

**UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA
INSTITUTO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO**

ADRIANO MORAES DA SILVA

**IDENTIFICAÇÃO DO ESPECTRO PROTÉICO PLASMÁTICO DE
PACIENTES COM LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA ATRAVÉS DA
ESPECTROSCOPIA RAMAN: UMA NOVA METODOLOGIA PARA
O MONITORAMENTO**

SÃO JOSÉ DOS CAMPOS – SP

2006

ADRIANO MORAES DA SILVA

**IDENTIFICAÇÃO DO ESPECTRO PROTÉICO PLASMÁTICO DE PACIENTES
COM LEUCÊMIA MIELÓIDE AGUDA ATRAVÉS DA ESPECTROSCOPIA
RAMAN: UMA NOVA METODOLOGIA PARA O MONITORAMENTO**

**Dissertação de Mestrado
apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Bioengenharia,
como complementação dos
créditos para obtenção do título de
Mestre em Engenharia Biomédica.**

**Orientador: Prof. Dr. Fernando
Callera
Co-orientador: Prof. Dr. Landulfo
Silveira Jr.**

**SÃO JOSÉ DOS CAMPOS, SP
2006**

S578i

Silva, Adriano Moraes da

Identificação do espectro protéico plasmático de pacientes com leucemia mielóide aguda através da espectroscopia raman: uma nova metodologia para o monitoramento. / Adriano Moraes da Silva. Orientador: Dr. Fernando Callera; Co-orient: Dr. Landulfo Silveira Jr. São José dos Campos, 2006.

1 Disco laser: Color

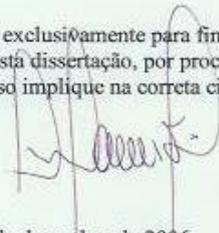
Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioengenharia, como complementação dos créditos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica.

1. Leucemia Mielóide 2.Raman, espectroscopia .I. Callera, Fernando, Orient. II Silveira Jr., Landulfo, Co-orient. III. Título

CDU: 616.155.392

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processo fotocopiador ou transmissão eletrônica, desde que seu uso implique na correta citação da fonte.

Aluno:

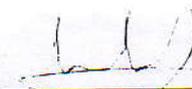


Data: 22 de dezembro de 2006.

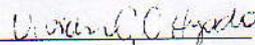
“IDENTIFICAÇÃO DO ESPECTRO PROTÉICO PLASMÁTICO DE PACIENTES COM LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA ATRAVÉS DA ESPECTROSCOPIA RAMAN: UMA NOVA METODOLOGIA PARA O MONITORAMENTO”

Adriano Moraes da Silva

Banca Examinadora:

Prof. Dr. **LANDULFO SILVEIRA JUNIOR** (UNIVAP) 

Prof. Dr. **FERNANDO CALLERA** (UNIVAP) 

Profª. Dra. **VIVIAN C. C. CASTILHO HYODA** (UNIP) 

Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco

Diretor do IP&D – UniVap

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho

À minha esposa Márcia, que acreditou em mim, desde que me conheceu e me acompanhou durante todos esses anos, principalmente nos últimos dois anos de mestrado, os quais passamos por dificuldades e alegrias, mas o que prevaleceu foi o nosso amor que esteve entre nós a todo instante. Deste amor nasceu Pedro, nosso filhinho tão sonhado e esperado e que Deus nos presenteou neste ano e me fez ver o verdadeiro sentido de família, de união e do Dom Divino em nossas vidas. Pelo apoio, pela paciência, pela compreensão e ajuda efetiva.

Márcia e Pedro, este trabalho é todo dedicado a vocês.

AGRADECIMENTOS

Como não poderia deixar de ser, Deus, em primeiro lugar em tudo, obrigado por me carregar nos braços nos momentos mais difíceis, obrigado por caminhar ao meu lado nos momentos de alegria e glória, enfim, Obrigado Deus, por conduzir minha vida até aqui e me fazer capaz de concluir este trabalho.

Agradeço também às pessoas importantíssimas que de maneira direta me ajudou neste mestrado, às Irmãs do Instituto das Pequenas Missionárias de Maria Imaculada, especialmente Ir. Domitila, Ir. Ruth Maria, Ir. Glênia Mara e Ir. Teresa Isabel.

Aos colegas de curso, Allison Gustavo Braz, por desbravar junto comigo o Origin... Danilo Barbosa pelo incentivo, pelos artigos que escrevemos juntos.

Ao professor Landulfo, Silveira Jr. Meu co-orientador que aceitou o desafio de entrar num projeto já em andamento e desvendar muitos mistérios sobre o laser e a matemática para formação de nossos gráficos.

Ao professor Fernando Callera, meu orientador, que lançou uma hipótese baseada em seus conhecimentos e me colocou a frente para tornar realidade suas idéias, obrigado por todo conhecimento, atenção, tempo e contratempos.

Aos doadores que aceitaram participar deste projeto.

Às minhas famílias, Silva e Matsumura, saibam que todos são muito importantes na minha vida, por todo apoio e tolerância comigo, não deve ter sido fácil me aturar, por isso só tenho a agradecer.

Em especial, minha mãe, que me acompanhou durante toda a faculdade e se sacrificou junto ao meu pai para que pudesse me formar. Que aí do céu, a senhora sinta orgulho de mim e saiba que nossos esforços não foram em vão.

*“A mente que se abre a uma nova idéia jamais
volta ao seu tamanho original”
Albert Einstein (1879-1955)*

“Veni vidi vici”
(Vim, vi e venci)
Caius Julius Caesar

IDENTIFICAÇÃO DO ESPECTRO PROTÉICO PLASMÁTICO DE PACIENTES COM LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA ATRAVÉS DA ESPECTROSCOPIA RAMAN: UMA NOVA METODOLOGIA PARA O MONITORAMENTO

RESUMO

Buscar novas perspectivas de entender a Leucemia Mielóide Aguda tem fomentado muitos cientistas a se lançarem no mundo das incertezas e encontrar resultados. Este trabalho objetivou elucidar o perfil protéico plasmático de pacientes com Leucemia Mielóide Aguda, através da Espectroscopia Raman, buscando evidenciar diferenças no seu comportamento gráfico quando comparado a um plasma sanguíneo de um indivíduo saudável. Desta forma, um indivíduo leucêmico pós-tratamento quimioterápico, julgado estar em remissão total da doença, ou seja, o desaparecimento por completo dos elementos que evidenciam a LMA, seria submetido à Espectroscopia Raman, para a detecção de picos que são característicos em indivíduos doentes usando um laser de sintonizado em 785 nm, um espectrômetro *Kaiser* f/1.8 e um detector de CCD refrigerado na região entre 600 a 1800 cm^{-1} . Foram analisados 8 pacientes com LMA e 10 saudáveis para padronização de um “Perfil Controle” e de um “Perfil Leucêmico”. Após as análises, verificamos que os pacientes leucêmicos apresentam picos diferentes nas regiões de 1160 cm^{-1} e 1518 cm^{-1} , essas regiões são típicas de carotenóides, que até o momento não foram descritas como proteínas relacionadas a LMA. Este fato sugere trabalhos futuros, onde se possa elucidar a relação destas proteínas com a patologia em questão. Conclui-se, portanto, que a análise plasmática por Espectroscopia Raman para formação de um perfil protéico de pacientes com LMA, após aprimoramentos na técnica e na metodologia, poderá surgir como uma nova e importante ferramenta para o monitoramento e seguimento de pacientes leucêmicos no período de remissão.

Palavras-chaves: Espectroscopia Raman, Leucemia Mielóide Aguda, Proteínas Plasmáticas.

IDENTIFICATION OF SPECTER PROTEICO IN PLASMA BLOOD OF PATIENTS WITH ACUTE LEUKEMIA MIELOIDE THROUGH THE ESPCETROSCOPY RAMAN: A NEW METHODOLOGY FOR TO MONITOR

ABSTRACT

To search new perspectives to understand Acute Myeloid Leukemia, has fomented many scientists to launch in the world of the uncertainties and to find resulted. This work objectified to elucidate the plasma blood proteome profile of patients with Acute Myeloid Leukemia, through the Espectroscopy Raman, searching to evidence differences in its graphical behavior when compared with a plasma blood of a healthful person. In such a way, a leucemic individual after chemotherapy treatment, judged to be in total remission of the illness, that is, the disappearance completely of the elements that the AML evidences, would be submitted the Raman Spectroscopy, for the detention of peaks that are characteristic in sick individuals using a laser syntonized in 785 nm, a spectrometer Kaiser f/1.8 and a detector of CCD cooled in the region enters the 600 1800 cm^{-1} . 8 patients with AML and 10 healthful for standardization of a "Profile Control" and a "Leucemic Profile" had been analyzed. After the analyses, we verify that the leucemic patients present different peaks in the regions of 1160 cm^{-1} and 1518 cm^{-1} , these regions are typical of carotenes, that until the moment they had not been described as proteins related to the AML. This fact suggests works future, where if it can elucidate the relation of these proteins with the pathology in question. Conclude therefore, that the plasma blood analysis for Raman Spectroscopy for formation of a proteome profile of patients with AML, after improvements in the technique and the methodology, will be able to appear as a new and important tool for the monitor and pursuing of leucemic patients in the period of remission.

Key Words: Raman spectroscopy, Acute Mieloide Leukemia, Plasma Blood Protein.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Diagrama de blocos ilustrando o sistema de Espectroscopia Raman de bancada	34
Figura 2: Espectro Raman apresentando um perfil plasmático saudável	37
Figura 3: Espectro Raman apresentando um perfil plasmático leucêmico	37
Figura 4: Gráfico comparativo entre espectros Raman de um plasma LMA e plasma saudável	38
Figura 5: Gráfico filtrado do paciente com LMA (rosa) em relação ao indivíduo saudável (azul), apresentando diferenças nos picos das regiões de 1160 e 1518 cm^{-1}	38
Figura 6: Gráfico normalizado pelos picos 1160 e 1518 cm^{-1} de espectros Raman de paciente com LMA (rosa) em relação ao indivíduo saudável (azul)	39
Figura 7: Gráfico da cubeta	43
Figura 8: Gráfico que apresenta um plasma sem interferência (amarelo) sobreposto a uma amostra com interferência da cubeta (rosa) e uma só da cubeta (azul)	44
Figura 9: Gráfico filtrado do paciente com LMA (rosa) em relação ao indivíduo saudável (azul)	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estimativas para o ano 2006 de número de casos novos de Leucemias, em homens e mulheres, segundo localização primária.	19
Tabela 2: Estimativas para o ano 2006 de número de casos novos de Leucemias, por estado.	20
Tabela 3: Estimativas para o ano 2006 de número de casos novos de Leucemias, por capital.	21

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 ANATOMIA E FORMAÇÃO DA MEDULA ÓSSEA	18
2.2 GENERALIDADES SOBRE NEOPLASIAS	21
2.3 FATORES GENÉTICOS OU HEREDITÁRIOS	22
2.4 PREVENÇÃO DA LEUCEMICA MIELÓIDE AGUDA	23
2.5 INVESTIGAÇÃO E DIAGNÓSTICO PRECOCE	24
2.6 ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL RAMAN – UM BREVE	25
HISTÓRICO	
2.6.1 EFEITO RAMAN	27
2.6.2 ESPALHAMENTO RAMAN	28
2.6.3 A RELAÇÃO DA ESPECTROSCOPIA RAMAN COM A	29
ÁREA BIOLÓGICA – APLICABILIDADE	
3 OBJETIVOS	31
4 MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1. ORIGIN 6.0	35
4.2. MICROSOFT OFFICE EXCEL 2003	36
5 RESULTADOS	37
5.1. PERFIL SAUDÁVEL	37
5.2. PERFIL LEUCÊMICO	37
5.3. COMPARATIVO: LMA x SAUDÁVEL	38
6 DISCUSSÃO	40
7 CONCLUSÃO	45
8 ESTUDOS FUTUROS	46

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
ANEXOS	51
ANEXO A	59
ANEXO B	52
ANEXO C	54

1 INTRODUÇÃO

A Leucemia Mielóide Aguda (LMA) é uma doença clonal do tecido hematopoético que se caracteriza pela proliferação anormal de células progenitoras da linhagem mielóide, ocasionando produção insuficiente de células sanguíneas maduras normais e conseqüente substituição do tecido normal (ARTHUR, et al., 2003)

A mortalidade e o perfil epidemiológico têm sido fontes essenciais para compreensão desta doença e pelas buscas de inovações terapêuticas, diagnósticas e de monitoramento (INCA/MS -2006). Segundo a Organização Mundial da Saúde, cerca de 10 mil novos casos de LMA são diagnosticados a cada ano nos Estados Unidos (ABRALE, 2005). No Brasil poucos estudos onde são relatados dados estatísticos sobre a incidência de LMA têm sido publicados, contudo, alguns trabalhos demonstraram diferentes prevalências dos subtipos de LMA nas regiões do Brasil (CALLERA, et al., 2006).

O mecanismo que leva a célula progenitora da linhagem mielóide a perder o controle da proliferação celular, ocasionando a expansão do clone leucêmico, ainda permanece incerto. No entanto, ativação de proto-oncogenes (PETERS, 1994; FURUKAWA et al., 1995) e mutações em genes supressores que regulam o ciclo celular parecem estar envolvidos na patogênese das leucemias (MARTINS; FALCÃO, 2000; NAKAMAKI; BARTRAM; SERIU; et al., 1997).

A LMA representa cerca de 15 - 20% das leucemias agudas da infância e 80% de adultos. Na maioria dos casos não há evidência da influência de fatores genéticos, assim como não há diferenças de incidência entre as raças americana, africana e caucasiana (LINET, 1985).

O protocolo básico para o diagnóstico envolve a realização de exames laboratoriais como hemograma, mielograma, imunofenotipagem e cariótipo medular. O conjunto desses procedimentos permite reconhecer o clone anormal, definir a linhagem, o estágio de diferenciação, as características prognósticas e fenótipos aberrantes para monitorar a doença residual pós-tratamento quimioterápico.

Todos esses fatores são essenciais para a escolha e o sucesso do tratamento, que invariavelmente visa a remissão total da doença, ou seja, o desaparecimento por completo dos elementos que evidenciam a LMA. Contudo, segundo Callera et al. (2006), apesar dos avanços diagnósticos e das melhores condições de tratamento clínico as taxas de morbidade e mortalidade ainda apresentam-se elevadas, justificando novas pesquisas nesta área.

Alguns estudos mostraram que indivíduos acometidos por LMA apresentam a expressão de diferentes proteínas no plasma sanguíneo tais como *alpha-2-HS-glycoprotein*, *complement-associated protein SP-40*, *RBP4 gene product*, *lipoprotein C-III*, *immunoglobulin heavy-chain variant*, *proteosome 26S ATPase subunit 1*, e *haptoglobin-1* que parecem ser específicas desta doença, uma vez que as mesmas não puderam ser detectadas em os plasmas de indivíduos classificados como controle. A identificação dessas proteínas se deu através de métodos analíticos como a eletroforese bidimensional por laser ionizante e eletroscopia ionizante, ambos espectrômetros de massa (KWAK, et al., 2004).

A espectroscopia Raman é uma técnica que oferece grande riqueza de detalhes provida pela vibração de moléculas em diferentes níveis de energia (SOUZA; PACHECO; VILAVERDE. *et al.*, 2003), além de propiciar uma rápida obtenção de resultados sem que a amostra sofra alterações de suas propriedades originais. A espectroscopia Raman é, portanto, um método muito interessante para

análise e caracterização de espectros protéicos em fluidos biológicos. Com base em revisão da literatura utilizando as bases de dados MedLine, Lilacs e Scielo observamos que até a presente data o espectro protéico plasmático de pacientes com LMA através da espectroscopia Raman não fora demonstrado.

Frente ao exposto, este experimento busca evidenciar e caracterizar os espectros protéicos plasmáticos distintos entre pacientes com LMA e controles através de espectroscopia Raman. Finalmente, considerando o potencial analítico da espectroscopia Raman, possíveis diferenças encontradas entre pacientes e controles poderão ser usadas como marcadores para monitoramento residual da LMA pós-tratamento quimioterápico.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ANATOMIA E FORMAÇÃO DA MEDULA ÓSSEA

A medula óssea é constituída por um tecido esponjoso mole localizado no interior dos ossos longos. É nela que o organismo produz praticamente todas as células do sangue; glóbulos vermelhos (hemácias); glóbulos brancos e plaquetas.

O tecido de sustentação das células hematopoiéticas é formado por fibrilas conjuntivas delicadas, fibroblastos, vasos e fibras nervosas que preenchem os espaços existentes entre as trabéculas ósseas que formam os ossos íliacos, esterno, costelas e apófises espinhosas das vértebras (VERRASTRO; LORENZI; WENDEL, 1996)

Pelas hemácias, o oxigênio é transportado dos pulmões para as células de todo o nosso organismo e o gás carbônico é levado destas para os pulmões, a fim de ser expirado. Os leucócitos são os agentes mais importantes do sistema de defesa do nosso organismo, inclusive nos defende das infecções. As plaquetas compõem o sistema de coagulação do sangue.

Estes componentes do sangue são renovados continuamente e a medula óssea é quem se encarrega desta renovação. Trata-se, portanto de um tecido de grande atividade evidenciada pelo grande número de multiplicações celulares.

Estima-se que em um adulto médio, com aproximadamente 5 litros de sangue, existam em cada centímetro cúbico de sangue, cerca de 4,5 milhões de glóbulos vermelhos, 6 mil glóbulos brancos e 300 mil plaquetas. Isso significa um total aproximado de 22,5 bilhões de glóbulos vermelhos, 30 milhões de glóbulos brancos e 1,5 bilhão de plaquetas (VERRASTRO; LORENZI; NETO, 1996).

As células sangüíneas têm vida curta, sendo que os glóbulos vermelhos têm uma vida média de 120 dias, os glóbulos brancos vivem em média 1 semana, as plaquetas 9 dias. Há, portanto permanentemente células morrendo, sendo destruídas ou eliminadas e substituídas por novas células normais, fenômeno caracterizado por apoptose fisiológica (GUYTON, 1993).

É no interior dos ossos, especificamente na Medula Óssea, onde estão as células progenitoras das células sangüíneas, e é ali também onde têm origem às alterações que vão ser responsáveis por inúmeras doenças, como as leucemias.

Os principais sintomas da leucemia decorrem do acúmulo dessas células na medula óssea, prejudicando ou impedindo a produção dos glóbulos vermelhos (causando anemia), dos glóbulos brancos (causando infecções) e das plaquetas (causando hemorragias). Depois de instalada, a doença progride rapidamente, exigindo com isso que o tratamento seja iniciado logo após o diagnóstico e a classificação da leucemia.

Segundo as Estimativas de Incidência de Câncer no Brasil para 2006, publicadas pelo INCA, as leucemias atingirão 5.330 homens e 4.220 mulheres no ano de 2006, totalizando 9550 casos, conforme as figuras a seguir.

Tabela 1. Estimativas para o ano 2006 de número de casos novos de Leucemias, em homens e mulheres, segundo localização primária.

Doença	Homens	Mulheres	Total
Leucemia	5330	4220	9550
Total de Neoplasias	179.090	176.320	355.410
Percentual	2.98%	2.40%	2,69%

Tabela 2. Estimativas para o ano 2006 de número de casos novos de Leucemias, por estado.

Estados	Casos de Leucemias - Absoluto	Casos de Leucemias - Relativo
Acre	20	0.21
Alagoas	110	1.15
Amapá	20	0.21
Amazonas	140	1.46
Bahia	390	4.1
Ceará	350	3.66
Distrito Federal	120	1.26
Espírito Santo	180	1.88
Goiás	270	2.83
Maranhão	150	1.57
Mato Grosso	120	1.26
Mato Grosso do Sul	120	1.26
Minas Gerais	970	10.2
Pará	220	2.30
Paraíba	130	1.36
Paraná	610	6.39
Pernambuco	360	3.77
Piauí	100	1.05
Rio de Janeiro	1.020	10.7
Rio Grande do Norte	150	1.57
Rio Grande do Sul	860	9.0
Rondônia	40	0.42
Roraima	20	0.21
Santa Catarina	380	3.98
São Paulo	2.570	26.9
Sergipe	80	0.84
Tocantins	50	0.52
Brasil	9.550	100.0

Tabela 3. Estimativas para o ano 2006 de número de casos novos de Leucemias, por capital

Capitais	Casos de Leucemias - Absoluto	Casos de Leucemias - Relativo
Rio Branco (AC)	20	0.68
Maceió (AL)	40	1.36
Macapá (AP)	20	0.68
Manaus (AM)	120	4.09
Salvador (BA)	130	4.44
Fortaleza (CE)	130	4.44
Vitória (ES)	20	0.68
Goiânia (GO)	90	3.10
São Luís (MA)	60	2.05
Cuiabá (MT)	20	0.68
Campo Grande (MS)	50	1.71
Belo Horizonte (MG)	170	5.80
Belém (PA)	110	3.75
João Pessoa (PB)	40	1.36
Curitiba (PR)	120	4.09
Recife (PE)	110	3.75
Teresina (PI)	40	1.36
Rio de Janeiro (RJ)	500	17.1
Natal (RN)	50	1.71
Porto Alegre (RS)	140	4.78
Porto Velho (RO)	20	0.68
Boa Vista (RR)	20	0.68
Florianópolis (SC)	20	0.68
São Paulo (SP)	840	28.67
Aracaju (SE)	30	1.02
Palmas (TO)	20	0.68
Total	2.930	100.0

2.2 GENERALIDADES SOBRE NEOPLASIAS

Cada dia mais aumenta o interesse em se ganhar informações quanto à prevenção de câncer e seu campo de investigação, em pessoas com alto risco o de manifestar a doença. Tanto a sociedade científica como o público em geral parecem reconhecer que o melhor “tratamento” para o câncer é preveni-lo ou detectá-lo precocemente, período no qual as possibilidades de tratamento são maiores.

No entanto, até o momento, não foi possível explicar porque umas pessoas adquirem a LMA e outras não.

E quando as causas dessa enfermidade forem conhecidas, os cientistas esperam entender melhor como preveni-la e como tratá-la.

A possibilidade de que uma pessoa apresente câncer depende de fatores genéticos e não genéticos. O fator genético é um traço hereditário que não se pode modificar até o momento, já os fatores não genéticos são variáveis entre o meio ambiente e a pessoa, o qual com frequência podem sofrer mudanças. Entre os fatores não genéticos estão a dieta, o exercício ou a exposição a certas substâncias presentes em seu nicho. Estes fatores são conhecidos como fatores ambientais. Alguns fatores não genéticos parecem facilitar o processo de modificações que sofrem as células saudáveis para cancerosas como exemplo a relação entre o hábito de fumar e câncer pulmonar, enquanto que para outras classes de câncer não se conhecem correlações ambientais, porém sabe-se que contam com uma predisposição genética, a saber, que o risco de que uma pessoa contraia certa classe de câncer é maior se um membro da família já teve esse tipo de câncer.

2.3 FATORES GENÉTICOS OU HEREDITÁRIOS

A LMA familiar é um tipo raro de leucemia herdada, a qual se transmite mediante um cromossomo não sexual de maneira dominante. Certas condições genéticas podem aumentar o risco LMA. É factível que gêmeos idênticos, filhos de pessoas que tiveram ou têm LMA se manifeste no primeiro ano de vida acometendo a um ou a ambos com a doença. No entanto, após o primeiro ano de vida, os gêmeos idênticos de pacientes com LMA somente apresentarão um pequeno aumento do risco de manifestar LMA quando comparados com a população em geral. Isto sugere, de

maneira enfática, que os fatores ambientais são muito mais importantes que os fatores genéticos para a manifestação da LMA. É um mistério científico o porquê apenas um de um par de gêmeos idênticos possa manifestar leucemia, uma vez que a genética é idêntica e as exposições ambientais são similares ou até iguais.

A síndrome de Down, que é uma das condições genéticas, que se associam ao aumento do risco de desenvolver leucemia mielóide ou linfóide aguda. A neutropenia congênita também está ligada a um aumento da incidência de síndrome mielodisplásico e LMA. A anemia de Fanconi é um transtorno da medula óssea congênita ou hereditária a qual, frequentemente, progride para LMA.

2.4 PREVENÇÃO DA LEUCEMICA MIELÓIDE AGUDA

O câncer é uma enfermidade cuja possibilidade de prevenção é muito ampla. Segundo a OMS (2005), um terço das mortes por câncer nos Estados Unidos estão relacionadas com o uso de tabaco, dietas pobres, obesidade e sedentarismo . Todos estes fatores podem ser modificados. No entanto, ainda que se menospreze a possibilidade de se prevenir o câncer mediante mudanças de hábitos de vida. A grande maioria dos casos de LMA não pode ser prevenida uma vez que, suas causas ainda não são conhecidas. Os poucos casos associados à exposição à benzina são previsíveis com melhores condições nos ambientes de trabalho. Ainda é desconhecido o número exato de casos de LMA que poderiam ser prevenidos evitando a exposição aos poluentes de automóveis, porém não parece ser algo prático para a maioria das pessoas.

A alimentação é uma área muito propícia em que a sociedade em geral pode intervir de forma imediata para reduzir o risco de padecer de algum tipo de câncer. Vários

estudos proporcionam informações contraditórias, acerca dos fatores prejudiciais e benéficos de diferentes alimentos.

Os exercícios físicos podem reduzir a incidência de alguns tipos de câncer. De acordo estudiosos da Universidade de Harvard, se a totalidade da população aumentar seus níveis de atividade física e caminhar pelo 30 minutos por dia, ou gastar a energia equivalente em outra atividade, se poderia observar 15% de redução da incidência de câncer de colo.

2.5 INVESTIGAÇÃO E DIAGNÓSTICO PRECOCE

Para muitos tipos de câncer, o progresso alcançado nas áreas de investigação e tratamento é prometedora para a detecção precoce e buscar altas taxas de cura. O termo investigação refere ao uso regular de certos exames ou provas nas pessoas que não apresentam sintomas de câncer, porém que estão em risco de vir a desenvolvê-lo. Ter um alto risco de desenvolver um tipo de câncer significa que se possui certas características ou exposições, denominados fatores de risco, que fazem uma pessoa ser mais propensa a manifestar esse tipo de câncer que outras pessoas que não possuem estes fatores. Os fatores de risco são distintos para cada tipo de câncer. É importante conhecer estes fatores de risco porque alguns fatores podem sofrer modificações como o hábito de fumar ou os hábitos alimentícios, no que se refere ao risco de manifestar o câncer associado; e as pessoas que têm alto risco de manifestar câncer podem submeter-se a medidas de investigação recomendadas para esse tipo de câncer. Os cientistas continuam estudando quais características ou exposições se associam com o aumento do risco para vários cânceres, o que permitirá o uso de estratégias de prevenção, detecção precoce e tratamentos mais efetivos.

2.6 ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL RAMAN – UM BREVE HISTÓRICO

As metodologias referentes à espectroscopia são capazes de emitir informações detalhadas dos níveis de energia de diferentes materiais. Os espectros eletrônicos como a Fluorescência, são caracterizados por fornecer bandas largas e desestruturadas. Raman, através da espectroscopia vibracional, oferece dados mais detalhados e de melhor qualidade óptica em relação às demais técnicas, sendo conhecida pelos cientistas como “*a impressão digital das moléculas*”, visto a superioridade dos níveis de energia vibracional em relação aos níveis de energia eletrônica (FARIA; SANTOS, 1997).

Significativas conquistas tecnológicas vêm sendo obtidas no intuito de se desenvolver instrumentos que possam se mostrar com cada vez mais, elevada sensibilidade e especificidade associada a um baixo custo. Já há mais de 70 anos, que a Espectroscopia Raman, vem sendo utilizada por cientistas das diversas áreas do conhecimento, para a determinação de componentes moleculares de materiais diversos (MURPHY, T. *et al.*, 2000).

Foi pela confirmação dos primeiros estudos ópticos realizados por Smeal et al (1923) que Chandrasekhara Venkata Raman (1928) consolidou o que hoje é conhecido por efeito Raman. Através de um equipamento rudimentar composto por luz solar, espectroscópio de bolso e olho humano que funcionava como um detector, possibilitando à radiação visível interagir com a matéria estudada, estimulando uma vibração energética pelo fóton incidente o qual tinha como variantes o tipo de ligações moleculares e a massa molecular, resultou no efeito imaginado por Raman (WOODWARD, 1967; FARIA, 1997).

O *Efeito Raman* (RAMAN; KRISHNAN, 1928) teve sua primeira publicação na Revista *Nature* em 31 de Março de 1928, descrevendo um experimento no qual era possível visualizar o efeito inelástico da radiação. Através de um sistema de lentes especiais, Raman focalizou a luz solar num recipiente contendo um líquido purificado e ainda colocado um filtro azul impedindo a passagem de feixes de radiação e permitindo apenas a radiação de maior energia do espectro visível, que seria o laser vermelho.

O espalhamento inelástico da radiação permitiu visualizar um feixe de luz azul esverdeado perpendicular a direção da incidência do laser na amostra. Tal descoberta proporcionou a Chandrasekhara Venkata Raman, o prêmio Nobel de Física em 1930 (JAYARAMAN et al., 1989).

O espalhamento Raman de compostos inorgânicos vem sendo estudado por espectroscopistas, desde os anos 50, tendo estes trabalhos, pouco acrescentado aos conhecimentos de estruturas moleculares e compostos químicos (WOODWARD, 1967).

A classe científica, em especial os físicos, mostrou-se cada vez mais, interessada nesta técnica por se tratar de um mecanismo não destrutivo a estrutura molecular, o que permitia um ganho maior de informações a seu respeito. Já os químicos, na década de 40, utilizavam-se da espectroscopia Raman para obter maiores conhecimentos sobre a simetria molecular e suas ligações (JAYARAMAN, 1989).

O brasileiro Sérgio Porto trabalhando com Wood, em 1962, fizeram uso do laser pulsado de rubi como fonte de excitação a fim de obterem espectros Raman.

Kogelnik e Porto (1963), inseriram o uso de laser contínuo de Hélio-Neônio (He-Ne), na espectroscopia Raman num comprimento de onda igual a 632,8 nm.

As constantes inovações e resultados envolvendo a espectroscopia Raman, tornaram esta técnica uma ferramenta de grande valor tecnológico podendo ser acessada por não especialistas. (PORTO; WOOD, 1962; KOGELNIK; PORTO, 1963). Porém, os estudos biológicos através da espectroscopia Raman, tiveram como obstáculo à fluorescência, que é um sinal mais intenso que o Raman (GNIADCKA, 1997), sendo somente efetivamente utilizado em estudos teciduais nos anos 80, quando ocorreu a introdução do laser Raman numa faixa mais próxima do infravermelho (OZAKI et al, 1987).

Com as vantagens e eficiência de se utilizar à espectroscopia como Raman Ressonante, efeito Intensificado por superfície (SERS), Raman Inverso, Micro-Raman e espalhamento Raman Anti-Stokes Coerentes (CARS), várias áreas do conhecimento científico, focou e proporcionou o desenvolvimento de novos equipamentos que resultaram no surgimento de novas técnicas de análises Raman.

Tamanha evolução, dando especial atenção à Espectroscopia Raman, fez deste, um forte aliado dos cientistas para os estudos de ligações químicas moleculares diversas, detalhando estruturas moleculares e fazendo análises quantitativas de estruturas complexas (SALA, 1995).

2.6.1 EFEITO RAMAN

Segundo Duarte (2002), o espalhamento Raman é um fenômeno resultante da incidência de um feixe de luz em uma molécula, promovendo uma mudança na frequência que é espalhada na matéria. Parte da energia monocromática dos fótons incidentes é transferida para as moléculas de maneira que alguns elétrons pertencentes a outros níveis de energia se tornam excitados. Esse processo gera um aumento na frequência de vibração em algumas ligações desta molécula. Para

ocorrer a reversão deste processo é necessário que a molécula excitada volte ao seu estado fundamental, chamado de “*back-ground*”, para isto, basta que a energia seja novamente liberada ao meio.

A variação de freqüência entre energia emitida e espalhada pela molécula depende das ligações que a mesma possui e de sua massa.

A Espectroscopia Raman tem como base as mudanças da freqüência da luz, quando espalhada por uma molécula.

Assim podemos sintetizar que o Efeito Raman decorre do espalhamento inelástico da luz produzida por íons, átomos e moléculas, relacionado à mudança de freqüência da luz incidente quando espalhada.

2.6.2 ESPALHAMENTO RAMAN

Quando a luz espalhada possui o mesmo comprimento de onda que a luz incidente, dá-se o nome de Espalhamento Elástico ou *Rayleigh*. No entanto quando uma proporção desta luz espalhada apresenta comprimento de onda diferente daquela que incidiu à molécula, é denominada de Espalhamento Inelástico ou Raman. Neste caso, a matéria é conduzida à um nível de energia excitado, resultando numa perda de energia do fóton e o espalhamento em freqüências mais baixas chamadas de Stokes.

As mudanças de freqüências variam conforme características próprias de cada molécula em relação à quantidade de energia necessária para sua excitação.

O espalhamento Rayleigh, deriva de uma freqüência já conhecida, podendo esta ser anulada por filtros específicos, isolando assim, as freqüências inelásticas, identificando o Espectro Raman (BITAR, 2005).

No processo de espalhamento Raman, a radiação que interage com a molécula é espalhada com frequência discretamente modificada, correspondente à diferença de energia entre dois estados vibracionais.

Ocasionalmente pode ocorrer uma interação inelástica, conduzindo a molécula à um nível excitado de energia, posteriormente causando perda de energia do fóton, pois este é espalhado com frequências menores que a luz incidente, caracterizando as linhas de *Stokes*.

Quando uma matéria se encontra em nível excitado de energia, pode ocorrer uma pequena perda desta energia, devido a uma colisão desta com um fóton, levando os elétrons para um nível de energia ainda mais baixo, caracterizando os chamados *Anti-Stokes* (SALA,1995).

2.6.3 A RELAÇÃO DA ESPECTROSCOPIA RAMAN COM A ÁREA BIOLÓGICA – APLICABILIDADE

Os estudos na área da saúde são incessantes, quando nos referimos às descobertas de novos patógenos e suas patogenias, tratamentos e diagnósticos, no entanto as doenças clássicas com a leucemia e demais tipos de câncer, parecem ser o foco das atenções dos cientistas, o que exige que novos trabalhos e tecnologias sejam metas para a conquista de soluções.

A união das áreas Biológicas e Exatas colaborou para que a técnica de Espectroscopia Raman se traduzisse num instrumento forte e eficaz de análises, detecção e monitoramento de patologias *in vivo*, visto que existe um grande potencial de diagnóstico em tempo real (LONDON et al., 1992; FRANK et al., KELLER et al., 1994; FELD et al., 1995, MAHADEVAN-JANSEN, RICHARDS-

KORTUM, 1996; MANOHARAN; WANG; FIELD, 1996, MANOHARAN, 1998; HATA et al., 2000; PAPPAS, 2000; STONE et al., 2000; MOLCKOVSKY et al., 2003; CROW et al., 2004; GNIADOCKA et al., 2004; STONE et al., 2004).

As bases para uma técnica ser considerada ideal são: menor caráter invasivo e menor tempo de respostas e resultados. Entretanto, quando se trata de análises histopatológicas, devem ser consideradas as situações especiais como a de um tecido que foi retirado cirurgicamente de um corpo, para que só então, pudesse ser iniciado os procedimentos de análises e posteriormente diagnóstico, o qual depende do grau de diferenciação celular, anormalidades estruturais, principalmente nucleares e invasão, dentre outros (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000; HONDERMARCK et al., 2002).

Os espectros extraídos de material biológico são capazes de identificar subgrupos e patologias, tanto quanto propiciar estudos da interação celular com diferentes drogas e estágios patológicos, demonstrando ser um instrumento de grande valia na área biomédica. No entanto, faz-se necessária a elucidação de métodos de informações vibracionais extraídas de dos espectros, em especial, nas amostras que possuam alto grau de complexidade, como as biológicas (MAHADEVAN-JANSEN, 1995; MAHADEVAN-JANSEN; RICHARDS-KORTUM, 1996, MANOHARAN, 1998).

3 OBJETIVOS

Este trabalho de cunho científico tem como objetivo, submeter plasmas sanguíneos de pessoas saudáveis e doentes com LMA ao laser Ti:safira sintonizado em 890 nm, para obtenção de seus espectros Raman e compará-los de forma a se observar possíveis diferenças no comportamento gráfico de seus espectros e assim classificá-los como “perfil saudável” e “perfil leucêmico”, com vistas a um aprimoramento da técnica de espectroscopia Raman para sua atuação efetiva no monitoramento de pacientes, pós-tratamento quimioterápico.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Para este experimento, foram utilizados os plasmas sanguíneos de 18 indivíduos (n = 18), sendo homens e mulheres de faixa etária variando de 15 a 75 anos, dos quais 10 foram indivíduos sabidamente sadios e foram então classificados como grupo controle e 08 foram pacientes com diagnóstico de LMA.

As amostras foram obtidas a partir de material inicialmente colhido para análise laboratorial comum de um hospital da cidade de São José dos Campos, que é referência regional em doenças Onco-Hematológicas e aceitou participar da pesquisa, conforme autorização anexa, a qual contempla que o material doado é de destino exclusivamente científico, e que o mesmo não produzirá benefícios ou prejuízos ao seu doador, neste, representado pela sua Diretoria Clínica.

Aos doadores, foi apresentado um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), conforme o modelo anexo, no qual explicava o objetivo da pesquisa e os riscos, benefícios e prejuízos que a mesma poderia trazer à eles, o qual foi assinado por todos, após o completo entendimento do estudo.

As amostras, posteriormente, foram descartados de acordo com as Normas Regulamentadoras da Resolução RDC nº 306 (ANVISA), de 07 de dezembro de 2004 que dispõe sobre o Projeto de Gerenciamento de Resíduos em Serviços de Saúde.

A coleta do sangue periférico foi realizada respeitando todas as normas de biossegurança e anti-sepsia local, seguindo os passos:

1. Escolha da melhor veia do doador para punção, sendo a veia de escolha a intermédia da fossa cubital.

2. Garroteado o braço, não mais que um minuto e feita a anti-sepsia com algodão embebido em álcool 70%, realizou-se a punção através de método de punção venosa simples, utilizando agulhas 25x0,8 mm e tubos de plástico e capacidade de 4,5 ml, com vácuo contendo K₂EDTA (7,2 mg), anticoagulante e conservante para exames hematológicos.

3. Após a punção, retira-se o garrote e então agulha, seguida de pressão moderada com algodão seco, para evitar extravasamento sanguíneo no local da punção.

4. Os tubos com sangue foram homogeneizados suavemente por inversão e submetidos à centrifugação mecânica numa Centrífuga Kombat (Celm®) a 3500 RPM por 10 minutos, para a separação e obtenção dos plasmas sobrenadantes.

5. Os plasmas dos doadores foram então separados em tubos secos e estéreis e então, encaminhados para a UNIVAP, especificamente, para o Laboratório de Espectroscopia Raman do Instituto de Pesquisas e Desenvolvidos – IP&D, onde foram submetidos às análises espectrais usando um laser de Ti:safira sintonizado em 890 nm, um espectrômetro *Kaiser* f/1.8 e um detector de CCD refrigerado na região entre 600 a 1900 cm⁻¹.

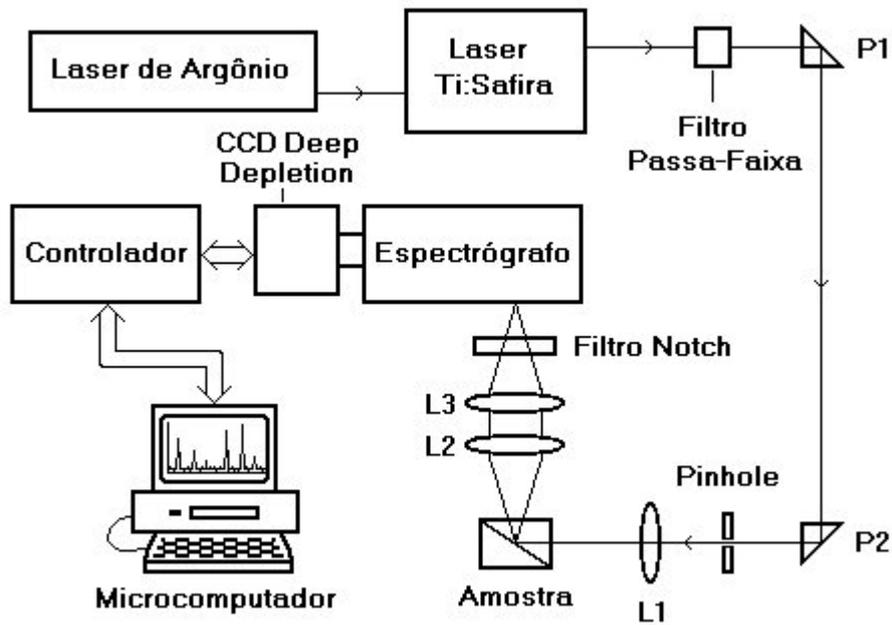


Figura 1. Diagrama de blocos ilustrando Espectroscopia Raman de bancada (SOUZA; PACHECO; VILAVERDE *et al.*, 2003)

A calibração inicial foi realizada utilizando Naftaleno como meio sólido e Álcool absoluto como meio líquido para obtenção da melhor região de espectro.

O laser vermelho aplicado à amostra de plasma sanguíneo, o sinal Raman espalhado na amostra é coletado utilizando-se filtros de rejeição do tipo *notch* e focalizados na entrada da fenda do espectrógrafo, o sinal foi então enviado para o espectrógrafo para dispersão e detectado por um CCD *Deep Depletion* refrigerado por nitrogênio líquido.

A luz indesejada foi filtrada por um filtro holográfico do tipo passa-faixa transmitindo somente o comprimento de onda desejado. Então, o laser de excitação foi focalizado na amostra após passar pela óptica de dispersão.

O detector CCD associado a um sistema de controle e um microcomputador foram usados para controlar, gravar e processar o sinal Raman.

Foram obtidas aquisições espectrais de 60 segundos para cada amostra em grade com $\lambda = 890$ nm, em ambiente totalmente escuro para evitar interferência de fótons, que não sejam os emitidos pela amostra em questão.

As amostras de indivíduos saudáveis serviram de base para calibração do aparelho bem como padrões para se traçar um perfil que recebeu o nome de “*Perfil Controle*”.

As amostras de indivíduos diagnosticados com LMA, foram então submetidas às aquisições de espectros, na tentativa de se formar um novo perfil que recebeu o nome de “*Perfil Leucêmico*”.

Quando contrastados, os perfis foram comparados e então analisados, conforme mostrado nos resultados deste trabalho.

Para este estudo, foram também considerados fatores como temperatura, tempo da análise após a coleta, situações não diretamente relacionadas às leucemias como lipídios ou macromoléculas que possam ser interferentes.

Foram ainda necessários, computadores e impressoras para registro dos resultados obtidos e banco de dados.

Os dados foram analisados e filtrados em software Origin 6.0 onde foram plotados os gráficos e exportados para Excel para melhor visualização.

4.1 ORIGIN 6.0

Os dados obtidos apresentam duas colunas que permitem o comando de plotagem de gráfico do programa Origin 6.0.

Os gráficos são submetidos a um polinômio de 3ª ordem que perfaz aproximadamente o seu traçado e que ao ser subtraído da origem leva a um gráfico

mais próximo da horizontal, conhecido como “base line”, do qual subtraindo a altura deste “base line” do eixo das abcissas, obtém-se um traçado tangente ao zero das ordenadas.

Utilizando a barra de ferramentas, foi possível limitar a região do espectro de interesse para o estudo, que vai de 600 a 1900 cm^{-1} , no eixo das abcissas.

Os picos foram fatores limitantes para o eixo das ordenadas que representa a Intensidade Vibracional, e sua variação foi de 0 a 5000, dependendo da amostra analisada.

Após a limitação da região pretendida, os gráficos foram submetidos a filtros do tipo Smoothing FFT filter de 30 pontos e exportados para o Excel para melhor visualização.

4.2 MICROSOFT OFFICE EXCEL 2003

Abrindo a planilha nova de Excel, buscou-se os dados colhidos pelo Espectrofotômetro Raman. A partir destes dados foram, os mesmo foram plotados de forma a se comparar todos os gráficos do chamado “Perfil Controle” e o mesmo ocorreu com os gráficos do chamado “Perfil Leucêmico”. Após isso, os dados foram colocados em colunas e calculadas suas médias para ambos os perfis.

Com as médias, plotou-se novo gráfico de forma isolada, para cada perfil, e sobrepostos a fim de contrastá-los e evidenciar suas diferenças.

5 RESULTADOS

Após a aquisição dos espectros, elaboração e tratamento gráfico dos mesmos temos os seguintes resultados:

5.1 PERFIL SAUDÁVEL

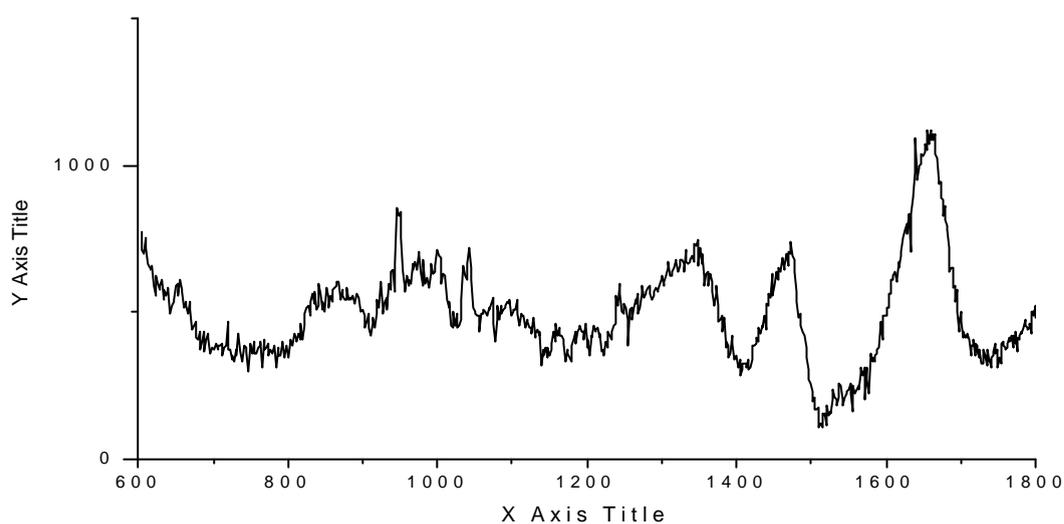


Figura 2. Perfil plasmático saudável.

5.2 PERFIL LEUCÊMICO

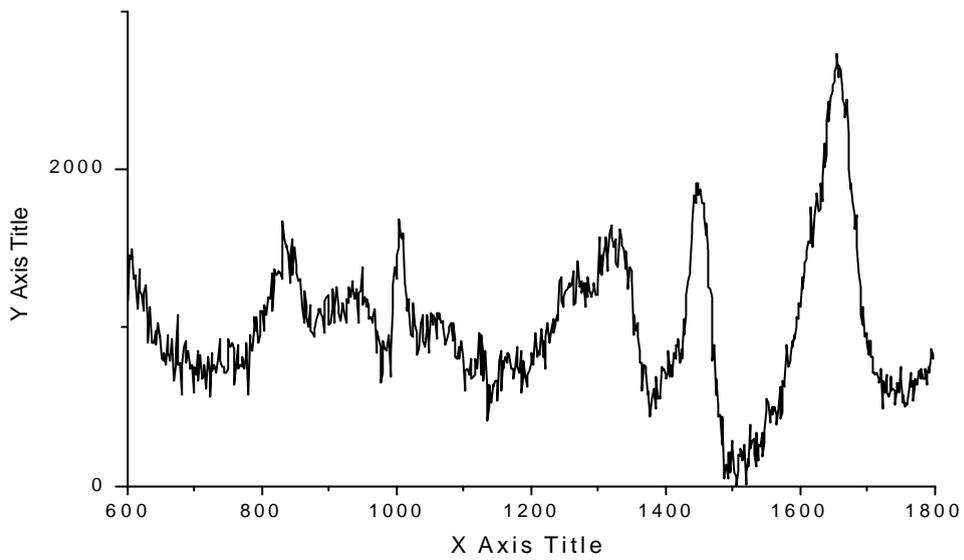


Figura 3. Perfil plasmático leucêmico.

5.3 COMPARATIVO: LMA x SAUDÁVEL

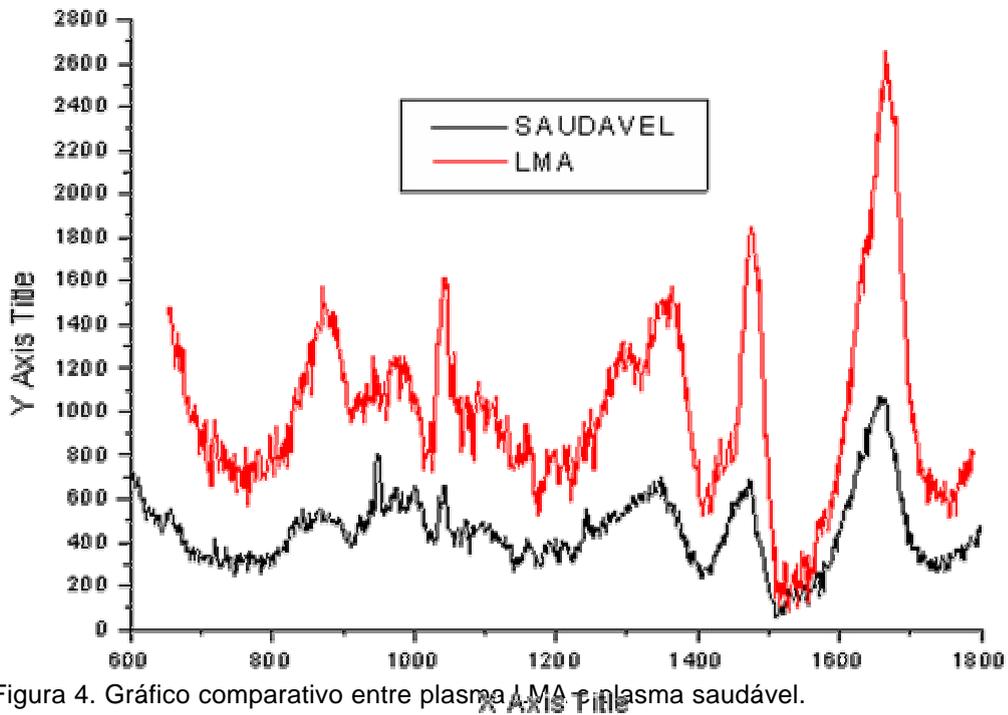


Figura 4. Gráfico comparativo entre plasma LMA e plasma saudável.

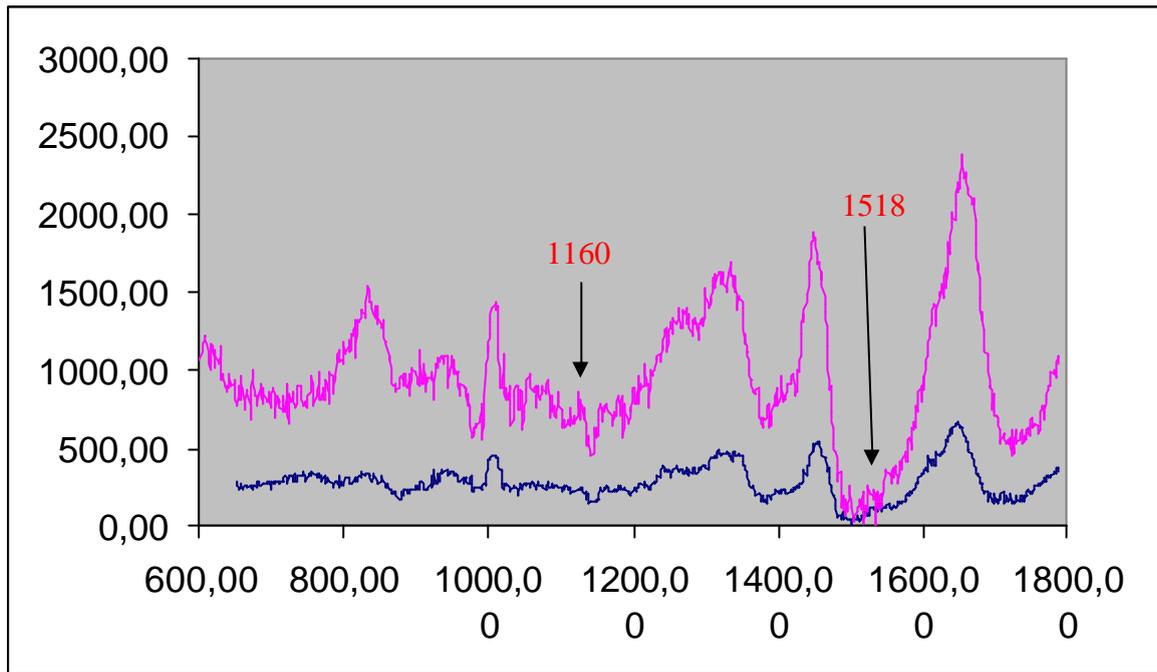


Figura 5. Gráfico filtrado do paciente com LMA (rosa) em relação ao indivíduo saudável (azul), apresentando diferenças nos picos das regiões de 1160 e 1520 cm^{-1}

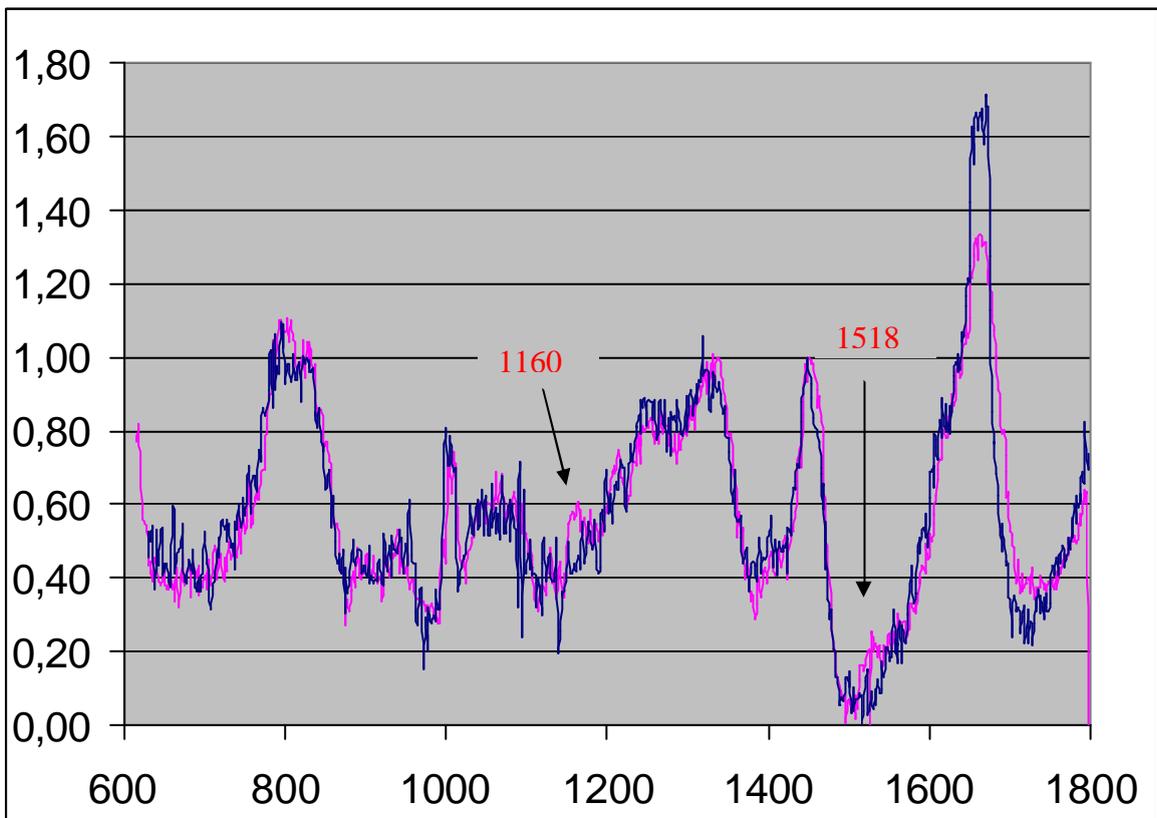


Figura 6. Gráfico normalizado do paciente com LMA (rosa) em relação ao indivíduo saudável (azul), apresentando diferenças nos picos das regiões de 1160 e 1518 cm^{-1}

6 DISCUSSÃO

A aquisição de espectros Raman do plasma, já fora antes descrito por Pereira, A., et al, (2005).

No entanto, a padronização de pacientes com Leucemia Mielóide Aguda, até o momento não havia sido explorada pela sociedade científica.

Procuramos neste trabalho, utilizar a Espectroscopia Raman, como uma ferramenta de grande potencial, sensibilidade e especificidade; para conhecermos molecularmente os componentes plasmáticos, em especial as proteínas, de doentes com LMA.

Enfrentamos dificuldades quanto a elaboração de protocolos para as análises, desde coleta, processamento da amostra e sua conservação e aquisição dos espectros.

Inicialmente coletamos o sangue em tubo plástico, sistema fechado e vácuo, contendo EDTA, centrifugamos as amostras a 3500 RPM por 10 minutos, com o objetivo de separar completamente os elementos figurados do não figurado, plasma, e alíquotamos a amostra em 3 tubos ao abrigo da luz.

Os três tubos tinham os seguintes destinos: um deles, o plasma fresco foi analisado em até 6 horas após a coleta, outro foi congelado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por cinco dias e o terceiro, foi congelado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 dias.

Verificamos que as análises dos tubos contendo plasma fresco e o congelado por cinco dias, apresentaram resultados espectrais comuns entre si, No entanto, o tubo contendo plasma congelado por 30 dias apresentou um perfil gráfico com algumas diferenças.

Frente ao ocorrido, decidimos enfim que, as amostras de plasmas estariam preservadas com todas as suas características *in vitro* semelhantes às *in vivo*,

quando submetidas à análise imediata ou congelada em até cinco dias, descartando, portanto a possibilidade de fazê-la em amostras conservadas em tempo superiores ao cinco dias como no caso do terceiro tubo (30 dias) que apresentou divergências significantes.

É oportuno observar que, proteínas são sensíveis a altas temperaturas, pois o calor causa desnaturação das mesmas.

A partir deste princípio básico bioquímico, estipulamos então que, toda amostra a ser submetida à Espectroscopia Raman, deveria ser centrifugada para separação do plasma e congelada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ imediatamente, para evitar o risco de desnaturação protéica, visto que, sua análise nem sempre poderia ser realizada em curto espaço de tempo após a coleta do material.

A evidenciação das diferenças entre os espectros saudáveis e doentes surge para a sociedade médica e para a população em geral como um avanço na área de monitoramento da doença residual mínima em pacientes com LMA tratados por quimioterapia e levados à remissão.

A Espectroscopia Raman aparece como mais uma técnica a ser somada às demais praticadas atualmente, no seguimento destes pacientes.

O grande potencial de sensibilidade apresentado por esta técnica, atuaria no monitoramento dos pacientes na fase de remissão de forma a detectar precocemente alterações no perfil gráfico, sugerindo exames mais detalhados para a confirmação da recidiva.

É comum acompanhar os pacientes em remissão através de exames físicos e hemogramas, e em apenas alguns casos suspeitos, exames mais detalhados são solicitados.

Todavia, alguns casos de recidivas subclínicas já foram observados, confirmados pela presença de clones leucêmicos em franca atividade na medula óssea (ARTHUR, L. et al., 2003), ou mesmo que exames clínicos denunciassessem a recidiva assim como a presença de células blásticas no sangue periférico, parecem apontar para uma fase avançada da retomada do processo do quadro recidivante, o que fomenta o desejo de se descobrir uma metodologia que pudesse detectar esse processo de forma precoce, a fim de solicitar exames mais detalhados para confirmação e decisão pelo esquema terapêutico.

Tal condição levaria o paciente em questão a benefícios no seu tratamento e aumentando, sobretudo, as taxas de sobrevivência por consequência do sucesso e da precocidade do tratamento.

No entanto, é necessário que se registre as limitações do sistema de Espectroscopia Raman, das quais se destacou a presença de um sinal emitido pela própria cubeta porta-amostra, quando submetida ao laser Raman, mesmo estando vazia.

Percebemos que esse sinal emitido pela cubeta se faz presente em grande parte das análises de quaisquer amostras, ficou conhecido o sinal emitido por ela conforme a Figura 7, abaixo.

A Figura 8 mostra o sinal da cubeta, quando contrastado com outras duas amostras, uma com interferência da cubeta e outra sem.

Nossos experimentos sofreram esses problemas, como mostra a Figura 9, o que necessitou a realização de filtragens e medidas matemáticas para a inibição desse sinal.

Portanto, essas filtragens e medidas matemáticas passaram a fazer parte da rotina de confecção dos gráficos de nossos ensaios, mas tememos que isso possa

eliminar algum sinal que seria importante para a análise nessas regiões da cubeta, evidenciando a limitação da técnica de Raman.

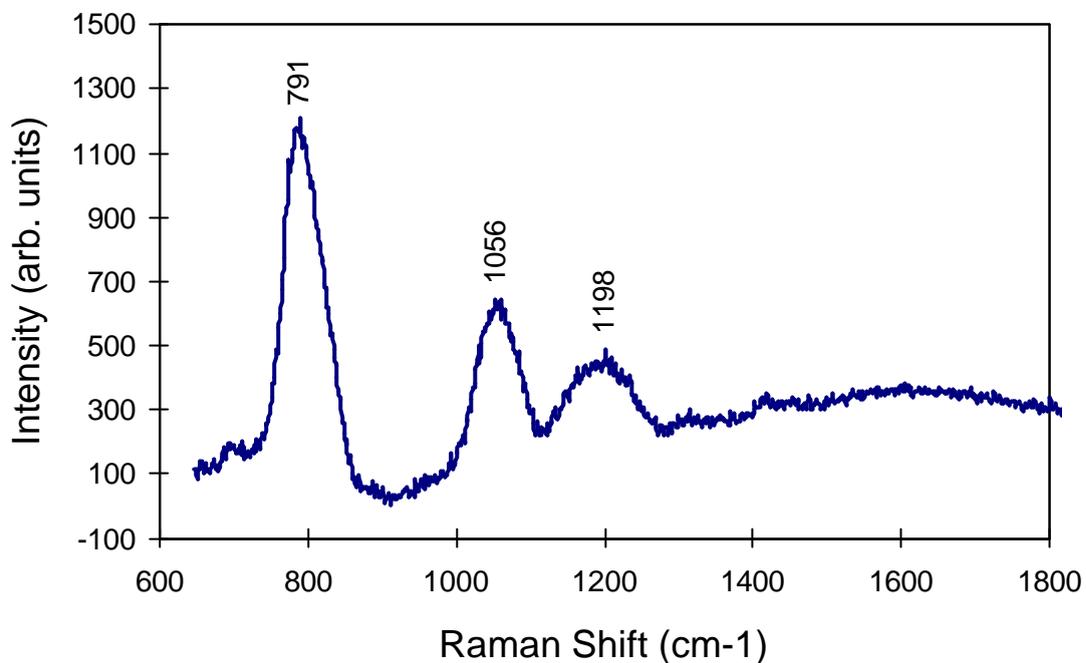


Figura 7. Gráfico da cubeta, Estes picos são causas de interferências na aquisição de espectros.

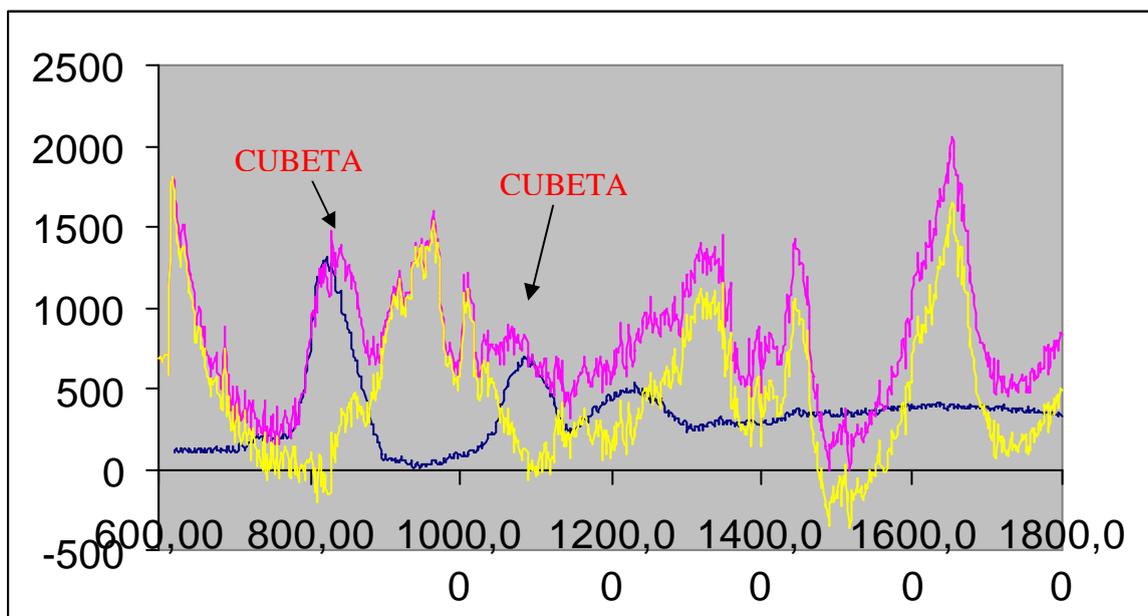


Figura 8. Gráfico que apresenta o espectro Raman de um plasma sem interferência (amarelo) sobreposto a uma amostra com interferência da cubeta (rosa) e um só da cubeta (azul).

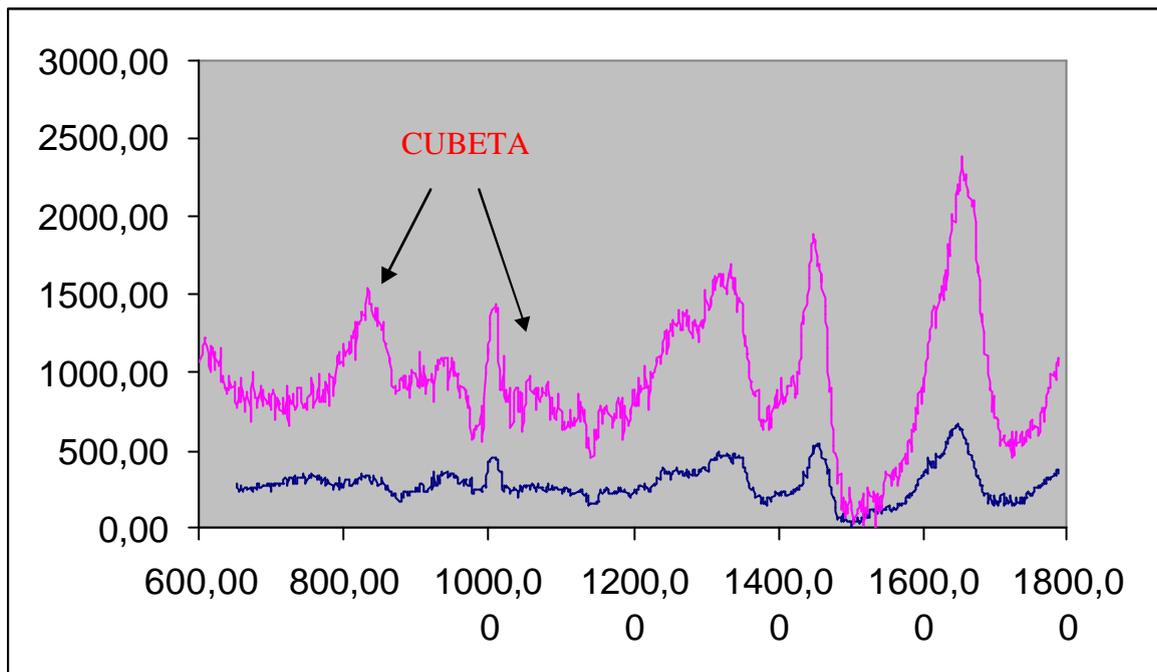


Figura 9. Gráfico filtrado do paciente com LMA (rosa) em relação ao indivíduo saudável (azul), mostrando a interferência da cubeta.

7 CONCLUSÃO

Frente ao exposto, concluimos que existem diferenças entre um “Perfil Saudável” e um “Perfil Leucêmico” de plasmas sanguíneos submetidos a análises por Espectroscopia Raman.

Após passar por tratamentos matemáticos, no intuito de minimizar interferências, entre elas a própria cubeta porta-amostra, padronizou-se que essas diferenças se apresentam em forma de picos nas regiões 1160 cm^{-1} e 1518 cm^{-1} , referentes a carotenóides.

Tais picos puderam ser vistos em indivíduos com Leucemia Mielóide Aguda, mas não nos indivíduos saudáveis.

Constatou-se, portanto, que a Espectroscopia Raman, apresenta alta sensibilidade para a detecção de moléculas em faixas do espectro que podem ser características de uma determinada patologia, como vimos na Leucemia Mielóide Aguda, ainda que sobre um efeito qualitativo.

8 ESTUDOS FUTUROS

O trabalho realizado nesse projeto de dissertação de mestrado deve ser encarado como um piloto para novos estudos a respeito do comportamento molecular do plasma de pacientes com LMA e sua relação com a faixa de espectral relacionada aos carotenóides.

É fato que a técnica necessita ser aprimorada e novos protocolos devem ser confeccionados, acrescentando ao processo formas de análises não somente qualitativo como visto neste trabalho, mas também quantitativo.

Sugerimos que se estabeleça relação entre os tipos de Leucemias Mielóides Agudas, para a obtenção de um perfil único, ou mesmo de perfis específicos para cada uma das leucemias mielóides agudas conhecidas e que variam de: LMA-M1 a LMA-M7.

Faz-se necessário também, que seja inibido o sinal de interferência da cubeta para obtenção de resultados de maneira mais rápida, fácil e confiável.

REFERÊNCIAS

ABRALE. www.abrale.org.br/apoio_paciente/publicacoes/manuais/leucemia_mieloides_aguda.pdf. Acesso: Set. 2006.

ARTHUR, L. et al. Cariótipo em Leucemia Mielóide Aguda: Importância e tipo de alteração em 30 pacientes ao diagnóstico. *Disciplina de Hematologia e Hemoterapia da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP – EPM, São Paulo, SP. Rev. Assoc. Med. Bras.* v.49 n.2 São Paulo apr./june 2003.

BITAR, R.A. **Estudo de tecido mamário humano por espectroscopia FT-Raman**. 2004. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba. 2004.

CALLERA, F. et al. High prevalence of morphological subtype FAB M1 in adults with de novo acute myeloid leukemia in São José dos Campos, São Paulo. *São Paulo Med J.*, v.124,n.1,p.45-47. jan.2006.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Patologia Estrutural e Funcional**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2000. p.1485.

CROW, P. et al. The use of Raman spectroscopy to identify and characterize transitional cell carcinoma *in vitro*. *Bju Internacional*, v.9, n.93, p. 1232-1236, 2004.

DUARTE, J. **Comparação qualitativa e quantitativa da detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* da classe IgG em soros de gatos domésticos através da análise sorológica via ELISA e Biópsia óptica**. 2002. 60 F. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba. 2002.

FARIA, D.L.A ; SANTOS, L.G.C.A. A demonstração sobre o espalhamento inelástico da luz: repetindo o experimento de Raman. *Química Nova*, v.3, n.20, p.319-323, 1997.

FELD, M.S. et al. Detection and characterization of human tissue lesions with near infrared Raman spectroscopy. In: LAKOWICZ, J. R. , ed. **Advances in Fluorescence Sensing Technology, VII. Proc. SPIE**, 2388, p.99-104, 1995.

FRANK, C.J. et al. Characterization of human breast biopsy specimens with near-IR Raman spectroscopy. *Anal Chem.*, n.3, p.319-326, 1994.

FURUKAWA, Y. et al. Overexpression and amplification of the CDC2 gene in leukaemia cells. *Br J Haematol.*, v. 90, p. 94-99, 1995.

GNIADDECKA, M. et al. Melanoma diagnosis by Raman spectroscopy and neural network: Structure alterations in proteins and lipids in intact cancer tissue. *J. Invest Dermatol.* n.122, v.2, p.443-449, 2004.

GUYTON, A C. **Fisiologia Humana e Mecanismos das Doenças**. 5.Ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1993, p.210-220

HATA, T.R. et al. Non-invasive Raman spectroscopy detection of carotenoids in human skin. *J. Invest. Dermatol.*, v.115, n.1, p.441-448, 2000.

HONDERMARCK, H. et al. Functional proteomics of breast cancer for signal pathway profiling and target discovery. *J. Mammary Gland. Biol. Neoplasia*, v.7, n.4, p.395-405, 2002.

INCA - Instituto Nacional do Câncer – Ministério da Saúde do Brasil. **Estimativa 2006 – Incidência de Câncer no Brasil**. www.inca.gov.br/estimativa/2006/versaofinal.pdf. Acesso: 06Out.2006.

JAYARAMAN, ACV. *Raman – A Memoir*. New Delhi: Affiliated East – West Press, 1989.

KELLER, S. et al. Application of near-infrared-Fourier transform Raman spectroscopy in medical research. *Journal Raman Spectroscopy*, v.25, n.7-8, p.663-671, 1994.

KOGELNIK, H; PORTO, SPS. **Continuous Helium-Neom Red Laser as a Raman Source**. *Journal of Optical Society of America*, v.53,n.12,p.1446-1447, 1963.

KWAK, J.Y, et al. The comparative analysis of serum proteomes for the discovery of biomarkers for acute myeloid leukemia. *Exp Hematol.* v.32, n.9, p.836-842, Sep. 2004.

LINET, M.S. **The leukemias: epidemiologic aspects**. New York:Oxford University Press, 1985. p.20.

LONDON, S.J. et al A prospective study of begin breast disease and the risk of breast cancer. *JAMA*, v.267, n.7, p.941-944, 1992.

MAHADEVAN-JANSEN, A. et al. Near-infrared Raman spectroscopy for the detection of cervical precancers. *Appl. Spectroscopy*, 1995.

MAHADEVAN-JANSEN, A; RICHARDS-KORTUM, R. Raman spectroscopy for the detection of cancer and precancer. *J. Biomed. Optics.*, v.1, n.1, p.31-71, 1996.

MAHADEVAN-JANSEN, A. et al. Near-infrared spectroscopy for in vitro detection of cervical precancers. *Photocem. Ohotobiology.* v.68, n.1, p.123-32, 1998.

MANOHARAN, R; WANG, Y; FIELD, M.S. Histochemical analysis of biological tissues using Raman spectroscopy. *Spectrochimical Acta Part A*. n.52, p.215-49, 1996.

MANOHARAN, R. Raman spectroscopy and fluorescence photon migration for breast cancer diagnosis and imaging. *Photochemistry and Photobiology*. n.67, p.15-22, 1998.

MOLCKOVSKY, A. et al. Diagnostic potential of near-infrared Raman spectroscopy in the colon: differentiating adenomatous from hyperplastic polyps. *Gastrointestinal endoscopy*, v.3, n.57, p.396-402, 2003.

MURPHY, T. et al. Surface-enhanced Raman scattering (SERS) system for continuous measurements of chemical in sea-water. *Journal of Raman Spectroscopy*, v.31, n.10, p.943-948, 2000.

OZAKI, Y. et al. Raman Spectroscopy study of cataract formation: Emory mouse cataract. *Applied Spectroscopy*, v.41, n.4, p.597-605, 1987.

PAPPAS, D. Raman spectroscopy in bioanalysis, *Talanta*, n.51, p.131-144, 2000.

PEREIRA, A. et al. Caracterização espectral de concentrado de plaquetas pela espectroscopia FT-Raman. In: ENCONTRO LATINO AMERICANO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 9., ENCONTRO LATINO AMERICANO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 5. **Anais de Trabalhos Completos**. São José dos Campos: UniVap, p.1322.

PETERS, G. The D-type cyclins and their role in tumorigenesis. *Journal of Cell Science*; v.18, p.89-96, 1994.

PORTO, S.P.S. WOOD, D.L.J. Estudo Espectroscópico Vibracional de Complexos de Ni (II) com os Aminoácidos Serina, Glicina e Ácido Guanidoacético. **Journal of Optical Society of America**, v.1, n.52, p.251-252, 1962.

RAMAN, C.V; KRISHNAN, K.S. A new type of secondary radiation. *Nature*, n.121, p.501, 1928.

SALA, O. **Fundamentos da Espectroscopia Raman e no Infravermelho**. São Paulo: Editora da Universidade Estadual Paulista, 1995. p.224.

SOUZA, F.B et al. Evaluacion de ácido láctico intra-muscular a través de espectroscopia Raman: novas perspectivas en medicina del deporte. *Rev Bras Med Esporte*, v.9, n.6, p.388-395. nov./dic. 2003.

STONE, N. et al. Raman spectroscopy for early detection of laryngeal malignancy: preliminary results. *Laryngoscope*, v.110, n.1, p.1756-63, 2000.

STONE, N. et al. Raman spectroscopy for identification of epithelial cancer. *Faraday Discussions*, n. 126, p.141-157, 2004.

VERRASTRO, T; LORENZI, T.F.; NETO, SW. **Hematologia e Hemoterapia – Fundamentos de Morfologia, Fisiologia, Patologia e Clínica**. São Paulo: Editora Atheneu, 1996, p.26-29.

VERRASTRO, T; LORENZI, T.F; WENDEL, SW. **Hematologia e Hemoterapia – Fundamentos de Morfologia, Fisiologia, Patologia e Clínica**. São Paulo: Editora Atheneu, 1996, p.3-4.

WOODWARD, L.A. The Raman effect. In: SZYMANSKI, H.A. **Raman Spectroscopy, teory and pratice**. New York: Plenum Press. 1967.p.1-43.

ANEXO A

- TERMO DE AUTORIZAÇÃO -

Pelo presente instrumento, atendendo às exigências legais, a Obra de Ação Social – Hospital Pio XII, CNPJ: 60.194.990/0006-82, Inscrição Estadual: Isento, sito à Rua Paraguassú, nº 51, Bairro Santana, São José dos Campos, através de seu Diretor Clínico, o Dr. Fernando Callera, médico hematologista, CRM 74971, portador da cédula de identidade 13725634, após leitura minuciosa do Projeto de Pesquisa para Mestrado, devidamente explicado pelos profissionais envolvidos, em seus mínimos detalhes, ciente dos procedimentos aos quais as amostras, objeto da pesquisa, serão submetidos, não restando quaisquer dúvidas a respeito do lido e explicado, firma sua AUTORIZAÇÃO, concordando em participar da pesquisa proposta, doando as amostras de sangue, inicialmente colhidas para análises laboratoriais de rotina e que posteriormente seriam descartadas, seguindo seus procedimentos habituais, contemplados em seu plano de gerenciamento de resíduos no serviço de saúde, segundo a RDC nº 306 (ANVISA), de 07 de dezembro de 2004.

Fica claro que a Instituição doadora, através de sua diretoria clínica pode a qualquer momento, revogar sua AUTORIZAÇÃO e deixar de participar desta pesquisa e ciente de que todas as informações obtidas tornar-se-ão confidenciais e serão guardadas por força de sigilo ético e profissional.

E, por estarem de acordo, assinam o presente termo.

São José dos Campos, _____ de Junho de 2006.

Diretor Clínico da Obra de Ação Social
Hospital Pio XII
Representante Médico legal da Instituição
doadora.

Adriano Moraes da Silva
Aluno de Mestrado em Bioengenharia
UNIVAP
Pesquisador

ANEXO B

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu _____ portador do RG nº _____, residente à R. _____, nº _____, Bairro _____, na cidade de _____, consinto em participar da Pesquisa Científica a ser realizada por Adriano Moraes da Silva (RG nº 25.093.458-9).

Recebi esclarecimentos de que o projeto de pesquisa denominado IDENTIFICAÇÃO DO ESPECTRO PROTÊICO PLASMÁTICO DE PACIENTES COM LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA ATRAVÉS DE ESPECTROSCOPIA RAMAN tem por finalidade promover estudos sobre o perfil protéico no plasma sanguíneo de indivíduos ditos saudáveis sob o aspecto hematológico e de pacientes diagnosticados com leucemia mielóide aguda, e através de análises comparativas entre os dois grupos citados, evidenciar diferenças que possam servir de marcadores para o acompanhamento da doença no período de tratamento e remissão dos indivíduos tratados.

O presente estudo será realizado seguindo as etapas:

1. Identificação dos indivíduos do Grupo Controle (saudáveis) e do Grupo de Estudo (leucêmicos);
2. Apresentação deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aos participantes, assim como sua aprovação;
3. Colheita das amostras de sangue por punção de veia periférica, através de técnica a vácuo, seguindo as orientações e normas de biossegurança;
4. Processamento das amostras, centrifugando-as para separação do plasma;
5. Transporte para o Laboratório de Espectroscopia Raman do IP&D – Univap;
6. Submeter as amostras para aquisição dos espectros através do Laser Raman e coleta dos dados;
7. Tratamento dos dados obtidos através da linguagem computacional MatLab e
8. Análise dos dados tratados para conclusões e discussão.

Durante a execução do projeto, será avaliada a possibilidade de se evidenciar diferenças entre os perfis protéicos de pacientes com leucemias em relação aos indivíduos saudáveis. O estudo proposto não oferece benefícios pessoais a cada um dos participantes, mas espera contribuir para a ciência da saúde visando o bem da humanidade.

O trabalho será executado sob a supervisão do aluno supra citado.

Este consentimento não implica na impossibilidade de desistência a qualquer momento, de acordo com interesses próprios, ausentes de penalização ou de acarretar quaisquer tipos de ônus.

O sigilo e a privacidade das informações obtidas durante a execução deste projeto serão totalmente garantidas, não havendo custo para a participação.

Colocamo-nos a disposição para sanar eventuais dúvidas ou prestar quaisquer esclarecimentos, durante qualquer momento do desenvolvimento do projeto, através de contato com os pesquisadores por via telefônica através dos números de telefones: (12) 9104-0508, 12-3911-7487, 12-3928-3325, 12-3928-3300, 12-3947-1124, 12-3947-1121 ou pessoalmente na Rua das Pescadas, 75 apto. 33, Pq Residencial Aquarius, CEP 12.246-291 – São José dos Campos – SP ou no Laboratório de Espectroscopia Raman, no Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento

– IP&D, Univap, Campus Urbanova, Rua Shishima Hifumi, 2911, Urbanova, CEP 12.244-000 – São José dos Campos – SP

São José dos Campos, ____ de _____ de 2006.

Fui suficientemente informado das disposições que li e ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes, bem como minha isenção nas despesas ou custos adicionais, durante todas as etapas dos procedimentos.

Ficou claro também que, em caso de possíveis danos físicos, o pesquisador será responsabilizado pelos ressarcimentos cabíveis.

Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento sem penalidades ou prejuízos.

Assinatura participante

Assinatura Testemunha

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido deste indivíduo para participação neste estudo.

Assinatura Pesquisador

ANEXO C

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVAP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo n.º H126/CEP/2006, sobre "*Identificação do espectro proteico plasmático de pacientes com leucemia mielóide aguda através da espectroscopia Raman*", sob a responsabilidade do Prof. Adriano Moraes da Silva, está de acordo com os Princípios Éticos, seguindo as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo seres humanos, conforme Resolução n.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e foi **aprovado** por esta Comissão de Ética em Pesquisa.

Informamos que o pesquisador responsável por este Protocolo de Pesquisa deverá apresentar a este Comitê de Ética um relatório das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação.

São José dos Campos, 07 de novembro de 2006



PROF. DR. LANDULFO SILVEIRA JUNIOR
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa da Univap