

JÚLIA DE ALMEIDA VASQUES

**INIBIÇÃO MEDIADA PELO EDTA PROTEGE O DNA FETAL LIVRE DE CÉLULAS
DE DEGRADAÇÃO *EX-VIVO* EM AMOSTRAS DE SANGUE**

BRASÍLIA, 2014

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

JÚLIA DE ALMEIDA VASQUES

**INIBIÇÃO MEDIADA PELO EDTA PROTEGE O DNA FETAL LIVRE DE CÉLULAS
DE DEGRADAÇÃO *EX-VIVO* EM AMOSTRAS DE SANGUE**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Barcelos Barra

Brasília

2014

Dedico este trabalho,

Aos meus pais, Sandra e Horácio, por todo apoio para o desenvolvimento deste trabalho, e incentivo na continuidade de minha formação acadêmica, e também àqueles que acreditam e incentivam a pesquisa em nosso país, permitindo o avanço das futuras gerações.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, por me proporcionar saúde e condições para que eu continuasse na caminhada do aprendizado moral, intelectual e espiritual.

Aos meus pais, Sandra e Horácio, por todo o amor incondicional, por todos os momentos em que precisei de conselhos, palavras de ânimo, ou simplesmente “colo” para apoiar-me nos momentos mais difíceis.

Ao meu irmão Luís Gustavo, pela amizade e carinho, e por trazer meu sobrinho Bernardo sempre pra perto, para alegrar nossa casa.

Ao meu orientador, prof. Dr. Gustavo Barra, por todos os ensinamentos, conselhos, paciência e pela orientação para que saísse este trabalho final. Agradeço por ser exemplo de profissional, a quem muito admiro e tenho como referência.

Ao laboratório Sabin, especificamente às Dras Sandra Costa, Janete Vaz, Lídia Abdala e Graciella Martins, pelo apoio financeiro, flexibilidade em meus horários para a realização das disciplinas, mas principalmente por serem exemplos de mulheres e cidadãs que incentivam a pesquisa em nosso país, fazendo com que profissionais jovens como eu tenhamos reconhecimento no meio acadêmico e científico, oportunidade que me foi dada e a qual terei gratidão pelo resto da vida.

Aos colegas do setor de biologia molecular pela convivência durante o período em que estive no laboratório, em especial à Dra Lara, a quem muito estimo e que tive a felicidade de conhecer melhor, e que permitiu a realização das proveitosas reuniões do clube científico, e também, pela oportunidade de participação no congresso americano de análises clínicas (AACC) para apresentação do trabalho de nosso grupo, conseguindo fundos financeiros para que isso fosse possível.

À universidade de Brasília (UnB), pela oportunidade de capacitar-me em uma instituição séria e de renome, bem como aos professores que contribuíram para meu crescimento intelectual.

Às minhas colegas de mestrado, Ticiane e Camilla, pela ajuda em diversos momentos, compartilhando conhecimento, e também pela amizade que se estabeleceu entre nós, independente da vida acadêmica.

Aos demais, em que algum momento contribuíram mesmo que de forma indireta para que fosse possível a conclusão deste trabalho.

RESUMO

O impacto pré-analítico da atividade DNase existente no sangue sob o DNA livre de célula (cfDNA) não está claro e nem foi bem estudado. Como o cfDNA fetal (cffDNA) se origina da placenta, o aporte termina quando o sangue materno é colhido e a sua quantidade não aumenta na amostra *ex-vivo*, ao contrário do que pode ocorrer com o cfDNA genômico. Portanto, o cffDNA é uma ferramenta sensível para avaliar a atividade e o impacto *ex-vivo* destas enzimas que degradam DNA, sendo este o objetivo do presente estudo.

O plasma-EDTA e o soro de mulheres grávidas de fetos masculinos foram submetidas à diferentes condições de temperaturas, de modo a investigar a estabilidade do cffDNA. Em seguida, a ação de uma DNase exógena sobre o cffDNA foi avaliada tratando ou não as amostras com DNase I. Em todas as situações, o cffDNA foi quantificado utilizando sequências-alvo específicas do cromossomo Y (DYS-14). Além disso, desenvolveu-se um ensaio baseado na degradação de uma sonda de hidrólise para qPCR com a finalidade de medir a atividade DNase endógena diretamente em amostras primárias. Por fim, uma diluição seriada de EDTA foi adicionada ao plasma fresco (não-anticoagulado) e ao soro antes do ensaio para medir a atividade DNase endógena com a finalidade de pesquisar a inibição das DNases sanguíneas mediada por este anticoagulante.

Observou-se uma menor quantidade de cffDNA no soro em relação ao plasma. Além disso, uma maior diminuição do cfDNA mediada pela temperatura foi observada no soro quando comparada ao plasma-EDTA. O tratamento com a DNase I não alterou o cffDNA no plasma, mas causou a sua degradação total no soro. Adicionalmente, a atividade DNase endógena foi de 14,9 vezes maior no soro quando comparada ao plasma-EDTA. Por fim, a adição de doses crescentes de EDTA ao plasma fresco e ao soro resultaram em uma inibição dose-depedente da atividade DNase endógena nestas amostras.

Em conclusão, cffDNA está protegido de degradação mediada pela temperatura no plasma-EDTA. DNases endógenas e exógenas estão mais ativas no soro e o anticoagulante EDTA inibe as DNases do sangue conferindo proteção *ex-vivo* ao cffDNA.

Palavras-chave: DNA livre de células; DNA fetal livre de células; Plasma materno; Soro maternal; DNases; Dnases sanguíneas

ABSTRACT

The preanalytical impact of the blood's nuclease activity over the cell-free DNA in clinical samples is neither clear nor well studied. Since cell-free fetal DNA (cfDNA) originates from placenta, the supply is lost after maternal blood draw and its quantity does not increase in the ex-vivo sample, as the genomic DNA. Thus, cfDNA is a sensitive tool to evaluate the activity and the impact of the DNA degrading enzymes present in the blood and it was the aim of the present study. We develop a DNase activity assay based on a qPCR hydrolysis probe degradation in order to investigate the endogenous DNA degrading activity of the crude specimens. EDTA-plasma and serum from women bearing a male fetus were submitted to this assay. Moreover, the action of an exogenous DNase over cfDNA was investigated by samples treatment with DNase I. A serial dilution of EDTA was added to a fresh plasma (nonanticoagulated) and serum before the endogenous DNase activity assay to investigate the EDTA-mediated inhibition of blood's DNases. Furthermore, EDTA-plasma and serum were exposed to different temperature conditions to investigate the cfDNA stability. In all instances, the male cfDNA quantities were measured by qPCR targeting the Y chromosome-specific sequences (DYS-14). The endogenous nuclease activity was 14.9-fold higher in serum compared to EDTA-plasma. The DNase I treatment did not alter the cfDNA yields in EDTA-plasma, but degrades it extremely low levels in serum. Increasing doses of EDTA to fresh plasma and serum resulted in a stepwise inhibition of their DNase activities. Additionally, there was lower cfDNA yields in serum compared to the paired EDTA-plasma. Moreover, we observed a much more pronounced temperature-mediated decrease on the cfDNA amount in serum compared to EDTA-plasma. The cfDNA is protected from a temperature-triggered degradation in EDTA-plasma. Exogenous and endogenous nucleases were more active in serum and the anticoagulant EDTA inhibits blood nucleases conferring an ex-vivo protection to cfDNA.

Key words: Cell-free DNA; Cell-free fetal DNA; Maternal plasma; Maternal serum; DNase; blood's DNase

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ensaio fluorométrico para detecção da atividade DNase

Figura 2 – Representação esquemática do ensaio para medir a atividade DNase endógena

Figura 3 – Resultado do ensaio para atividade DNase endógena

Figura 4 – Comparação entre o último ponto de leitura (Δ RN) do ensaio para atividade DNase endógena em amostras pareadas de soro e plasma-EDTA

Figura 5 – Efeito do tratamento com uma DNase exógena (DNase I) sobre o cfDNA fetal no plasma-EDTA e soro

Figura 6 – Inibição dose-resposta mediada pelo EDTA da atividade DNase endógena no plasma fresco

Figura 7 – Inibição dose-resposta mediada pelo EDTA da atividade DNase endógena no soro

Figura 8 - Gráficos de dispersão mostrando o efeito da temperatura sob o cfDNA fetal no soro e no plasma-EDTA

LISTA DE SIGLAS

cfDNA “Cell-free DNA”

cffDNA “Cell-free fetal DNA”

DNA Ácido desoxirribonucleico

PCR Reação em cadeia da polimerase

EDTA Ácido etilenodiamino tetra-acético

qPCR PCR em tempo real

GE/ML Equivalentes genômicos por mililitro

STR “Short tandem repeats”

SNP “Single nucleotide polymorphism”

INDEL “Insertion-deletion polymorphism”

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
1.1	O DNA livre de células e suas aplicações	13
1.2	Estudo de vínculo genético pela análise do sangue materno	13
1.3	Quantidade de cfDNA fetal no soro e no plasma-EDTA	14
1.4	Considerações pré-analíticas do projeto “Investigação de vínculo genético pela análise do sangue materno”	15
1.5	Tratamentos para enriquecer o DNA fetal na amostra materna	15
1.6	Hipótese	16
1.7	DNases sanguíneas.....	16
1.8	Funções biológicas das DNases sanguíneas	17
1.9	Dnases do sangue e estados patológicos.....	18
1.10	Aplicações clínicas da DNase I.....	18
1.11	Ensaio para detectar DNase em amostras biológicas.....	18
1.11.1	Ensaio para DNases baseado na diminuição da fluorescência de corantes de DNA não-covalentes.	18
1.11.2	Ensaio para DNases baseado na recuperação da fluorescência de ligantes de DNA covalentes auto-atenuados.....	19
1.11.3	Ensaio para DNases baseado na deatenuação das sondas de transferência de energia fluorescente ressonante (FRET).	19
1.11.4	Ensaio imunológico para detecção de DNases.....	19
1.12	Impacto das DNases sanguíneas sobre a quantidade de DNA fetal livre de células.....	20
1.13	A importância deste trabalho	21
2	OBJETIVO	22
2.1	Geral.....	22
2.2	Específicos	22
3	MÉTODOS	23
3.1	Tipo de estudo	23
3.2	Amostras, coleta de sangue, processamento e transporte	23
3.3	Detecção da atividade DNase endógena no soro e no plasma-EDTA.....	23
3.4	Tratamentos	24
3.4.1	Temperatura	25
3.4.2	DNase exógena	25
3.5	Extração de DNA.....	25
3.6	quantificação do cfDNA fetal.....	25
3.7	Ação do EDTA sobre as Dnases sanguíneas.	26
3.8	Análises estatísticas	26
3.9	Aspectos éticos	26
4	RESULTADOS.....	27

4.1	Atividade DNase endógenas no soro e no plasma-EDTA.....	27
4.2	Efeito da adição de DNase I exógena sobre o cfDNA fetal livre de células	29
4.3	Efeito dose-dependente do EDTa sobre as DNase do Soro e plasma fresco.....	30
4.4	A quantidade de DNA fetal livre de células é maior no plasma-EDTA quando comparado com o soro	32
4.5	Efeito da temperatura sobre o DNA fetal livre de células	33
5	DISCUSSÃO	35
6	CONCLUSÕES	39
	REFERÊNCIAS	40
	APÊNDICE I – PREMIAÇÕES	46
	APÊNDICE II – ARTIGO SUBMETIDO A <i>CLINICAL BIOCHEMISTRY</i>	46
	ANEXO I – APROVAÇÃO EM COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	47

PREFÁCIO

Este estudo é uma prova de que dados secundários podem originar conhecimento relevante. O presente trabalho contém os resultados preliminares do projeto principal e maior desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa (Investigação de vínculo genético pela análise do sangue materno), organizados de forma a contar uma história lógica e interessante.

O objetivo da “Investigação de vínculo genético pela análise do sangue materno” é identificar marcadores genéticos fetais em uma amostra materna, já que existem sequências de DNA do bebê na circulação da mãe (DNA fetal livre de células - cfDNA), e compará-los com o do pai alegado com a intenção de se desenvolver uma alternativa não-invasiva para o teste de paternidade pré-natal.

Idealmente, os marcadores genéticos fetais a serem identificados são os STRs autossômicos, alternativamente tem-se os SNPs e os indels. Entretanto, a detecção destes marcadores sofre supressão pelo DNA materno presente em maior quantidade na amostra. Assim, é necessário enriquecer sua quantidade por meio de tratamentos ex-vivos.

No início da pesquisa, não se sabia qual a melhor espécime a ser utilizada para enriquecimento dos STR fetais: soro ou plasma-EDTA? Ao se comparar a quantidade de cfDNA fetal nestas espécimes, observou-se que seus níveis iniciais no plasma-EDTA eram insistentemente maiores que na amostra pareada de soro, contrariando a descrição na literatura de que são idênticas.

Ademais, existe uma patente descrevendo que o tratamento da amostra materna com DNase I diminui os níveis de DNA materno enriquecendo assim as sequências de DNA fetais, por este supostamente estar protegido por vesículas apoptóticas. Ao se executar tal procedimento, observou-se que a DNase I elimina todo o DNA no soro, tanto o materno quanto o fetal, mas não os afeta no plasma- EDTA. Resultados semelhantes foram observados ao se aproveitar das DNases presente nas próprias amostras (endógenas) para eliminação do DNA materno.

Tais inconsistências com a literatura motivou a investigação das suas causas, pois influenciaram diretamente os resultados do trabalho principal. De fato, identificou-se

um efeito pré-analítico presente no soro e ausente no plasma-EDTA que pode alterar a quantidade de DNA fetal livre na amostra e que na realidade trata-se de uma lacuna de conhecimento na área do diagnóstico molecular - DNases, ubíquas de toda amostra biológica exerce sua função biológica na amostra ex-vivo.

A revisão da literatura revelou que nenhum trabalho anterior à este fez a conexão entre os assuntos: quantidade de cffDNA, atividade DNase nas amostras biológicas e seu efeito ex-vivo sobre as análises moleculares.

Ao se perceber esta lacuna no conhecimento resolveu-se, como dito anteriormente, organizar estes resultados preliminares em uma história lógica e interessante que resultou nesta dissertação, em um artigo no *prêlo* e em um prêmio de melhor trabalho apresentado no congresso da Associação Americana de Química Clínica (AACC) em 2013. Prêmio concedido pela divisão de patologia molecular na categoria estudante.

1 INTRODUÇÃO

1.1 O DNA LIVRE DE CÉLULAS E SUAS APLICAÇÕES

O DNA livre de células (cfDNA) circulante é definido como DNA extracelular presente no sangue [1]. É um marcador com crescente interesse devido as suas aplicações clínicas, principalmente, no diagnóstico pré-natal não-invasivo e no diagnóstico em oncologia.

A análise do cfDNA na circulação sanguínea materna é a metodologia de escolha para investigação não-invasiva das características genéticas do feto e a detecção específica do cfDNA derivado de tumores em pacientes com câncer pode fornecer informações diagnósticas e prognósticas [2].

Alguns exemplos das análises não-invasivas das características genéticas fetais são: determinação do sexo [3], determinação o fator RH [4], detecção de aneuploidias [5] e teste de paternidade [6].

Em oncologia, o cfDNA pode ser utilizado para monitoramento da carga tumoral [7, 8], detecção de doença residual mínima após cirurgia ou terapia com intenção curativa [9, 10], monitorar resistências à drogas e sua heterogeneidade [11, 12].

Maiores detalhes sobre os assunto podem ser encontrados nas várias revisões disponíveis atualmente [1, 13-16].

1.2 ESTUDO DE VÍNCULO GENÉTICO PELA ANÁLISE DO SANGUE MATERNO

O projeto principal de nosso grupo de pesquisa tem como objetivo estabelecer vínculo genético de paternidade ainda durante a gestação a partir do sangue materno usando metodologias tradicionais de identificação humana. O projeto têm duas vertentes, uma patrilinear e outra autossômica e os marcadores de DNA analisados são STRs do cromossomo Y e STRs autossômicos, respectivamente.

A vertente patrilinear aproveita-se da ausência do cromossomo Y na mãe para evitar que a detecção das sequências fetais fiquem em desvantagem em relação ao materno devido a maior quantidade deste último no sangue. Por outro lado, só

funciona nos fetos do sexo masculino e a conclusão é se pai alegado e bebê pertencem a mesma linhagem patrilinear. Após dois anos de pesquisa, foi obtido sucesso nesta vertente o que resultou em um artigo aceito pela revista “Forensic Science International: Genetics” em Novembro de 2014 [17].

Na vertente autossômica é necessário enriquecer as sequências fetais para evitar tal supressão. Na literatura, encontram-se descrições de tratamentos *ex-vivo* para a amostra com a finalidade de se obter o enriquecimento das sequências fetais (vide item 1.4). Além disso, uma amostra primária materna com a maior quantidade possível de cffDNA era altamente desejável.

Apesar dos esforços, ainda não foi obtido sucesso na vertente autossômica. No entanto, dados secundários gerados pela pesquisa preenchem uma lacuna de conhecimento importante para as análises envolvendo o cffDNA, sendo este o tema desta dissertação.

1.3 QUANTIDADE DE CFFDNA FETAL NO SORO E NO PLASMA-EDTA

Por desconhecer a melhor espécie e anticoagulante a ser usado para o enriquecimento do cfDNA fetal e obtenção de perfis STRs, decidiu-se utilizar o soro e plasma-EDTA, pois o cffDNA fetal está presente [18], em quantidades similares [19], nestes dois tipos de subprodutos do sangue.

No início da gravidez, a quantidade de cffDNA varia de 1,65 a 34,7 GE/mL no plasma-EDTA e de 2,0 a 29,0 GE/mL no soro. No final da gestação varia de 38,45 a 384,5 GE/mL no plasma-EDTA e de 16,9 a 450 GE/mL no soro [19].

Estes resultados sugerem que ao se comparar a quantidade de cffDNA em amostra de sangue colhido por punção venosa da mãe, os níveis deste analito são equivalentes independente do tipo de tubo usado na coleta. Porque as células da placenta (trofoblastos) são sua fonte primária [20] e o aporte se perde após a coleta.

Em outras palavras, espera-se que a quantidade de cffDNA não aumente na amostra *ex-vivo*. E, caso diminua, tal descréscimo seja semelhante independentemente da amostra ser soro ou plasma-EDTA.

Contrariando esta teoria, nas análises preliminares do projeto “Investigação de vínculo genético pela análise do sangue materno”, mesmo utilizando amostras pareadas, observou-se que a quantidade de cffDNA era insistentemente maior no plasma-EDTA do que no soro (mediana de 27.40 versus 18.57 GE/mL, $p=0.001$).

1.4 CONSIDERAÇÕES PRÉ-ANALÍTICAS DO PROJETO “INVESTIGAÇÃO DE VÍNCULO GENÉTICO PELA ANÁLISE DO SANGUE MATERNO”

Durante o estudo as amostras maternas eram colhidas com 12, 24 e 36 semanas de gestação para a execução do projeto piloto (estudo de vínculo genético pela análise do sangue materno) e para conveniência das voluntárias elas poderiam realizar o procedimento de coleta na unidade do laboratório Sabin mais próxima de sua residência. Em seguida, a amostra era transportada para a unidade de biologia molecular à $22 \pm 4^\circ\text{C}$ em um tempo de transporte que poderia variar de 2-6 horas.

1.5 TRATAMENTOS PARA ENRIQUECER O DNA FETAL NA AMOSTRA MATERNA

Para a vertente autossômica do estudo “Investigação de vínculo genético pela análise do sangue materno”, com o intuito de enriquecer a quantidade de DNA fetal, buscou-se na literatura qual seria a forma de tratar a amostra para este se sobressair em relação ao DNA materno.

Bischoff e colaboradores descrevem na patente US2011/0183338 A1 intitulada “Two stage enrichment of cell-free fetal DNA in maternal plasma” que o tratamento da amostra biológica materna com a enzima DNase I, seguido ou não de uma reação de amplificação global do genoma, enriquece as sequências de DNA fetal pela eliminação do cfDNA materno [21].

Em teoria, uma porção do DNA fetal está envolvida por membranas apoptóticas e isso o protegeria da ação enzimática, que degradaria apenas o DNA “contaminante”, no caso, o materno. De fato, os resultados de Bischoff mostraram que o DNA fetal livre de célula se manteve resistente a degradação e as sequências maternas por sua vez, foram removidas. O anticoagulante utilizado foi o citrato ácido dextrose [21].

Ao se executar a primeira etapa do protocolo supracitado nas amostras do presente estudo observou-se a completa degradação do cfDNA fetal no soro (não-tratado 10.23 *versus* tratado 0.00 GE/mL, $p=0.0039$), e nenhuma diminuição no plasma-EDTA (não-tratado 17.86 *versus* tratado 19.68 GE/mL, $p=0.35$).

Contrariando a descrição da patente, o mesmo padrão foi observado para o DNA materno o que resultou na ausência de enriquecimento das sequências fetais em ambas espécimes. No entanto, a diferença no comportamento do cfDNA fetal em relação ao tratamento com DNase I era no mínimo intrigante.

1.6 HIPÓTESE

Diante das observações nos itens 1.3 (menor quantidade de cfDNA fetal no soro *versus* plasma-EDTA), 1.4 (transporte até a unidade de processamento) e 1.5 (completa eliminação do cffDNA no soro e nenhum efeito sobre ele no plasma-EDTA), hipotetizou-se que as DNases sanguíneas se encontram ativas no tubo de soro, mas não no plasma-EDTA, devido a presença do EDTA, um agente quelante de íons divalentes (Ca^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2}), que além de inibir a coagulação inibe também as DNases presente no sangue, o que faz com que o cfDNA fetal permaneça protegido da ação destas enzimas.

1.7 DNASES SANGUÍNEAS

DNases são enzimas capazes de hidrolisar a ponte fosfodiéster, a mais estável ligação química encontrada em moléculas biológicas [22]. A principal DNase encontrada no sangue é a DNase I [23], caracterizada por um pH ótimo neutro, necessidade de íons metálicos bivalentes para sua atividade catalítica e o produtos de sua ação são oligonucleotídeos e nucleotídeos com na extremidade 5' fosfato e 3' hidroxila [24].

A DNase I é codificada por um único gene (DNASE1), localizado no cromossomo 16 na região p13.3 [25]. Este gene de 3200 pares de base possui nove exons e oito introns [26]. Seis alelos variantes, caracterizados por mutações pontuais na sua região codificante já foram identificadas [24].

O produto gênico é uma proteína monomérica com 260 aminoácidos e peso

molecular calculado de 30 kD [27]. Dois sítios com alta afinidade pelo cálcio ajudam na manutenção da estrutura e função. Além disso, o polipeptídeo consiste em dois domínios estruturalmente similares, formados pelos resíduos 1-123 e 123-260, respectivamente. Tais domínios se sobrepõe muito bem, o que sugere a ocorrência de uma duplicação de um gene ancestral precursor [28].

Ademais, trata-se de uma enzima secretada; confirmados pela presença de um peptídeo de sinal no seu n-terminal e altos níveis de glicosilação. Sua localização celular corresponde as rotas de secretórias tradicionais: retículo endoplasmático rugoso, complexo de golgi e granulos secretórios [24].

Estudos comparativos revelaram que a DNase I isolada de vários órgão e líquidos biológicos compartilham características fisicoquímicas e propriedades catalíticas similares [23, 29]. Dentre os líquidos extracelulares, os níveis encontrados na urina, sangue e saliva são 6000 ± 2200 , 65 ± 27 e $2.4 \pm 0.94 \times 10^3$ unidades/g de proteína, respectivamente [30]. A presença de um inibidor natural (actina) faz com que a forma ativa seja encontrada em uma proporção menor [31].

A maior parte da DNase I presente no sangue é secretada pelo pâncreas, e os níveis da enzima ativa estão correlacionado a saúde do órgão [23, 32]. Outra fonte de DNases sanguíneas é a hipófise intermediária, e sua secreção é influenciada por hormônios hipotalâmicos [33].

A DNase I é 100-500 vezes mais ativa na hidrólise do DNA dupla fita do que o DNA fita simples; isto é atribuído à interação da enzima com ambas as fitas da molécula substrato [34]. Ademais, não exhibe preferências por certas sequências nucleotídicas; no entanto, ela é sensível a conformações da dupla hélice [35, 36]. A taxa de hidrólise depende fortemente de parâmetros como comprimento e profundidade da fenda menor do DNA, e também da rigidez da estrutura [24].

1.8 FUNÇÕES BIOLÓGICAS DAS DNASES SANGUÍNEAS

As DNases desempenham um importante papel no metabolismo de ácidos nucléicos e manutenção da concentração fisiológica do DNA no corpo humano. Por exemplo, o aumento da concentração de DNA no sangue pode resultar na acumulação de complexos DNA-proteína, indução e elaboração de anticorpos anti-

DNA, e desenvolvimento de várias doenças autoimunes [24], principalmente, lúpus eritematoso sistêmico [37]. DNases também desempenham certo papel na proteção do organismo contra ácidos nucléicos xenobióticos [38].

1.9 DNASES DO SANGUE E ESTADOS PATOLÓGICOS

Existe correlação entre a atividade DNase do sangue e alguns estados patológicos. Por exemplo, um aumento significativo da atividade DNase no sangue foi encontrada durante o desenvolvimento do câncer de mama [39]. Em pacientes com pancreatite crônica [40], câncer de estômago [41] e lúpus eritematoso [42, 43] a atividade DNase do sangue estava abaixo dos valores normais.

1.10 APLICAÇÕES CLÍNICAS DA DNASE I

Recentemente, a DNase I humana recombinante foi empregada para a melhora do funcionamento do trato respiratório em pacientes com fibrose cística; o efeito positivo é devido a hidrólise do DNA de alto peso molecular e diminuição da viscosidade das secreções mucosas [44-47]. Uma forma mutante da DNase I humana recombinante, insensível à inibição pela actina (e muito mais ativa na hidrólise do DNA que a enzima selvagem), é a mais promissora para o uso na prática clínica [48, 49].

1.11 ENSAIOS PARA DETECTAR DNASE EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Ensaio fluorométricos, eletroquímicos e imunológicos foram desenvolvidos para detecção das DNases, maiores detalhes podem ser encontrados na revisão de Sato S e Takenaka S [50]. Os ensaios fluorométricos, que é o tipo utilizado no presente estudo, podem ser divididos em 3 classes: A) Os baseados na diminuição da fluorescência de corantes de DNA não-covalentes; B) Os baseados na recuperação da fluorescência de ligantes de DNA covalentes auto-atenuados; C) Deatenuação das sondas de transferência de energia fluorescente ressonante (FRET).

1.11.1 Ensaio para DNases baseado na diminuição da fluorescência de corantes de DNA não-covalentes.

Este tipo de ensaio baseia-se no fato de ligantes de DNA não-covalentes como PicoGreen, Sybr Green ou Brometo de etídio fluorescerem quando ligados à moléculas de DNA dupla fita. A degradação deste DNA dupla fita pela atividade DNase provoca uma diminuição da fluorescência diretamente proporcional a atividade nucleolítica [51].

1.11.2 Ensaio para DNases baseado na recuperação da fluorescência de ligantes de DNA covalentes auto-atenuados.

Este ensaio baseia-se no uso de um corante covalentemente conjugado a uma molécula de DNA. A proximidade entre as moléculas de corante fazem com que sua fluorescência se atenua. Com a clivagem do DNA pela atividade DNase, ocorre o aumento na fluorescência que é utilizada como medida da atividade nucleolítica [52].

1.11.3 Ensaio para DNases baseado na deatenuação das sondas de transferência de energia fluorescente ressonante (FRET).

Este ensaio baseia-se no uso de oligonucleotídeos fita simples marcados com um fluorófilo e um atenuador. A clivagem do oligo pela atividade nucleolítica deatenua a fluorescência e sua intensidade representa a atividade nucleolítica [53, 54]. Para este estudo foi desenvolvido de forma independente um ensaio semelhante a este para detectar a atividade DNase no soro e no plasma-EDTA. Após revisão da literatura, percebeu-se que sua descrição já havia ocorrido, existindo inclusive um kit comercial para tal propósito [55]. Para maiores detalhes sobre o ensaio vide material e métodos item 3.4.

1.11.4 Ensaios imunológicos para detecção de DNases

Anticorpos contra DNase I foram produzidos e usados na metodologia de ELISA para detecção imunológica destas enzimas [56]. Sendo este um ensaio conveniente e sensível para o propósito, entretanto, o conteúdo de DNase pode não refletir a atividade DNase nas amostras biológicas devido a presença inibidores endógenos, como acontece no soro, por exemplo [57].

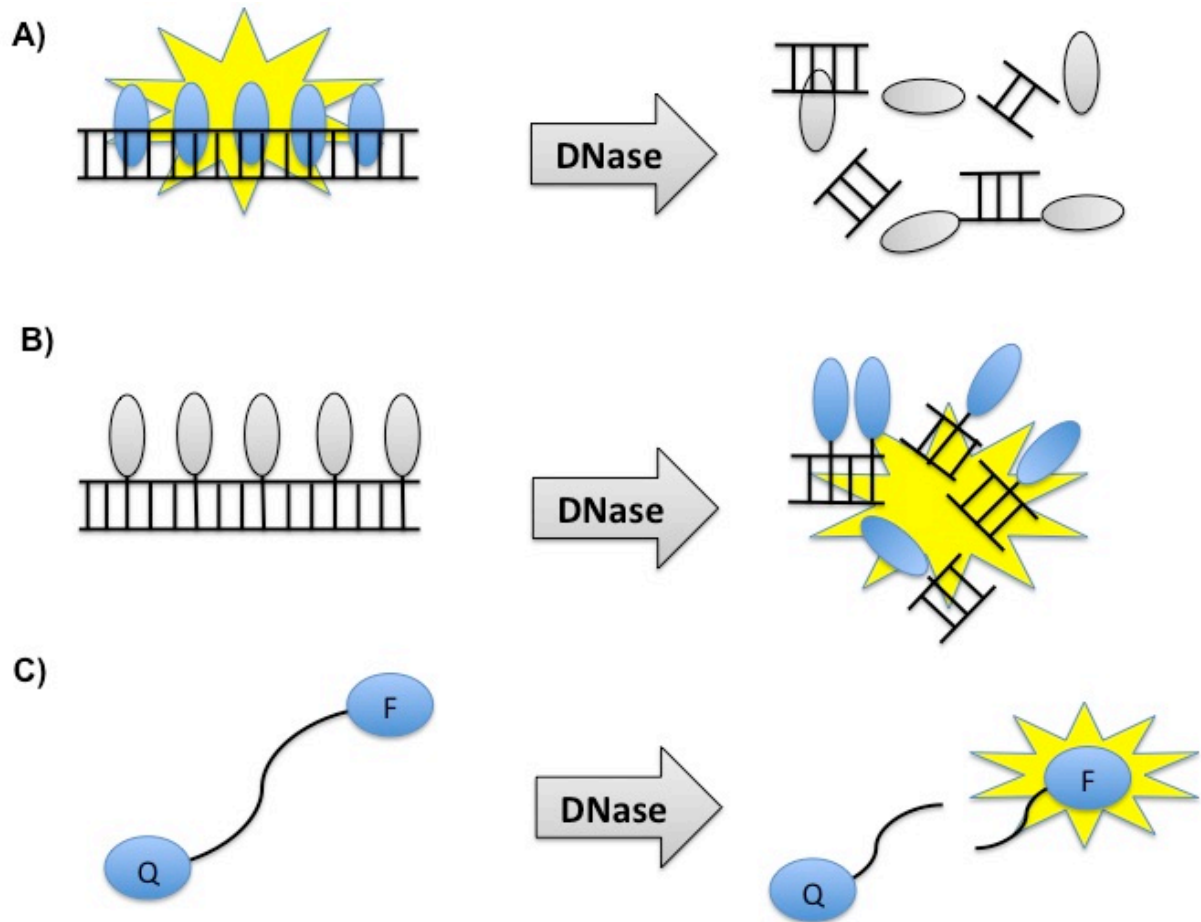


Figura 1 – Ensaio fluorométrico para detecção de atividade DNase: A) Ensaio para DNases baseado na diminuição da fluorescência de corantes de DNA não-covalentes. B) Ensaio para DNases baseado na recuperação da fluorescência de ligantes de DNA covalentes auto-atenuados C) Ensaio para DNases baseado na deatenuação das sondas de transferência de energia fluorescente ressonante (FRET).

1.12 IMPACTO DAS DNASES SANGUÍNEAS SOBRE A QUANTIDADE DE DNA FETAL LIVRE DE CÉLULAS

Apesar do conhecimento a respeito da atividade que degrada o DNA no sangue [7], o impacto como uma variável pré-analítica na análise do cffDNA e outros testes moleculares não estão muito claros e nem muito bem estudados [6].

Um estudo que investigou o clearance do cffDNA da circulação sanguínea nos deu uma pista indireta sobre estes efeitos. A incubação *in-vitro* por 2h a 37°C de dez amostras de plasma fresco (não-anticoagulado) colhidos antes do parto resultaram na incompleta remoção do cfDNA em todas as circunstâncias. Como resultados, amostras de três pacientes tiveram concentrações > 90% dos valores antes da incubação. As sete amostras restantes apresentaram concentrações entre 31%-74% dos valores antes da incubação. Ao contrário disso, amostras de sangue colhidas 2h após o parto revelaram o clearance completo do cffDNA circulante em 9 de 10 amostras [8].

Estes dados mostraram que a atividade DNase presente no sangue desempenham um papel parcial na remoção do cffDNA circulante *in-vivo*, mas a atividade degradante do DNA existe e pode desenvolver um papel *ex-vivo* sendo uma fonte de variação pré-analítica.

1.13 A IMPORTÂNCIA DESTE TRABALHO

A revisão da literatura revelou que nenhum trabalho anterior a este fez a conexão “específica” entre os assuntos: quantidade de cffDNA, atividade DNase nas amostras biológicas e seu efeito *ex-vivo* sobre as análises moleculares.

Esta consideração motivou a avaliação do impacto das DNases sanguíneas sobre o cfDNA fetal em amostras de soro e plasma-EDTA, sendo esta a questão de pesquisa respondida pelo dados preliminares apresentados nesta dissertação.

2 OBJETIVO

2.1 GERAL

Investigar o impacto *ex-vivo* das DNases sanguíneas sobre a quantidade de cfDNA fetal em amostras clínicas.

2.2 ESPECÍFICOS

A) Determinar a atividade DNase endógena no soro e plasma-EDTA;

B) Investigar a ação de DNase exógena no soro e plasma-EDTA;

C) Conhecer o efeito da adição de doses crescentes de EDTA sobre a atividade DNase do soro e do plasma fresco (não-anticoagulado).

D) Medir a quantidade inicial de cfDNA em amostras pareadas de soro e plasma-EDTA;

E) Estabelecer o efeito da exposição à diferentes temperaturas sobre o cfDNA fetal no soro e no plasma-EDTA;

3 MÉTODOS

3.1 TIPO DE ESTUDO

Estudo experimental

3.2 AMOSTRAS, COLETA DE SANGUE, PROCESSAMENTO E TRANSPORTE

Este estudo foi desenvolvido com 34 amostras de mulheres grávidas de feto do sexo masculino (média de idade gestacional 12 ± 4 semanas). As amostras de sangue foram colhidas simultaneamente em dois tubos de 4mL cada contendo uma barreira de gel separador; Vacuette K2 EDTA Sep e Vacuette Z soro com ativador de coágulo (ambos da Greiner Bio-one). Após a punção venosa, os tubos foram centrifugados a 2.000g por 10min a temperatura ambiente na unidade de coleta, transportados ao centro de análise à $22 \pm 4^{\circ}\text{C}$ e armazenados a -20°C até o seu uso. Após descongelamento, 1000mL do sobrenadante foi transferido para tubos de microcentrífuga, centrifugados a 14.000g por 10min a temperatura ambiente, e cada experimento subsequente foi realizado com 9-11 sobrenadantes pareados.

3.3 DETECÇÃO DA ATIVIDADE DNASE ENDÓGENA NO SORO E NO PLASMA-EDTA

Um ensaio de fluorescência para investigar a atividade das DNases endógenas em amostras biológicas foi idealizado e desenvolvido. Resumidamente, o ensaio consiste em 20µL de plasma-EDTA ou soro, 2µL de PrimeTime qPCR DYS-14 10X (o mesmo descrito posteriormente) e 10µL do 2X Maxima Probe qPCR Master Mix. As reações foram incubadas isotermicamente à 37°C por 24 h no Step-One qPCR System e a fluorescência foi medida no início da reação e, posteriormente, à cada 30 minutos. O Maxima Probe qPCR Master Mix foi usado como fonte de fluorescência passiva (ROX) e o PrimeTime como fonte da molécula de DNA fita simples capaz de fluorescer quando clivada. Os dados foram apresentados em ΔRN , o qual é a fluorescência de FAM dividido pela fluorescência de ROX após subtração do baseline da reação. Neste ensaio, o baseline da reação foi estabelecido como a primeira leitura das fluorescências (figura 2). Assim, este ensaio investiga a ação das Dnases na amostra sob uma molécula de DNA fita simples.

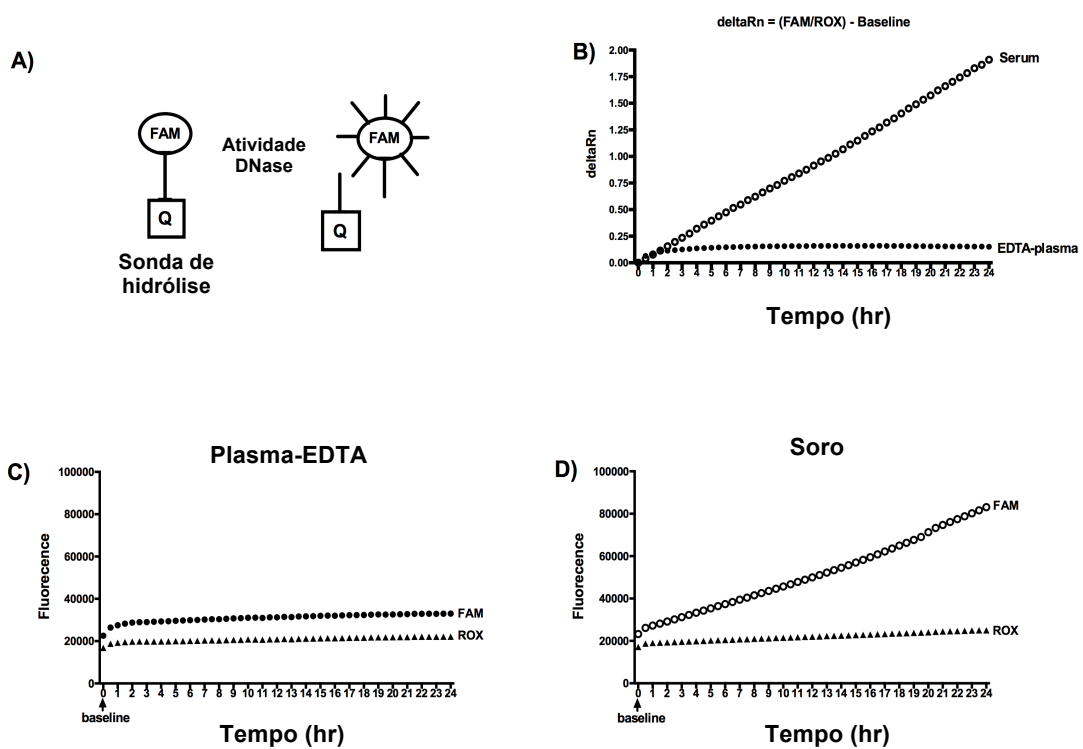


Figura 2. Representação esquemática do ensaio para medir a atividade Dnase endógenas. O substrato para Dnase utilizado foi uma sonda de hidrólise para qPCR. Quando a sonda está intacta, o atenuador (Q) e fluorescência FAM ficam próximos o suficiente para que sua fluorescência seja atenuada. A fluorescência FAM aumenta a medida em que a sonda de hidrólise é clivada pela atividade DNase da amostra. B) Uma típica representação gráfica do resultado do ensaio para atividade das DNases endógenas em amostras pareadas de plasma-EDTA e soro; um gráfico deltaRn versus tempo (hr). O deltaRn é extraído dos dados brutos da reação de fluorescência e é igual a (sinal FAM normalizado pelo sinal da fluorescência passiva - ROX) menos a baseline; FAM – Fluorescência da sonda de hidrólise ativa; ROX – Fluorescência passiva presente na reação; Baseline – Fluorescência basal (primeira leitura). Dados brutos das fluorescências FAM e ROX em um ensaio para detecção da atividade DNase endógenas em uma amostra de plasma-EDTA (C) e de soro (D) pareadas.

3.4 TRATAMENTOS

3.4.1 Temperatura

As amostras de soro e plasma-EDTA foram submetidas a 37°C por 24 h e 48 h e a -20°C, 4°C, 22°C por 24 h antes da extração de DNA a fim de investigar o efeito da temperatura sob o cfDNA.

3.4.2 DNase exógena

Além disso, as amostras de soro e plasma-EDTA foram tratadas com 25U de DNase I (Fermentas) por 1h a 37°C antes da extração de DNA para avaliar a ação de uma Dnase exógenas sobre sequências de DNA fetal.

3.5 EXTRAÇÃO DE DNA

O DNA foi extraído a partir de 500 µL de soro ou plasma-EDTA usando o protocolo genérico 2.0.1 do extrator automatizado de DNA NucliSens easyMAG system (bioMerieux), 50 µL da suspensão de partículas de sílica magnéticas e eluídas em 25 µL.

3.6 QUANTIFICAÇÃO DO CFDNA FETAL

O cfDNA fetal masculino foi quantificado amplificando as bem-descritas sequências do cromossomo Y DYS-14 [6] no sistema de qPCR StepOne (Life Technologies) usando o Maxima Probe qPCR Master Mix (Fermentas) e o ensaio PrimeTime qPCR (Integrated DNA Technologies) que consistia dos primers DYS14-F (5'-CCATGACCCCAGAGTCTGC-3') e DYS14-R (5'-CTTCCTGGCTTGGGCATTAAC-3') e a sonda de hidrólise (5'-6-FAM-CTCCAGCTC/ZEN/CACCTGAACGGCC-IABFQ-3'), todos foram utilizados como recomendado pelos respectivos fabricantes. As condições de termociclagem foram as seguintes: pré-incubação por 10min a 95 °C, seguida por 60 ciclos de 15s a 95°C, 60s a 60°C.

O volume da reação foi de 24µL, incluindo 10µL de DNA eluído. A equação que descrevia a curva de calibração para o DYS-14 foi $Y = -3.26X + 29.75$ (eficiência = 102.45% and $R^2=0.998$). Todas as amostras foram analisadas em duplicata e em cada corrida foram incluídos um controle negativo (DNA Feminino) e um positivo (DNA Masculino). A quantidade de DNA masculino

em equivalentes genômicos (GE) por reação de PCR foi determinada pela comparação de uma diluição seriadas de 5 vezes do controle genômico masculino (life technologies), 151, 30.2, 6.02, 1.21 e 0.24 GE. O fator de conversão de 6.6pg de DNA por genoma foi usado e a concentração de DYS-14 em GE/mL foi calculada como descrito na literatura [5]. Os experimentos de qPCR e a descrição seguem a diretriz: informação mínima para experimentos de qPCR (MIQE) [10].

3.7 AÇÃO DO EDTA SOBRE AS DNASES SANGUÍNEAS.

Uma diluição seriada de EDTA (Disodium Salt, Dihydrate, USB) foi adicionada à amostras pareadas de plasma fresco (não-anticoagulado) e de soro antes do ensaio para detecção da atividade DNase endógena para investigar a inibição da degradação da sonda de hidrólise mediada por este quelante de íons divalentes. O plasma fresco foi preparado através de coleta de sangue em tubo seco (Vacuette serum tubes 4 ml, Greiner Bio-one), seguido por centrifugação a 2.000g por 5min a temperatura ambiente imediatamente após a punção, o sobrenadante foi transferido para tubo de microcentrífuga e centrifugados a 14.000g por 10min a temperatura ambiente. As amostras de soro foram preparadas como descritas na seção 3.2 (Amostras, coleta de sangue, processamento e transporte). Depois, uma diluição seriada (1:10) de EDTA de 5×10^{-9} a 5×10^{-2} M foi adicionada às amostras e o ensaio da atividade DNase endógenas realizado como descrito anteriormente. Os experimentos foram repetidos duas vezes e os dados da curva dose-resposta foram analisados usando a função “log-dose versus response” do Software Prism 6.0 (GraphPad).

3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O método estatístico utilizado foi o teste de Wilcoxon para amostras emparelhadas. Todos os gráficos e análises estatísticas foram realizados no software Prism 6.0 (GraphPad).

3.9 ASPECTOS ÉTICOS

O comitê de ética em pesquisa da faculdade de ciências e saúde da Universidade de Brasília aprovou este estudo (IRB protocolo # 188/12) e o termo de consentimento livre esclarecido foi obtido de cada participante.

4 RESULTADOS

4.1 ATIVIDADE DNASE ENDÓGENAS NO SORO E NO PLASMA-EDTA

No ensaio para detecção das DNases endógenas foi observado um aumento constante e contínuo da degradação da sonda de hidrólise (deltaRN) sob o tempo de experimento (24h) no soro e que não foi observado no plasma-EDTA (Figura 3). No plasma-EDTA, o deltaRN atingiu um platô em 1 - 3h de reação. O controle negativo (H₂O) apresentou valores para deltaRN insignificantes e próximo de zero. Por outro lado, o controle positivo (1U of DNase I) apresentou uma cinética de degradação diferente da observada nas amostras de soro. Considerando o deltaRN relativo à última leitura de fluorescência da reação, a degradação da sonda de hidrólise foi de 14,9 vezes maior no soro quando comparado ao plasma-EDTA em amostras pareadas [mediana de 1,64 deltaRN versus 0,11 deltaRN, p=0,0156] (Figura 4).

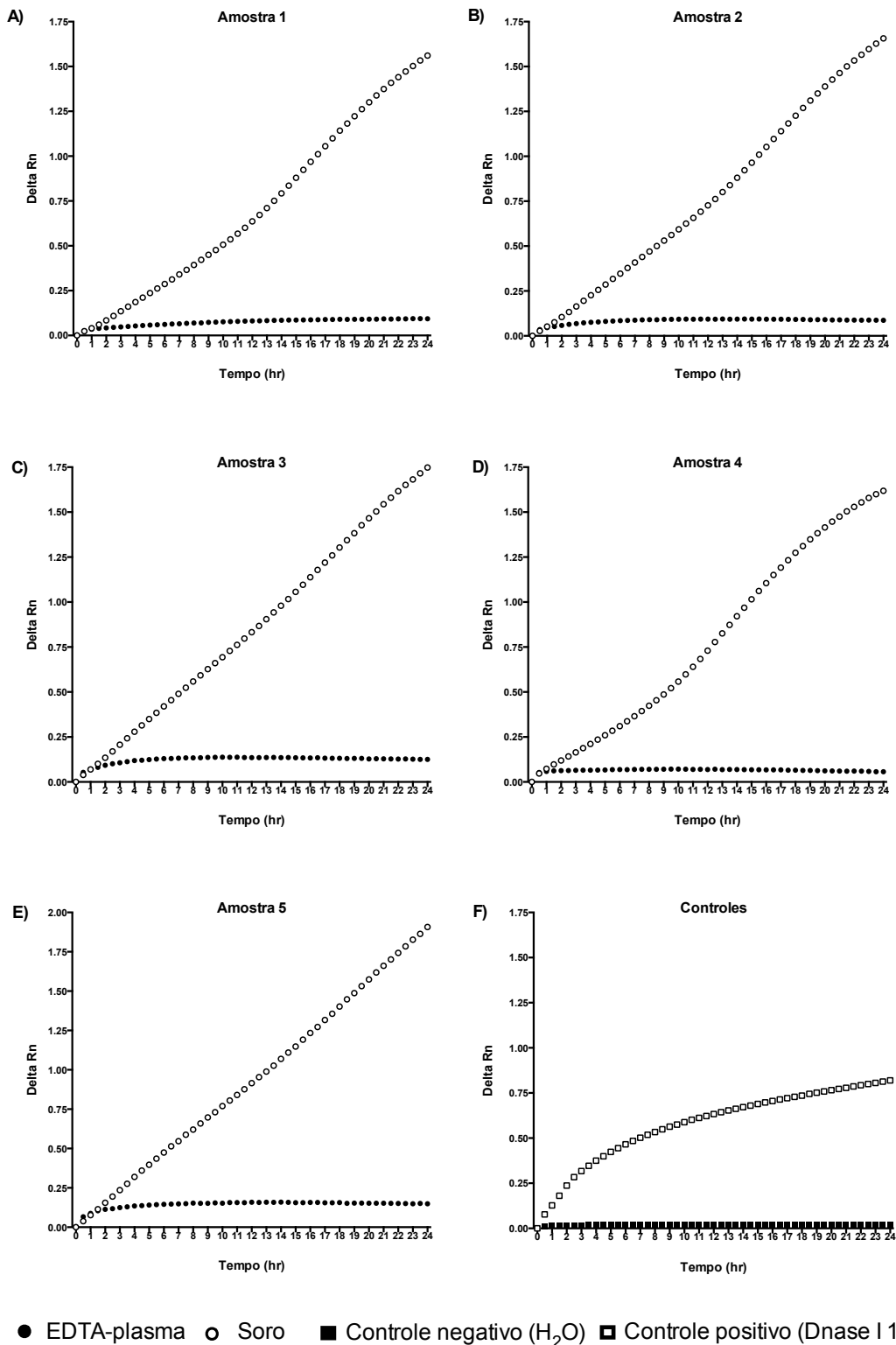


Figura 3 - Resultado do ensaio para atividade DNase endógena em amostras de soro e plasma-EDTA pareadas. Em 24 horas, a degradação da sonda de hidrólise foi maior no soro (círculo aberto) quando comparado ao plasma-EDTA (círculo fechado) sugerindo que a atividade DNase está inibida nesta última

DYS-14 no plasma-EDTA (não-tratado 17,86 GE/mL *versus* tratado 19,68 GE/mL, $p=0,35$) (Figura 5 A), mas o degradada a níveis extremamente baixos no soro (não-tratado 10,23 GE/mL *versus* tratado 0,00 GE/mL, $p=0,0039$) (Figura 5 B).

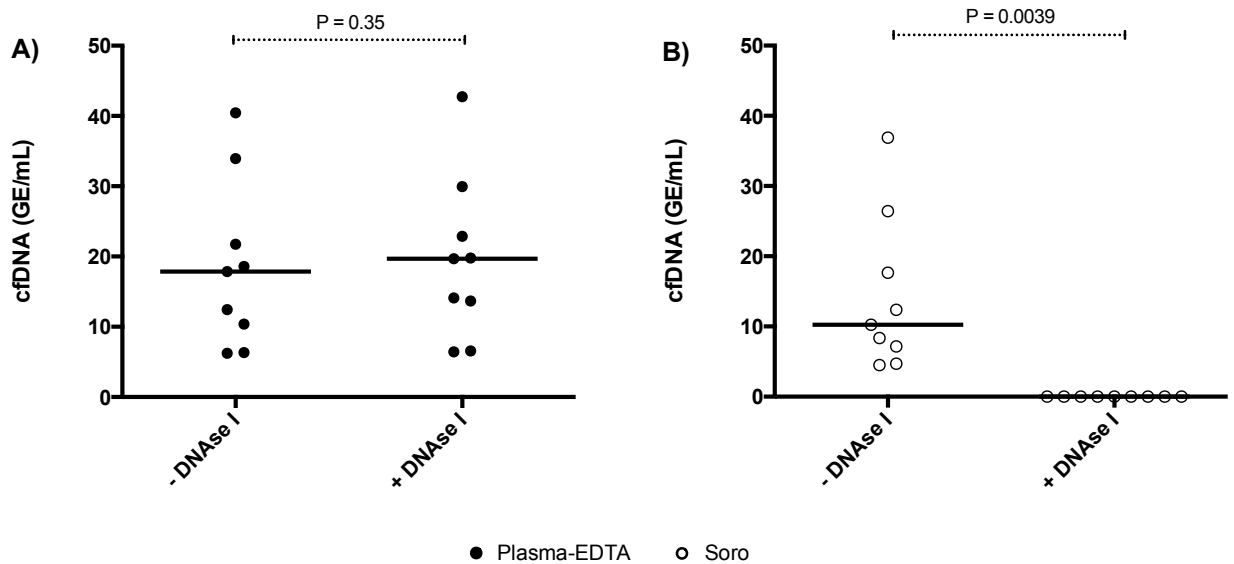


Figura 5. Efeito do tratamento com uma DNase exógena (DNase I) sobre o cfDNA fetal no plasma-EDTA e soro. A e B – as amostras foram tratadas com DNase I por 1h a 37°C antes da quantificação do cffDNA. Cada ponto representa um indivíduo avaliado e a linha representa a mediana. O cffDNA não foi degradado no plasma-EDTA, mas completamente destruído no soro. Este resultado sugere que a DNase exógena estava inibida na primeira espécie.

4.3 EFEITO DOSE-DEPENDENTE DO EDTA SOBRE AS DNASE DO SORO E PLASMA FRESCO

A adição de uma diluição seriada de 10 vezes (5×10^{-9} a 5×10^{-2} M) de EDTA ao plasma fresco (Figura 6) e ao soro (Figura 7) antes do ensaio para Dnases endógenas, revelou uma inibição dose-dependente da degradação da sonda de hidrólise em ambos tipos de amostras. O IC_{50} foi 6.7×10^{-5} (Fig. 7, inserto) e 5×10^{-5} (Fig. 8, inserto) para o plasma fresco e soro, respectivamente. O deltaRN final observado no plasma fresco com baixa concentração de EDTA (por exemplo 5×10^{-9}) foi 1.71 vezes maior do que o observado no soro na mesma condição (mediana do deltaRN 1.44 *versus* 0.84 deltaRN).

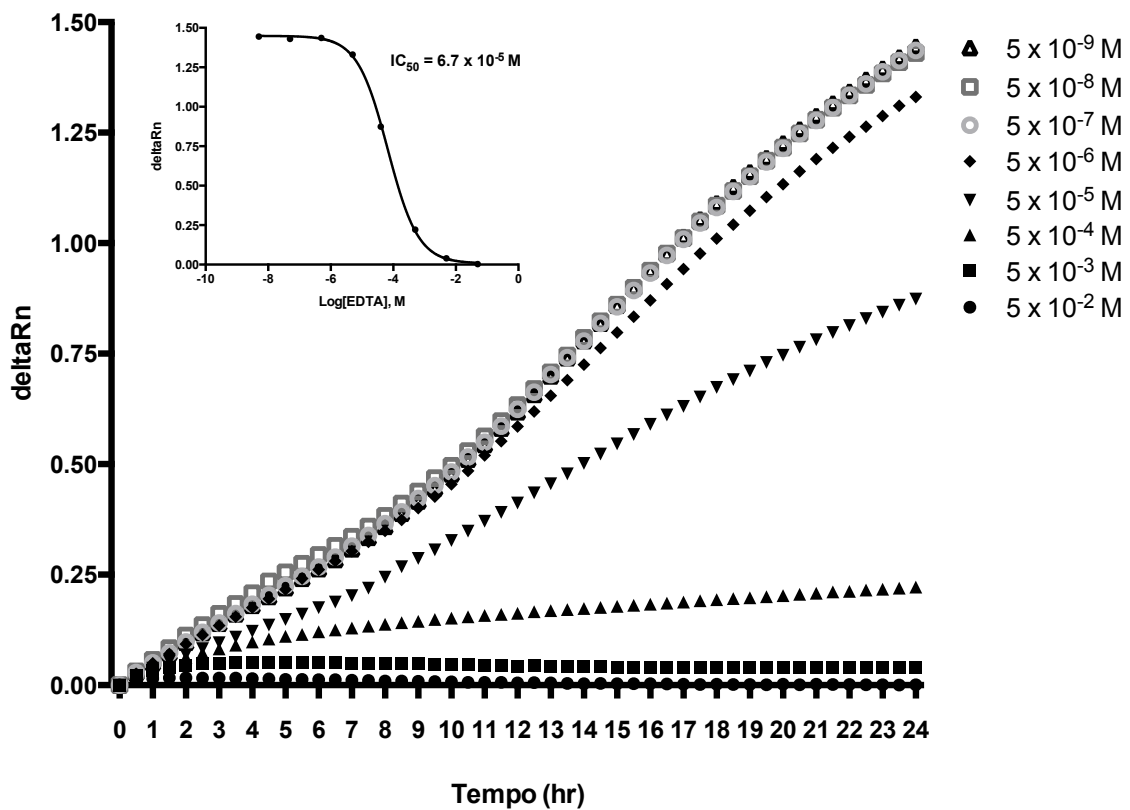


Figura 6. Inibição dose-resposta mediada pelo EDTA da atividade Dnase endógena no plasma fresco. A adição de uma diluição seriada de 10 vezes do EDTA (5×10^{-9} a 5×10^{-2} M) ao plasma fresco antes do ensaio para atividade DNase endógenas. O gráfico inserido (menor) representa a análise dose *versus* resposta dos valores para o último ponto de leitura de fluorescência do ensaio (deltaRN em 24h) para as concentrações de EDTA avaliadas.

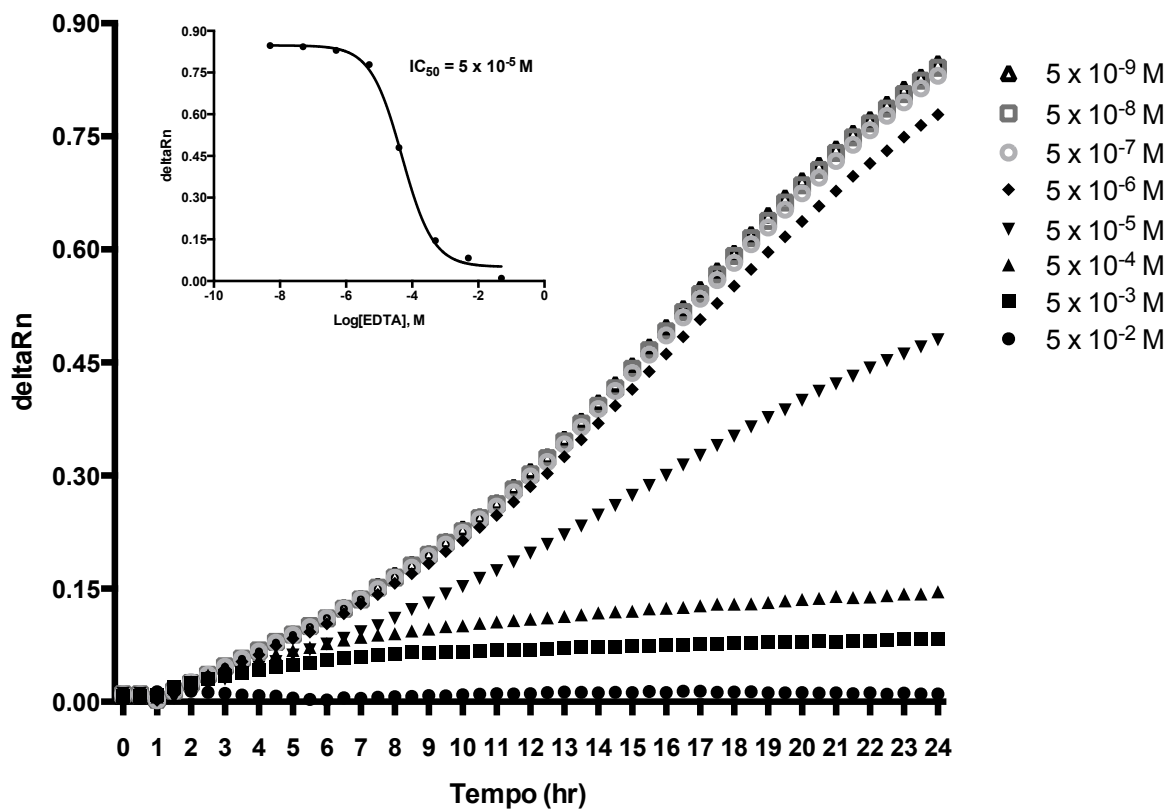


Figura 7. Inibição dose-resposta mediada pelo EDTA da atividade Dnase endógena no soro. A adição de uma diluição seriada de 10 vezes do EDTA (5×10^{-9} a 5×10^{-2} M) ao soro antes do ensaio para atividade DNase endógenas. O gráfico inserido (menor) representa a análise dose *versus* resposta dos valores para o último ponto de leitura de fluorescência do ensaio (deltaRN em 24h) para as concentrações de EDTA avaliadas. Este experimento foi repetido duas vezes.

4.4 A QUANTIDADE DE DNA FETAL LIVRE DE CÉLULAS É MAIOR NO PLASMA-EDTA QUANDO COMPARADO COM O SORO

Como dito na introdução, observou-se que em nossas amostras a quantidade de cfDNA fetal era maior no plasma-EDTA do que no soro (mediana de 27,40 GE/mL *versus* 18,57 GE/mL, $p=0,001$), contrariando a descrição da literatura (Vide figura 8 A *versus* 8 B no tempo 0h).

4.5 EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE O DNA FETAL LIVRE DE CÉLULAS

Nas primeiras 24 horas, a exposição das espécimes a 37°C resultou em um decréscimo da concentração de cfDNA de 1,07 vezes no plasma-EDTA (mediana de 27,40 GE/mL *versus* 25,55 GE/mL, $p=0,07$) e 3.52 vezes no soro (mediana de 18,57 GE/mL *versus* 5,26 GE/mL, $p=0,001$). Nas 24 horas seguintes, esta redução foi de 1,02 (mediana de 25,55 GE/mL *versus* 24,83 GE/mL, $p=0,24$) e 1,68 (mediana de 5,26 GE/mL *versus* 3,13 GE/mL, $p=0,001$) vezes para plasma-EDTA e soro, respectivamente. Considerando o tempo total de experimento (48h), a degradação do cfDNA foi de 1,10 vezes no plasma EDTA (mediana de 27,40 GE/mL *versus* 24,83 GE/mL, $p=0,001$) e de 5,9 vezes no soro (mediana de 18,57 GE/mL *versus* 3.13 GE/mL, $p=0,001$) (figuras 8 A e 8 B).

Em seguida, as amostras foram submetidas as condições pragmáticas de transporte e temperatura de um laboratório clínico por 24h. A mediana da concentração de cffDNA no plasma-EDTA foi similar durante o período de tempo avaliado, 40,27 GE/mL a -20°C, 42,25 GE/mL a 4°C e 41,45 GE/mL a 22°C (Figura 8 C). No soro, o mesmo resultado foi observado a -20°C (20,72 GE/mL) e 4°C (19,89 GE/mL), ou seja, concentrações similares. Por outro lado, à 22°C (12,88 GE/mL) foi observada diminuição de 1,6 vezes e 1,54 vezes quando comparada a -20°C e 4°C, respectivamente ($p=0.0039$ para ambos) (Figura 8 D).

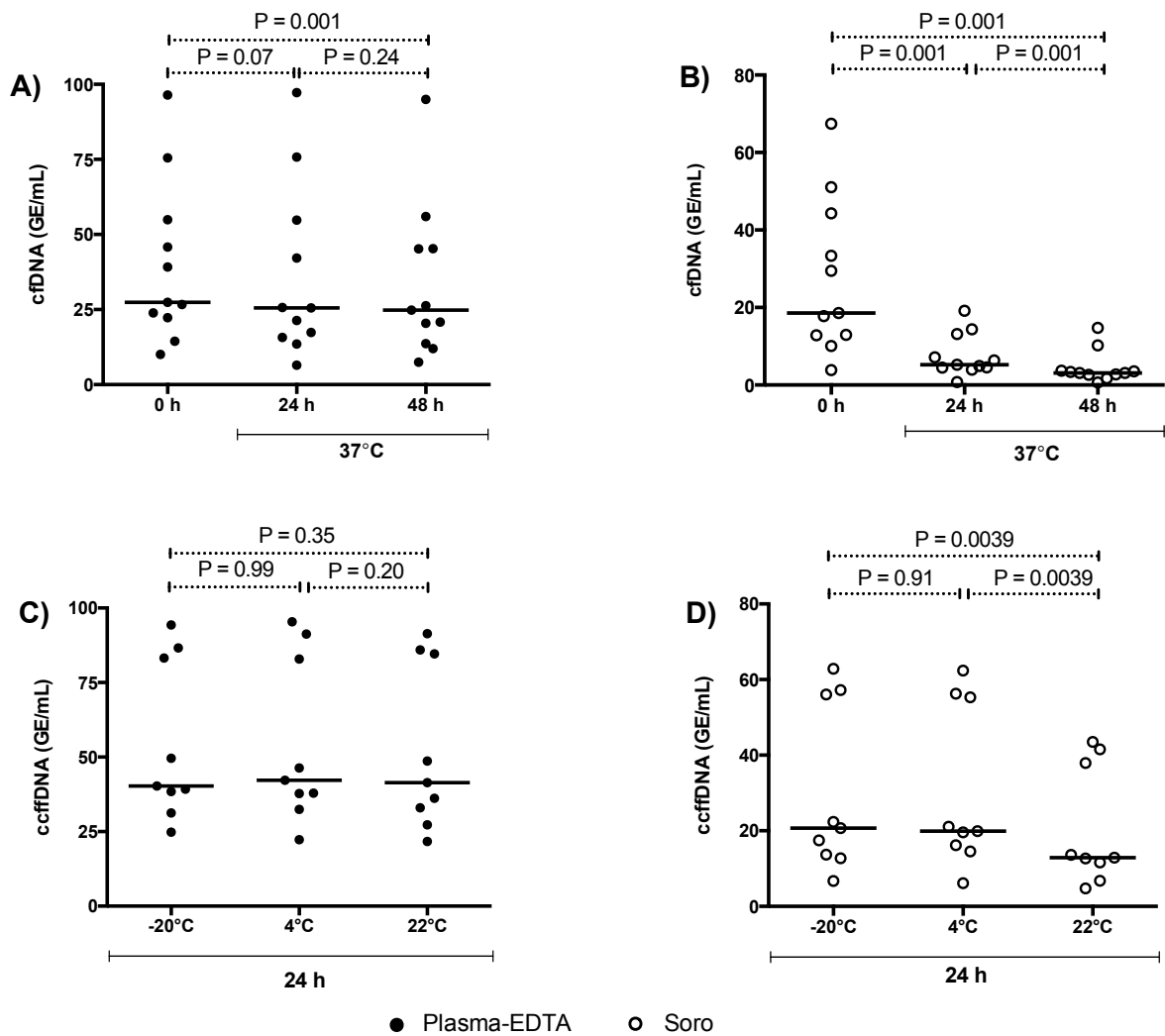


Figura 8. Gráficos de dispersão mostrando o efeito da temperatura sob o cfDNA fetal no soro e no plasma-EDTA. A e B) Basal (0h) e após exposição a 37°C por 24 e 48h; n=11. C e D) Amostras expostas a -20°C, 4°C e 22°C por 24h; n=9. Cada ponto representa um indivíduo avaliado. A linha preta representada mediana da distribuição. Estes resultados sugerem que esta atividade é um mecanismo desencadeado pela temperatura (como a maioria das reações enzimáticas).

5 DISCUSSÃO

Neste estudo, comparou-se a atividade DNase em amostras pareadas de plasma-EDTA e soro maternos e investigou-se seu efeito *ex-vivo* sobre a quantidade de cfDNA. Como resultado, viu-se que: a) as DNases estavam mais ativas no soro, b) o EDTA inibe a atividade DNase em subprodutos do sangue (soro e plasma fresco), c) cfDNA foi protegido de degradação *ex-vivo* desencadeada pela temperatura no plasma-EDTA.

O primeiro achado, de que DNases estavam mais ativas no soro, foi evidenciado pela degradação contínua e constante da sonda de hidrólise no ensaio para DNases endógenas. Fato que não foi observado no plasma-EDTA, onde houve um aumento discreto do deltaRN, que atingiu um platô no início da reação e nenhum outro aumento de fluorescência foi observado nas 21-23 horas subsequentes. De fato, a atividade DNase do soro mostrou-se aproximadamente 15 vezes maior que no plasma-EDTA. Além disso, o tratamento com um excesso de DNase I degradou o cffDNA no soro, mas não no plasma-EDTA. Juntos estes resultados sugerem que a atividade DNase das amostras é uma variável pré-analítica que pode alterar a quantidade de cfDNA no soro mais extensivamente que no plasma-EDTA.

Diante destes resultados hipotetizou-se que o EDTA usado como anticoagulante para obtenção do plasma-EDTA poderia atuar também como um inibidor indireto das atividades DNásicas endógena ou exógena supracitadas, pois o EDTA é um quelante de íons divalentes (Ca^{+2} , Mg^{+2} e Mn^{+2}), os quais são essenciais para a sua estrutura e a atividade enzimática das DNases [58, 59].

Curiosamente, o cinética de degradação do controle positivo (1U de DNase I) foi diferente da observada nas amostras de soro. Este fato pode ser secundário à complexa combinação entre maior concentração e diferente composição das enzimas degradantes de DNA presente no soro e, além disso, sua interação com fatores desconhecidos que influenciam sua atividade como, por exemplo, inibidores [60].

O segundo achado foi a evidência direta de que o EDTA inibe as DNases em subprodutos do sangue. A adição de doses crescentes de EDTA no soro e no plasma fresco resultou na inibição gradual da atividade enzimática em ambas

espécimes comprovando, assim, uma relação dose-efeito dentre os dois. No entanto, trata-se inibição indireta, pois o EDTA não interage diretamente com a DNase.

A concentração de K₂EDTA nos tubos utilizados neste estudo é de 1,8 miligrama por mililitro de sangue ($4,5 \times 10^{-3}$ M) e a quantidade deste anticoagulante presente nos tubos para plasma-EDTA disponíveis no mercado variam entre 1,5 - 2,0 miligramas por mililitro de sangue [61]. Nestas concentrações (5×10^{-3} M) foi observado um inibição importante, mas não completa, da atividade DNase nas curvas dose-resposta do plasma fresco e do soro. Conclusão similar pode ser obtida da pequena, mas ainda detectável, atividade DNase encontrada nas amostras de plasma-EDTA. Juntas, estas observações sugerem que os testes moleculares baseados na análise de cfDNA podem se beneficiar do aumento de 10 vezes na concentração de EDTA no tubo de coleta primário, pois nenhuma atividade, ou uma atividade negligenciável, foi observada à 5×10^{-2} M na curva dose-resposta.

O IC₅₀ para o EDTA no plasma fresco ou soro foram similares sugerindo que concentrações semelhantes deste anticoagulante exibem os mesmos efeitos inibitórios em ambas espécimes [62], no entanto, foi observado uma maior atividade degradante de DNA no plasma fresco quando comparado ao soro. A atividade observada no plasma fresco deve ser similar à observada no sangue in vivo e a menor atividade do soro pode ser secundária ruptura de leucócitos e liberação de inibidores que ocorre durante o processo de coagulação [63]. O principal inibidor identificado foi a actina [64].

O terceiro achado do presente estudo foi que o cfDNA esta protegido da degradação desencadeada pela temperatura no plasma-EDTA, ou seja, das atividade degradante de DNA endógena. Esta observação é suportada pelos experimentos de exposição a diferentes temperaturas. À 37°C, a quantidade de cfDNA apresentou um maior diminuição no soro comparada ao plasma-EDTA provavelmente por que o EDTA indiretamente inibiu a atividade DNase esta ultima espécime. Estas observações confirmam que a atividade DNase presente no sangue pode seus efeitos na amostras *ex-vivo* and pode diminuir a quantidade de cfDNA nas amostras biológicas.

Entretanto, apesar da inibição mediada pelo EDTA a pequena, mas ainda detectável, atividade nucleásica encontrada nas amostras de plasma-EDTA ocasionou uma redução da quantidade de cfDNA próxima à significância ($p=0,07$) nas primeiras 24 horas, e uma redução significativa após 48 horas. A eliminação desta atividade enzimática residual pode aumentar a estabilidade do cfDNA no plasma-EDTA.

Considerando a exposição às temperaturas pragmáticas de transporte e armazenamento de um laboratório clínico por 24 horas, nenhuma diferença foi observada na quantidade de cfDNA à -20°C e 4°C , ao passo que à 22°C uma diminuição foi observada no soro, mas não no plasma-EDTA. Estas evidências sugerem que a atividade DNase das amostras é desencadeada pela temperatura sendo uma variável pré-analítica mais impactante para as amostras de soro. Neste sentido, a quantidade de cfDNA insistentemente menor no soro comparada ao plasma-EDTA presente nas amostras pareados do estudo “investigação de vínculo genético pela análise do sangue materno” pode ser secundária ao transporte à $22\pm 4^{\circ}\text{C}$ para centro de processamento. Então, nos ensaios envolvendo o cfDNA, um controle rigoroso de temperatura de transporte e armazenamento deve ser aplicado se a amostras biológica for o soro. Por outro lado, este controle pode ser mais flexível se a amostra for plasma-EDTA.

Atualmente, diversas considerações pré-analíticas referentes a análise de cfDNA foram estudadas e o plasma-EDTA é a matriz de escolha, pois garante a estabilidade do analíto e também evita a contaminação com DNA genômico de leucócitos liberado no soro em decorrência da coagulação [63]. Diversos estudos demonstraram que o cfDNA permanece estável por 24 horas após a flebotomia no plasma-EDTA e concluíram que ele pode ser medido em laboratórios de referência através de envio “overnight” por serviços de postagem comerciais [65, 66]. Outros autores descreveram melhores resultados utilizando o plasma-EDTA em comparação com o soro [67, 68]. Todas estas evidências suportam a conclusão de que o EDTA inibe a atividade DNase da amostra e protege o cfDNA ex-vivo no plasma-EDTA, fato demonstrado pela primeira vez no presente estudo.

Por fim, a proteção conferida pelo EDTA pode ser extrapolada para outros DNA alvos e o uso deste anticoagulante pode mitigar os efeitos pré-analíticos da DNases

sanguíneas. Em conclusão, estas evidências mostraram que as DNases do sangue estão ativas no soro e o EDTA, anticoagulante amplamente utilizado para análises de biologia molecular, também funciona como um inibidor indireto das DNases do sangue que evita a degradação ex-vivo do DNA.

6 CONCLUSÕES

- As DNases sanguíneas podem impactar na quantidade de DNA fetal livre de células no sangue materno mais intensamente na amostra soro do que no plasma-EDTA.

- O EDTA inibe as DNases sanguíneas no plasma-EDTA conferindo proteção *ex-vivo* ao DNA fetal livre de células, provavelmente por quelar íons divalentes (Ca^{+2} , Mg^{+2} e Mn^{+2}), os quais são essenciais para sua completa atividade enzimática.

- Preferir o uso do plasma-EDTA no projeto "Investigação de vínculo genético pela análise do plasma materno".

REFERÊNCIAS

1. Jung K, Fleischhacker M, Rabien A. Cell-free DNA in the blood as a solid tumor biomarker--a critical appraisal of the literature. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2010;411:1611-24.
2. El Messaoudi S, Rolet F, Mouliere F, Thierry AR. Circulating cell free DNA: Preanalytical considerations. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2013;424:222-30.
3. Lo YM, Patel P, Wainscoat JS, Sampietro M, Gillmer MD, Fleming KA. Prenatal sex determination by DNA amplification from maternal peripheral blood. *Lancet*. 1989;2:1363-5.
4. Lo YM, Bowell PJ, Selinger M, Mackenzie IZ, Chamberlain P, Gillmer MD, et al. Prenatal determination of fetal rhd status by analysis of peripheral blood of rhesus negative mothers. *Lancet*. 1993;341:1147-8.
5. Chiu RW, Chan KC, Gao Y, Lau VY, Zheng W, Leung TY, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105:20458-63.
6. Ryan A, Baner J, Demko Z, Hill M, Sigurjonsson S, Baird ML, et al. Informatics-based, highly accurate, noninvasive prenatal paternity testing. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*. 2013;15:473-7.
7. Dawson SJ, Tsui DW, Murtaza M, Biggs H, Rueda OM, Chin SF, et al. Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *The New England journal of medicine*. 2013;368:1199-209.
8. Mouliere F, El Messaoudi S, Gongora C, Guedj AS, Robert B, Del Rio M, et al. Circulating cell-free DNA from colorectal cancer patients may reveal high kras or braf mutation load. *Translational oncology*. 2013;6:319-28.
9. Diehl F, Li M, Dressman D, He Y, Shen D, Szabo S, et al. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102:16368-73.
10. Mouliere F, Robert B, Arnau Peyrotte E, Del Rio M, Ychou M, Molina F, et al. High fragmentation characterizes tumour-derived circulating DNA. *PloS one*. 2011;6:e23418.

11. Pao W, Miller VA, Politi KA, Riely GJ, Somwar R, Zakowski MF, et al. Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the egfr kinase domain. *PLoS medicine*. 2005;2:e73.
12. Antonescu CR, Besmer P, Guo T, Arkun K, Hom G, Koryotowski B, et al. Acquired resistance to imatinib in gastrointestinal stromal tumor occurs through secondary gene mutation. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2005;11:4182-90.
13. Benesova L, Belsanova B, Suchanek S, Kopeckova M, Minarikova P, Lipska L, et al. Mutation-based detection and monitoring of cell-free tumor DNA in peripheral blood of cancer patients. *Analytical biochemistry*. 2013;433:227-34.
14. Diaz LA, Jr., Bardelli A. Liquid biopsies: Genotyping circulating tumor DNA. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2014;32:579-86.
15. Heitzer E, Auer M, Ulz P, Geigl JB, Speicher MR. Circulating tumor cells and DNA as liquid biopsies. *Genome medicine*. 2013;5:73.
16. Elshimali YI, Khaddour H, Sarkissyan M, Wu Y, Vadgama JV. The clinical utilization of circulating cell free DNA (ccfdna) in blood of cancer patients. *International journal of molecular sciences*. 2013;14:18925-58.
17. Barra GB, Santa Rita TH, Chianca CF, Velasco LF, Sousa C. Fetal male lineage determination by analysis of y-chromosome str haplotype in maternal plasma. *Forensic science international Genetics*. 2014.
18. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet*. 1997;350:485-7.
19. Lo YM, Tein MS, Lau TK, Haines CJ, Leung TN, Poon PM, et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: Implications for noninvasive prenatal diagnosis. *American journal of human genetics*. 1998;62:768-75.
20. Alberry M, Maddocks D, Jones M, Abdel Hadi M, Abdel-Fattah S, Avent N, et al. Free fetal DNA in maternal plasma in anembryonic pregnancies: Confirmation that the origin is the trophoblast. *Prenatal diagnosis*. 2007;27:415-8.
21. Bischoff F. Two stage enrichment of cell-free fetal dna in maternal plasma. United States: Novartis Vaccines And Diagnostics, Inc; 2008. p. 6.
22. Westheimer FH. Why nature chose phosphates. *Science*. 1987;235:1173-8.
23. Love JD, Hewitt RR. The relationship between human serum and human pancreatic dnase i. *The Journal of biological chemistry*. 1979;254:12588-94.

24. Baranovskii AG, Buneva VN, Nevinsky GA. Human deoxyribonucleases. *Biochemistry Biokhimiia*. 2004;69:587-601.
25. Yasuda T, Nadano D, Iida R, Takeshita H, Lane SA, Callen DF, et al. Chromosomal assignment of the human deoxyribonuclease i gene, dnase 1 (dnl1), to band 16p13.3 using the polymerase chain reaction. *Cytogenetics and cell genetics*. 1995;70:221-3.
26. Yasuda T, Nadano D, Takeshita H, Tenjo E, Kishi K. Molecular analysis of the third allele of human deoxyribonuclease i polymorphism. *Annals of human genetics*. 1995;59:139-47.
27. Shak S, Capon DJ, Hellmiss R, Marsters SA, Baker CL. Recombinant human dnase i reduces the viscosity of cystic fibrosis sputum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1990;87:9188-92.
28. Oefner C, Suck D. Crystallographic refinement and structure of dnase i at 2 Å resolution. *J Mol Biol*. 1986;192:605-32.
29. Kishi K, Yasuda T, Ikehara Y, Sawazaki K, Sato W, Iida R. Human serum deoxyribonuclease i (dnase i) polymorphism: Pattern similarities among isozymes from serum, urine, kidney, liver, and pancreas. *American journal of human genetics*. 1990;47:121-6.
30. Nadano D, Yasuda T, Kishi K. Measurement of deoxyribonuclease i activity in human tissues and body fluids by a single radial enzyme-diffusion method. *Clinical chemistry*. 1993;39:448-52.
31. Sierakowska H, Shugar D. Mammalian nucleolytic enzymes. *Progress in nucleic acid research and molecular biology*. 1977;20:59-130.
32. Funakoshi A, Wakasugi H, Ibayashi H. Clinical investigation of serum deoxyribonuclease: II. Clinical studies of serum deoxyribonuclease activity in pancreatic disease. *Gastroenterologia Japonica*. 1979;14:436-40.
33. Shimada O, Suzuki S, Tosaka-Shimada H, Ishikawa H. Detection of deoxyribonuclease i in a hormone-secretory pathway of pituitary cells in humans and rats. *Cell structure and function*. 1998;23:49-56.
34. Drew HR. Structural specificities of five commonly used DNA nucleases. *J Mol Biol*. 1984;176:535-57.
35. Suck D, Oefner C, Kabsch W. Three-dimensional structure of bovine pancreatic dnase i at 2.5 Å resolution. *The EMBO journal*. 1984;3:2423-30.

36. Bernardi A, Gaillard C, Bernardi G. The specificity of five dnaases as studied by the analysis of 5'-terminal doublets. *European journal of biochemistry / FEBS*. 1975;52:451-7.
37. Martinez Valle F, Balada E, Ordi-Ros J, Vilardell-Tarres M. Dnase 1 and systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev*. 2008;7:359-63.
38. Goding JW, Terkeltaub R, Maurice M, Deterre P, Sali A, Belli SI. Ectophosphodiesterase/pyrophosphatase of lymphocytes and non-lymphoid cells: Structure and function of the pc-1 family. *Immunological reviews*. 1998;161:11-26.
39. Ramandanis G, Agnantis N, Garas J, Spandidos DA. Correlation between serum and tissue deoxyribonuclease levels in breast cancer patients. *Anticancer research*. 1982;2:213-8.
40. Funakoshi A, Tsubota Y, Wakasugi H, Ibayashi H, Takagi Y. Clinical studies on human pancreatic deoxyribonuclease i. *Gastroenterologia Japonica*. 1979;14:48-54.
41. Basso D, Piera Panozzo M, Fabris C, Meggiato T, Fogar P, Del Favero G, et al. Deoxyribonuclease i serum activity in pancreatic cancer. *Bulletin du cancer*. 1990;77:385-7.
42. Chitrabamrung S, Rubin RL, Tan EM. Serum deoxyribonuclease i and clinical activity in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology international*. 1981;1:55-60.
43. Yasutomo K, Horiuchi T, Kagami S, Tsukamoto H, Hashimura C, Urushihara M, et al. Mutation of dnase1 in people with systemic lupus erythematosus. *Nature genetics*. 2001;28:313-4.
44. Rubin BK. Aerosolized recombinant human deoxyribonuclease i in the treatment of cystic fibrosis. *The New England journal of medicine*. 1992;327:571.
45. Shah PL, Scott SF, Geddes DM, Hodson ME. Two years experience with recombinant human dnase i in the treatment of pulmonary disease in cystic fibrosis. *Respiratory medicine*. 1995;89:499-502.
46. Eisenberg JD, Aitken ML, Dorkin HL, Harwood IR, Ramsey BW, Schidlow DV, et al. Safety of repeated intermittent courses of aerosolized recombinant human deoxyribonuclease in patients with cystic fibrosis. *The Journal of pediatrics*. 1997;131:118-24.
47. Shah PL, Scott SF, Knight RA, Marriott C, Ranasinha C, Hodson ME. In vivo effects of recombinant human dnase i on sputum in patients with cystic fibrosis. *Thorax*. 1996;51:119-25.

48. Pan CQ, Dodge TH, Baker DL, Prince WS, Sinicropi DV, Lazarus RA. Improved potency of hyperactive and actin-resistant human dnase i variants for treatment of cystic fibrosis and systemic lupus erythematosus. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273:18374-81.
49. Pan CQ, Lazarus RA. Hyperactivity of human dnase i variants. Dependence on the number of positively charged residues and concentration, length, and environment of DNA. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273:11701-8.
50. Sato S, Takenaka S. Highly sensitive nuclease assays based on chemically modified DNA or rna. *Sensors*. 2014;14:12437-50.
51. Choi SJ, Szoka FC. Fluorometric determination of deoxyribonuclease i activity with picogreen. *Analytical biochemistry*. 2000;281:95-7.
52. Trubetskoy VS, Hagstrom JE, Budker VG. Self-quenched covalent fluorescent dye-nucleic acid conjugates as polymeric substrates for enzymatic nuclease assays. *Analytical biochemistry*. 2002;300:22-6.
53. Kiedrowski MR, Kavanaugh JS, Malone CL, Mootz JM, Voyich JM, Smeltzer MS, et al. Nuclease modulates biofilm formation in community-associated methicillin-resistant staphylococcus aureus. *PloS one*. 2011;6:e26714.
54. Sonawane S, Khanolkar V, Namavari A, Chaudhary S, Gandhi S, Tibrewal S, et al. Ocular surface extracellular DNA and nuclease activity imbalance: A new paradigm for inflammation in dry eye disease. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2012;53:8253-63.
55. DNaseAlert™ QC System.
<http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/AM1970>
56. Puccetti A, Madaio MP, Bellese G, Migliorini P. Anti-DNA antibodies bind to dnase i. *The Journal of experimental medicine*. 1995;181:1797-804.
57. Doctor VM. Inhibition of deoxyribonuclease i of human serum in vitro by nitrogen mustard or leucocyte extracts. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1962;96:475-8.
58. Chen B, Costantino HR, Liu J, Hsu CC, Shire SJ. Influence of calcium ions on the structure and stability of recombinant human deoxyribonuclease i in the aqueous and lyophilized states. *Journal of pharmaceutical sciences*. 1999;88:477-82.
59. Macanovic M, Lachmann PJ. Measurement of deoxyribonuclease i (dnase) in the serum and urine of systemic lupus erythematosus (sle)-prone nzb/nzw mice by a new

- radial enzyme diffusion assay. *Clinical and experimental immunology*. 1997;108:220-6.
60. Cherepanova A, Tamkovich S, Pyshnyi D, Kharkova M, Vlassov V, Laktionov P. Immunochemical assay for deoxyribonuclease activity in body fluids. *Journal of immunological methods*. 2007;325:96-103.
61. CLSI. Tubes and additives for venous and capillary blood specimen collection; approved standard—sixth edition. Clinical and Laboratory Standards Institute: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2010.
62. Cheng Y, Prusoff WH. Relationship between the inhibition constant (k_1) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (i_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochemical pharmacology*. 1973;22:3099-108.
63. Lee TH, Montalvo L, Chrebtow V, Busch MP. Quantitation of genomic DNA in plasma and serum samples: Higher concentrations of genomic DNA found in serum than in plasma. *Transfusion*. 2001;41:276-82.
64. Lazarides E, Lindberg U. Actin is the naturally occurring inhibitor of deoxyribonuclease i. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1974;71:4742-6.
65. Angert RM, LeShane ES, Lo YM, Chan LY, Delli-Bovi LC, Bianchi DW. Fetal cell-free plasma DNA concentrations in maternal blood are stable 24 hours after collection: Analysis of first- and third-trimester samples. *Clinical chemistry*. 2003;49:195-8.
66. Barrett AN, Zimmermann BG, Wang D, Holloway A, Chitty LS. Implementing prenatal diagnosis based on cell-free fetal DNA: Accurate identification of factors affecting fetal DNA yield. *PloS one*. 2011;6:e25202.
67. Andersen RF, Spindler KG, Jakobsen A, Pallisgaard N. Plasma is superior to serum for cfDNA mutation detection and monitoring. *AACR Symposium on Molecular Targets and Cancer Therapeutics*. Dublin, Ireland: *European Journal of Cancer and Clinical Oncology*; 2012. p. 148-9.
68. Vallee A, Marcq M, Bizieux A, Kouri CE, Lacroix H, Bennouna J, et al. Plasma is a better source of tumor-derived circulating cell-free DNA than serum for the detection of egfr alterations in lung tumor patients. *Lung cancer*. 2013;82:373-4.

APENDICE I – PREMIAÇÕES

ESTE TRABALHO FOI PREMIADO PELA DIVISÃO DE PATOLOGIA MOLECULAR DA ASSOCIAÇÃO AMERICANA DE QUÍMICA CLÍNICA NA CATEGORIA ESTUDANTE DO PRÊMIO DE EXCELÊNCIA CIENTÍFICA DO CONGRESSO AACC DE 2013 (HOUSTON – TX).

APÊNDICE II – ARTIGO SUBMETIDO A CLINICAL BIOCHEMISTRY

ANEXO I – APROVAÇÃO EM COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/FS

PROCESSO DE ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

Registro do Projeto no CEP: **188/12**

Título do Projeto: “Investigação do vínculo genético fetal pela análise do sangue materno”.

Pesquisadora Responsável: Gustavo Barcelos Barra

Data de Entrada: 23/11/12

Com base na Resolução 196/96, do CNS/MS, que regulamenta a ética em pesquisa com seres humanos, o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, após análise dos aspectos éticos e do contexto técnico-científico, resolveu **APROVAR** o projeto **188/12** com o título: “Investigação do vínculo genético fetal pela análise do sangue materno”, analisado na 11ª Reunião Ordinária, realizada no dia 11 dezembro de 2012.

O pesquisador responsável fica, desde já, notificado da obrigatoriedade da apresentação de um relatório semestral e relatório final sucinto e objetivo sobre o desenvolvimento do Projeto, no prazo de 1 (um) ano a contar da presente data (item VII.13 da Resolução 196/96).

Brasília, 19 de fevereiro de 2013.

Prof. Natália Monsorens
Coordenador do CEP-FS/UnB