťová, A., Parchaňská-Kokaislová, A., Matějka, P., Prokopec, V., & Švecová, M. The use of infrared spectroscopic techniques to characterize nanomaterials and nanostructures: A review. *Anal Chim Acta.* (2018); 1031, 1–14.
- Ewing, A. V., & Kazarian, S. G. Infrared spectroscopy and spectroscopic imaging in forensic science. *The Analyst.* (2017); 142(2), 257–272.
- Fenech, M. Cytokinesis block micronucleus cytome assay. *Nature.* (2007); 2(5)1084–1104.
- Guidolin, L. Bachmann, L. Application of FTIR Spectroscopy for Identification of Blood and Leukemia Biomarkers: A Review over the Past 15 Years, *Appl. Spectros. Rev* (2011); 46 (5): 388-404.
- Hongyu, K. Sandanielo, V. Junior, G. Principal Component Analysis: theory, interpretations and applications. *E&S - Engineering and Science*, (2016), 5:1.
- Kar, S. Katti, D. R., & Katti, K. S. Fourier transform infrared spectroscopy based spectral biomarkers of metastasized breast cancer progression. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* (2018).
- Kopjar, N. Garaj-Vrhovac, V. Kasuba, V. Rozgaj, R. Ramic, S. Pavlica, V. Zeljezic, D. Assessment of genotoxic risks in Croatian health care workers occupationally exposed to cytotoxic drugs: a multibiomarker approach. *Int. J. Hyg. Environ. Health* (2009); 212: 414-431.
- Ladeira, C. Susana, Viegas, S. Carolino, E. Gomes, M. Brito, M. Genotoxicity Biomarkers. Application in Histopathology Laboratories. (2012); (7): 134-154.
- Ladeira, C. Viegas, S. Pádua, M. Gomes, M. Carolino, M. Gomes, M. Brito, M. Assessment of Genotoxic Effects in Nurses Handling Cytostatic Drugs, *J Toxicol Environ. Health A.* (2014); 77(14-16): 879-887

- Li, Q., Chen, J., Huyan, Z., Kou, Y., Xu, L., Yu, X., & Gao, J.-M. Application of Fourier Transform Infrared Spectroscopy for the Quality and Safety Analysis of Fats and Oils: A Review. *Critical Reviews in Food Sci Nut.*, (2018); 1–57.
- Lima, C. Goulart, V. Côrrea, L. Pereira, T. Zezell, D. ATR-FTIR Spectroscopy for the Assessment of Biochemical Changes in Skin Due to Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *Int J Mol Sci.* (2015). 16 (4) 6621-6630.
- Liu, K. Xu, M. Scott, D. Biomolecular characterisation of leucocytes by infrared spectroscopy. *Br J Haematol* (2017); 136: 713–722.
- Liu, K.-Z., Xu, M., & Scott, D. A. Biomolecular characterisation of leucocytes by infrared spectroscopy. *Br J Haematol* (2011); 136(5), 713–722.
- Mostaço-Guidolin, L. B., & Bachmann, L. Application of FTIR Spectroscopy for Identification of Blood and Leukemia Biomarkers: A Review over the Past 15 Years. *Appl Spectrosc Ver.* (2011); 46(5), 388–404.
- Movasaghi, Z., Rehman, S., & ur Rehman, D. I. (2008). Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy of Biological Tissues. *Appl Spectrosc Ver.* (2018); 43(2), 134–179
- Pereira M. Evaluating the Impact of Culture Conditions on Human Mesenchymal Stem/Stromal Cell-derived Exosomes through FTIR Spectroscopy. Dissertação de mestrado em Engenharia Biológica – Instituto Superior Técnico. (2018).
- Pina ,C. Avaliação da Exposição Profissional ao Formaldeído: Efeito Genotóxico, Dissertação de Mestrado em Contaminação e Toxicologia Ambientais, Faculdade de Ciências, Universidade de Porto (2010).
- Rodrigues, A, Estudo de variações bioquímicas e genotoxicidade induzidas por mistura de contaminantes em tilápia (*Oreochromis niloticus*), como biomarcadores de contaminação ambiental. Tese de Doutoramento em Genética - Universidade Estadual Paulista. (2014).
- Rosa, F. Carmelo, J. Sales, K. Lopes, M. Silva, C. Calado, C. Monitoring the *ex vivo* expansion of human mesenchymal stem/stromal cells in xeno-free microcarrier-based reactor systems by MIR spectroscopy. *Biotechnol Prog.* (2016); 32(2):447-55.
- Rosa, F. Infrared Spectroscopy: A groundbreaking tool for monitoring mammalian cells' processes. Master's in Biomedical Engineering - Universidade Católica Portuguesa (2014).
- Russo, A. Optimization of a Bioassay to Evaluate - *Escherichia coli* Stress Responses, Dissertação de mestrado em Microbiologia Aplicada, Universidade de Lisboa Faculdade de Ciências (2017).
- Sá, C. Exposição profissional a citostáticos - Definição de pontos críticos para o estudo da contaminação de superfícies num Hospital de Dia. Dissertação de mestrado em Gestão Integrada da Qualidade, Ambiente e Segurança, Instituto Superior de Educação e Ciências (2013); 14-104.
- Singh, P., Beg, Y. R., & Nishad, G. R. A review on spectroscopic methods for determination of nitrite and nitrate in environmental samples. *Talanta.* (2018); 191:364-381.
- Skoog, D. Holler, F. Crouch, S. Principles of Instrumental Analysis, (2007).
- Smith J & Smith V. The Endearing FTIR Spectrophotometer, *Analytical Chemistry* (2003):75 (1); 37-39.
- Souza, L. Avaliação do teste de micronúcleo em linfócitos para uso como biomarcador de risco de câncer em usuários de esteroides anabolizantes androgênicos. Dissertação de mestrado em Biotecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana. (2013).

Venkatachalam, P., Rao, L., Kumar, N., Jose, A., Nazeer, N. Diagnosis of Breast Cancer Based on FT- IR Spectroscopy. *AIP Conf Proc.* (2008); 144-148.

Zelig, U. Barlev, E. Bar O, Gross I, Flomen F, Mordechai S, Kapelushnik J, Nathan I, Kashtan N, Wasserberg N, Madhala O. Total biochemical analysis of peripherablood components: a preliminary study. *BMC Cancer* (2015); 15:408-4018