LESLIE CLIFFORD NORONHA ARAUJO

ESTUDO PILOTO: DIAGNÓSTICO DO CÂNCER UROLÓGICO POR VIA METABONÔMICA

Recife
2016

LESLIE CLIFFORD NORONHA ARAUJO

ESTUDO PILOTO: DIAGNÓSTICO DO CÂNCER UROLÓGICO POR VIA METABONÔMICA

Tese apresentada ao programa de pós-graduação em Cirurgia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito final para o obtenção do grau de Doutor

Orientador: Prof. Dr. Salvador Vilar Correia Lima, Ph.D
Co-orientador: Prof Dr. Ricardo Oliveira da Silva, Ph.D

Recife
2016

Catalogação na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4 1010

A663 Araujo, Leslie Clifford Noronha.
Estudo piloto: diagnóstico do câncer urológico por via metabonômica / Leslie Clifford Noronha Araujo. – 2016.
84 f.: il.; tab.; quad.; gráf.; 30 cm.

Orientador: Salvador Vilar Correia Lima.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Cirurgia. Recife, 2016.
Inclui referências e anexos.

1. Metabolômica. 2. Neoplasias da próstata. 3. Neoplasias da bexiga urinária. 4. Neoplasias renais. 5. Diagnóstico. I. Lima, Salvador Vilar Correia (Orientador). II. Titulo.

617.91 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2017-067)

ESTUDO PILOTO: DIAGNÓSTICO DO CÂNCER UROLÓGICO POR VIA METABONÔMICA

LESLIE CLIFFORD NORONHA ARAUJO

APROVADO EM: 19/07/2016

ORIENTADOR INTERNO: Dr. SALVADOR VILAR CORREIA LIMA
CO-ORIENTADOR: Dr. RICARDO OLIVEIRA DA SILVA

COMISSÃO EXAMINADORA:

_____
PROF° Dr° JOSÉ LAMARTINE DE ANDRADE AGUIAR – CCS – UFPE

_____
PROF° Dr° EUCLIDES DIAS MARTINS FILHO – CCS – UFPE

_____
DR° JOSÉ GUIDO CORREA DE ARAÚJO JÚNIOR – CCS - UFPE

_____
PROF° DR° SILVIO DA SILVA CALDAS NETO – CCS - UFPE

_____
DR° AMANDA VASCONCELOS DE ALBUQUERQUE PEREIRA – NCE – CCS – UFPE

SUPLENTES:

_____
PROF° DR° LÚCIO VILAR RABELO FILHO – CCS – UFPE

_____
PROF° DR° ERIDEISE GURGEL DA COSTA - UNICAP

À minha querida esposa **Flávia Cristina Morone Pinto,** sem você esta tese não existiria.

Aos meus pais **José Mauro Leite Araujo e Frances Noronha Araujo**, por serem meus incentivadores nos momentos difíceis

Aos meus filhos, **Guilherme Morone Araujo** e **Isabela Morone Araujo,** a quem desejo ser um bom exemplo.

AGRADECIMENTOS

Muitas pessoas contribuíram para a realização deste trabalho, sendo impossível citar todas, mas gostaria de agradecer a todos aqueles envolvidos no Serviço de Urologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, a todos os pesquisadores, técnicos e professores do Departamento de Química Fundamental do Centro de Ciências da Natureza da Universidade Federal de Pernambuco

Em especial gostaria de agradecer aos professores Salvador Vilar Correia Lima e Ricardo Oliveira da Silva pela oportunidade de trabalhar neste trabalho promissor, além de Ronaldo Dionísio e Tássia Brena da Costa que sempre estiveram disponíveis.

Um agradecimento especial a minha esposa Flávia Cristina Morone Pinto, que foi uma grande mentora em todas as etapas deste trabalho, incansável e sempre disposta.

A todos muito obrigado.

RESUMO

As neoplasias malignas urológicas mais prevalentes são o câncer de próstata, de bexiga e o de rim. Estas três neoplasias estão relacionadas a uma perda importante da qualidade de vida dos pacientes e possuem tratamentos agressivos. O diagnóstico de cada uma destas doenças é realizado, na maioria das vezes, de forma invasiva e possui complicações inerentes a cada procedimento. Neste sentido, a busca de métodos por diagnóstico não invasivos tem sido estudada, e a via metabonômica através da espectometria por ressonância nuclear magnética de hidrogênio (RNM 1H) fornece informações de vias metabólicas que podem diagnósticas patologias sem a necessidade de procedimentos invasivos. Os voluntários foram distribuídos em grupo controle (07 voluntários) composto de homens com idades entre 60 e 67 anos, grupo CP com voluntários portadores câncer de próstata (09 voluntários) com idades entre 61 e 69 anos, grupo CB com voluntários portadores câncer de bexiga (05 voluntários), sendo dois homens com idade de 70 e 76 anos e três mulheres com idades entre 57 e 75 anos e grupo CR com voluntários portadores câncer de rim (05 voluntários), sendo um homem com 35 anos e 4 mulheres com idade entre 54 e 64 anos. Uma amostra de 3ml de urina foi colhida de 26 voluntários para a elaboração do estudo piloto. Este material foi submetido à RNM 1H seguindo o protocolo do Departamento de Química Fundamental da UFPE com posterior geração de espectros. A estatística multivariada para a elaboração de modelos metabonômicos e a análise de comparação de grupos foi realizada. Esses modelos mostraram uma discreta separação entre o grupo controle e cada um dos três grupos de voluntários com patologias oncológicas. Para criação de modelos definitivos foi necessário agrupar os voluntários com câncer de bexiga e rim (CB/CR) devido ao pequeno número de amostras por grupo. O modelo metabonômico quando comparado ao grupo controle mostrou uma sensibilidade de 90,9%, especificidade de 100%, VPP de 100% e VPN de 85,7% para o grupo CB/CR e sensibilidade, especificidade, VPP e VPN de 100% para o grupo CP. Este estudo piloto demonstra que o método é simples, de fácil execução, não invasivo e com possibilidade de diagnóstico das patologias oncológicas com uma única coleta de urina.

Palavras chave: Metabolômica. Neoplasias da Próstata. Neoplasias da Bexiga Urinária. Neoplasias Renais. Diagnóstico.

ABSTRACT

The most prevalent urological malignancies are prostate cancer, bladder cancer and kidney cancer. The first one is the most common solid cancer in men and the others can affect men and women. These three malignancies are related to a significant loss of quality of life of patients and have aggressive treatments. The diagnosis of each of these diseases is conducted, in most cases, invasively and including all complications inherent to each procedure. In this sense the search for non-invasive diagnostic methods has been studied, and the metabonomics spectrometry method by nuclear magnetic resonance of hydrogen (1H NMR) provides pathways of diagnostic information that can identify pathologies without the need of invasive procedures. A sample of 3ml of urine was collected of 26 volunteers for the preparation of this pilot study. They were distributed in 4 groups. The control group (07 volunteers) comprised men aged 60 to 67 years, CP group of volunteers with prostate cancer (09 volunteers) aged 61 to 69, CB group included volunteers with bladder cancer (05 volunteers), two men aged 70 and 76 years and three women aged between 57 and 75 years and CR group of volunteers with kidney cancer (05 volunteers), one man of 35 years and four women aged between 54 and 64 years. This material was subjected to 1H MRI following the protocol of the Fundamental Chemistry Department of UFPE with generation of spectra. The multivariate statistics for the development of metabonomics models and comparison analysis groups was performed. These models showed a slight separation between the control group and each of the three groups of patients with oncological diseases. For the elaboration of the definitive models it was necessary to incorporate the volunteers of the CB and CR due to the small number of samples per group. The metabonomic method when compared to control group shown sensitivity of 90.9%, specificity of 100%, 100% PPV and NPV of 85.7% for the group CB/CR and sensitivity, specificity, PPV and NPV of 100% for the CP group. This pilot study demonstrates that the method is feasible with easy execution, showing simplicity besides being not invasive and allowing the diagnosis of oncological diseases with a single urine collection.

Keywords: Metabolomics. Prostatic Neoplasms. Urinary Bladder Neoplasms. Kidney Neoplasms. Diagnosis.

LISTA DE TABELAS, GRÁFICOS E QUADROS

PÁGINA

Tab1. Câncer de Bexiga. Tipos histológicos **34**

Tab2. Resumo dos voluntários **63**

Tab3. Matriz criada à partir dos espectros de CB/CR **66**

Tab4. Matriz criada a partir dos espectros de CP **68**

Tab5. Comparação de estudos CB/CR **72**

Tab6. Comparação de estudos CP **73**

Gráfico1. Número de publicações até junho de 2016 **42**

Quadro1. Etapas da carcinogênese **19**

Quadro2. Formas de mutações gênicas **21**

Quadro3. Incidência de câncer de acordo com desenvolvimento do país e gênero **23**

Quadro4. Recomendações para o rastreamento câncer de próstata de acordo com a sociedade **27**

LISTA DE FIGURAS

	PÁGINA
Figura1. Biópsia transretal de próstata	30
Figura2 A e B. Classificação TNM	35
Figura3. Classificação TNM	39
Figura4. Simulação de espectro de RNM	45
Figura5. Representação esquemática da obtenção dos espectros	45
Figura6. Scores plot de resultados CB/CR	64
Figura7. LDA de CB/CR	65
Figura8. Scores plot de resultados CP	67
Figura9. LDA de CP	67

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

DNA - Ácido Desoxirribonucléico

HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana

PSA – Antígeno Prostático Específico

MMII- Membros Inferiores

USPSTF – ***U.S. Preventive Service Task Force***

AAFP – ***American Academy of Family Phisician***

ACS – ***American Cancer Society***

AUA – ***American Urological Association***

INCA – Instituto Nacional do Câncer

CCE – Carcinoma de Células Escamosas

CIS – Carcinoma ***in situ***

RTU – Ressecção Transuretral

US – Ultrassonografia

TC – Tomografia Computadorizada

RNM – Ressonância Nuclear Magnética

CCR – Carcinoma de Células Renais

VHS – Velocidade de Hemossedimentação

PCA – Análise dos Componentes Principais

PLS-DA – Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Principais

LDA – Análise Discriminante Linear

SIMCA – *Soft Independent Modelling of Class Analogy*

LCR – Líquido Cefalo-raquidiano

^{1}H - Hidrogênio

MS – Espectroscopia de Massa

GC/MS – Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectroscopia de massas

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Performance

RMI – Ressonância Nucleaar Magnética de Imagem

RMS – Espectroscopia de Ressonância Nuclear Magnética

T – Tesla

^{13}C – Carbono

^{31}P – Fósforo

^{15}N – Nitrogênio

PPM – Partes por Milhão

MHz – Mega-hertz

Hz – Hertz

δ- Delta

RF – Radiofreqüência

CEP – Comitê de ética em Pesquisa

HC/UFPE – Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco

BCG – Bacilo de Calmette-Guérin

DQF – Departamento de Química Fundamental

Na_2HPO_4 – Fosfato Monobásico de Sódio

$Na_2H_2PO_4$ – Fosfato Dibásico de Sódio

BIN – Região Espectral

VIP – Impportância de Variáveis Para Projeção

VPP – Valor Preditivo Positivo

VPN – Valor Preditivo Negativo

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	15
1.1 O CÂNCER	18
1.1.1 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER	22
1.1.2 O CÂNCER DE PRÓSTATA	24
1.1.2.1 O RASTREAMENTO DO CÂNCER DE PRÓSTATA	26
1.1.2.2 O DIAGNÓSTICO DO CÂNCER DA PRÓSTATA	29
1.1.3 O CÂNCER DE BEXIGA	32
1.1.3.1 O DIAGNÓSTICO DO CÂNCER DE BEXIGA	37
1.1.4 O CÂNCER DE RIM	38
1.1.4.1 O DIAGNÓSTICO DO CÂNCER DE RIM	40
1.2 A METABONÔMICA	41
1.2.1 APLICAÇÕES CLÍNICAS	51
1.3 JUSTIFICATIVA PARA A INVESTIGAÇÃO	54
2. OBJETIVO	56
3. MATERIAIS E MÉTODOS	57
3.1 SUBMISSÃO AO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP)	57
3.2 SELEÇÃO DE VOLUNTÁRIOS	57
3.3 ESPECTOMETRIA DE RNM ^{1}H	59
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	61
4. RESULTADOS	63
5. DISCUSSÃO	69
6. CONCLUSÃO	74
REFERÊNCIAS	75

ANEXOS **83**

ANEXO I – Termo de Consentimento livre e esclarecido **83**

1. INTRODUÇÃO

Em um organismo humano normal a estimativa de divisões celulares durante toda a vida é em torno de 10^{16} vezes. Uma fração destas divisões produz células geneticamente modificadas, mas mecanismos de defesa possibilitam a interrupção deste processo, promovendo a sua eliminação [1, 2].

No entanto, quando os mecanismos de controle do crescimento celular não respondem, há uma proliferação celular desgovernada, produzindo assim uma alteração na homeostasia celular.

Os oncogenes são os responsáveis pela ativação de células modificadas, permitindo a elas o ganho da função mutante e, consequêntemente, a cancerização. A mutação de genes poderá ser capaz de conferir malignidade à célula[1].

Progressivamente, as células oncológicas já formadas se multiplicam, aumentando seu tamanho, ocupando áreas cada vez maiores do seu órgão alvo até gerar metástases, sejam por contiguidade ou à distância, por via hematogênica ou linfática [2].

Para a avaliação da extensão do câncer é preciso estadiar a doença, para determinar a extensão da neoplasia. O sistema TNM (tumor, nódulos e metástase) é o comumente empregado, onde “T” representa o tumor primário, “N” a invasão linfática e “M” a presença de metástases [3].

Na esfera da urologia as principais neoplasias malignas diagnosticadas são os cânceres de próstata, de bexiga e de rim. A expectativa para a incidência do câncer de próstata é de 60.180 novos casos por ano, ou seja, um risco de 62 casos para cada 100.000 homens; a de câncer de bexiga é de 9 novos casos para cada 100.000 pessoas, sendo esperado para os homens 6 casos para cada 100.000 e

para as mulheres 3 para 100.000; e, para o câncer de rim, o risco é de 2 novos casos em cada 100.000 pessoas [4, 5].

A partir da década de 1970 o câncer de próstata passou a ser rastreado também pela dosagem do PSA (Antígeno Prostático Especifico), promovendo um deslocamento ascendente na curva de incidência desta doença. Consoante a isto, observou-se um aumento no número de prostatectomias radicais, com o intuito curativo da doença neoplásica. O advento do PSA em conjunto com o toque retal, trouxe a possibilidade de diagnóstico deste câncer em fases precoces. Após a introdução do PSA observou-se uma redução de 32,5% da mortalidade [6-9].

A biópsia transretal é um exame desconfortável e doloroso, porém necessário quando há suspeita do câncer de próstata [10].

Para o estadiamento do câncer de bexiga utiliza-se o sistema TNM, que também é determinado pelo grau de invasão da parede vesical após RTU (ressecção endoscópica) da lesão. A cistoscopia, exame de referência para o diagnóstico e acompanhamento do câncer de bexiga, permite a avaliação da lesão, a realização de biópsias, assim como, ressecções parciais ou totais.

O câncer renal também é estadiado pelo TNM e a biópsia renal, apesar de invasiva, possui eficácia diagnóstica de até 80% [11].

A estratégia metabonômica pode ser considerada uma alternativa pouco ou, até mesmo, não invasiva para o diagnóstico ou rastreamento de doenças, inclusive para o câncer. Baseia-se no principio de que a alteração no fluxo de metabólitos endógenos, por diversos fatores, quebra o equilíbrio interno. As tentativas de manutenção homeostáticas, desencadeiam ajustes no ambiente intra e/ou extracelular. Essa resposta altera o perfil de metabólitos endógenos nos biofluidos e,

consequentemente, dos espectros que serão captados pela ressonância nuclear magnética (RNM) [12, 13].

A urina e o plasma são exemplos de biofluidos de fácil obtenção, que proporcionam uma visão do organismo de uma forma homogênea e em sua totalidade. A análise urinária apresenta uma grande vantagem em relação ao plasma, por não ser a coleta da amostra invasiva. Permite ainda a realização de coletas repetidas, sem transtornos para o paciente, o que é ótimo tanto em doenças agudas como no acompanhamento de doenças crônicas.

A metabonômica tem se estabelecido como uma ferramenta analítica bem sucedida aplicada em diferentes campos, por exemplo, no estudo de processos patológicos, toxicidade de drogas e na detecção dos metabólitos de erros inatos do metabolismo [14-18].

1.1 O CÂNCER

O Câncer é uma doença genética, de origem monoclonal, cujo desenvolvimento é decorrente de mutações em determinados genes e o fenótipo que sofre mutação e é propagado para as células filhas. Essas células uma vez modificadas não respondem mais aos fatores de controle do crescimento, proliferando-se sem controle e alterando a homeostasia celular [1].

Embora os tumores tenham origem monoclonal, com o tempo os constituintes celulares se transformam extremamente heterogêneos, chamados de subclones. Isto porque, o processo de carcinogênese é realizado em multietapas, sequencialmente, onde as alterações genéticas resultam no acúmulo de novas mutações [19]. Romaguera (2005) descreveu as quatro etapas da carcinogênese, pelas quais passa a maioria dos tumores (Quadro 1).

Durante o processo de divisão celular são produzidos danos genéticos em que podem ocorrer mutações espontâneas ou induzidas por agentes ambientais, chamados de carcinógenos. Porém, o aparecimento de um clone de células tumorais depende do rompimento de barreiras bioquímicas e fisiológicas em alvos de controle do próprio ciclo celular [1, 2].

Vários agentes já foram identificados como carcinógenos, como agentes químicos (tabaco, drogas, toxinas, etc), físicos (radiações) ou biológicos (papiloma vírus, Epstein-Barr vírus, vírus da Hepatite B, HIV entre outros) [20, 21].

Quadro 1. Etapas da Carcinogênese.

Etapas	**Desfechos**
1.Transformação maligna	As células sofrem o efeito da modificação genética, mas ainda não é possível diagnosticar clinicamente.
2.Crescimento da célula transformada e geração de heterogenicidade com acúmulo de mutações	Neste caso é necessário um contato prolongado com o agente carcinógeno promotor. A suspensão deste contato muitas vezes interrompe a progressão do câncer.
3.Invasão local	O que caracteriza a multiplicação descontrolada. Nesta fase o câncer já está instalado e começam a aparecer as primeiras manifestações clínicas.
4.Metástase	Envolve o destacamento das células tumorais do sitio primário, invasão da matriz celular, intravasão da corrente sanguínea, extravasão, colonização de órgãos distantes e formação de lesões secundárias [22].

Fonte: Romaguera, 2015 [22]

O organismo dispõe de mecanismos de defesa naturais que o protegem das agressões impostas por diversos agentes em diferentes situações. A integridade do

sistema imunológico, a capacidade de reparação do DNA danificado por agentes cancerígenos, a ação de enzimas responsáveis pela transformação e eliminação de substâncias cancerígenas são exemplos de mecanismos de defesa. Este fato ajuda a explicar a incidência de câncer em indivíduos da mesma família [21].

Os proto-oncogenes representam um dos fatores mais importantes para a indução de células cancerígenas. São genes que atuam de forma positiva induzindo ou estimulando a progressão do ciclo celular. A princípio, são inativos em células normais, mas quando ativados se transformam em oncogenes, cuja ação permitirá ganho de função mutante à célula e consequênte cancerização [1].

Os produtos resultantes da ativação destes genes atuam de forma dominante, ou seja, a mutação de um único alelo poderá ser capaz de conferir malignidade à célula [22].

Os proto-oncogenes podem se transformar em oncogenes por mudanças na estrutura do gene, conforme demonstrado no quadro 2, resultando na síntese de oncoproteínas (produtos genéticos anormais) com função aberrante; ou, por mudanças na regulação da expressão do gene, resultando em uma inadequação da produção de proteínas promotoras de crescimento estrutural normal [2, 23].

As oncoproteínas são produtos da expressão dos oncogenes e participam da transdução de sinais, durante as várias etapas do ciclo celular. Existem quatro categorias de oncoproteínas: (1) fator de crescimento, (2) receptor de fator do crescimento, (3) proteínas envolvidas na transdução de sinais e (4) proteínas reguladoras nucleares [22].

Quadro 2. Formas de mutações gênicas.

1. Pela inserção de transposons (sequências de DNA móveis que podem se autorreplicar em um determinado genoma) ou inserção retroviral, contendo um gene promotor, no início da oncogênese;
2. Por uma mutação pontual, que alteram as sequencias protéicas e aumentam sua atividade ou expressão;
3. Por translocação cromossômica, em que o rearranjo do material genético por translocação geralmente resulta em aumento da expressão do proto-oncogene.
4. Por amplificação gênica, onde a ativação do proto-oncogene associada com um aumento da expressão de seus produtos, pode resultar na reduplicação do DNA, produzindo várias cópias do pronto-oncogene nas células tumorais.

Fonte: Elaborado pelo autor com base em Romaguera, 2005 [22].

1.1.1 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER

O Brasil está sofrendo um processo de mudança em seu perfil demográfico como consequência do processo de urbanização, industrialização e dos avanços de ciência e tecnologia. Esta transição epidemiológica justifica a diminuição de doenças infecto-contagiosas e o aumento das doenças crônicas-degenerativas, especialmente as cardiovasculares e o câncer.

Ao mesmo tempo em que se percebe um aumento da prevalência de cânceres em indivíduos com nível sócioeconômico mais elevado, tais como mama, próstata e cólon e reto, observa-se também um aumento da prevalência de tumores normalmente associados à pobreza, como o de pênis, colo do útero, estômago e da cavidade oral. Este fato está associado à exposição diferenciada a fatores ambientais relacionados ao processo de industrialização, como agentes químicos, físicos ou biológicos, que variam de intensidade nas diversas condições de vida e classe social [24].

As taxas de incidência e mortalidade da maioria das doenças são inversamente relacionadas ao status sócioeconômico, variando de acordo com o nível de desenvolvimento do país (Quadro 3).

Quadro 3. Incidência de câncer de acordo com o desenvolvimento do país e o gênero.

Países	**Gênero**	**Câncer mais Incidente**
Desenvolvidos	Homens	Próstata, pulmão, cólon e reto.
	Mulheres	Mama, Cólon, Reto e Pulmão
Em desenvolvimento	Homens	Pulmão, estômago e fígado.
	Mulheres	Colo do útero e pulmão

Fonte: Elaborado pelo autor com base em Neto, 2015 [24].

No âmbito da urologia as principais neoplasias malignas diagnosticadas são os cânceres de próstata, de bexiga e de rim, por isso, normalmente, são as patologias oncológicas mais estudadas.

1.1.2 O CÂNCER DE PRÓSTATA

O câncer de próstata é o quarto câncer de maior incidência no homem, assumindo morbidade e mortalidade significativa em diversos países do mundo. A maior incidência ocorre após os 65 anos [25, 26]. Aproximadamente 915 mil homens foram diagnosticados com câncer de próstata no mundo em 2008. Nos EUA esta neoplasia é a segunda maior causa de morte entre todos os cânceres. A estimativa é do aumento da incidência para cerca de 1,7 milhões de casos, podendo ser a causa de morte de aproximadamente 500.000 homens até o ano de 2030 [27].

Com a introdução do PSA (antígeno prostático específico), a partir da década de 1970, percebeu-se uma elevação significativa no número de casos de câncer de próstata, principalmente de casos precoces[9]. Neste contexto, atribui-se o aumento na taxa de incidência à melhoria na forma de rastreamento deste tipo de câncer.

Observa-se uma relação clara entre a idade e o câncer de próstata. A frequência em autópsias é progressivamente maior com o avanço da idade. Em homens com 50 anos foi observada uma incidência de 40%, enquanto o risco de doença significativa gira em torno de 9,5% e o risco de morte entre 2,9% [6, 28, 29].

O risco também é elevado em famílias em que o ascendente teve a doença. E quanto mais precoce for a idade do diagnóstico, maior o risco atribuído aos seus descendentes. Em gêmeos univitelinos também foi observada concordância quatro vezes maior do que em relação aos bivitelinos, reforçando a hereditariedade da doença [30].

A incidência também é distinta com relação à cor da pele. A incidência é maior em homens negros, comparados aos brancos e asiáticos. Essa diferença é mitigada quando os asiáticos imigram para países de cultura ocidental,

demonstrando que além do fator hereditário, os efeitos ambientais e comportamentais ainda não estão esclarecidos [31].

A história natural do câncer de próstata é variável e, até o momento, imprevisível. Alguns tumores apresentam potencial maligno tão pronunciado que as metástases surgem antes que ocorram sinais locais ou sintomas sistêmicos. Em outros casos, são tão indolentes que permanecem localizados na glândula durante toda a vida do paciente, sem repercussão clínica [5].

Em fases iniciais o câncer de próstata não causa sintomas nem apresentam sinais. Os sintomas urinários, normalmente, estão relacionados ao crescimento benigno em vez da doença maligna. Portanto, tomar como base a abordagem sindrômica para investigação pode levar ao diagnóstico apenas em casos avançados [9].

1.1.2.1 O RASTREAMENTO DO CÂNCER DE PRÓSTATA

Assim como qualquer intervenção em saúde, o rastreamento do câncer de próstata pode oferecer riscos e benefícios. O benefício esperado é a redução da mortalidade e os riscos estão associados ao tratamento desnecessário em caso de falso-positivos e de neoplasias que nunca evoluiriam clinicamente. Os riscos e os benefícios devem ser analisados e discutidos antes da incorporação do método de rastreamento a um programa do sistema público de saúde.

Existe um senso comum de que a melhor maneira de lidar com um câncer é a combinação de diagnóstico precoce e tratamento agressivo. Por conseguinte a escassez de informações sobre os riscos associados ao sobrediagnóstico, e consequentemente, o que deveria ser mencionado durante campanhas de prevenção promovidas por hospitais, sociedades médicas, entre outras, podem ter efeitos negativos [8, 9, 32]. Tangentes a estes aspectos, há necessidade de se ampliar o debate sobre os problemas relacionados ao sobrediagnóstico, sobretratamento e sobreintervenção.

Por esta razão, existe muita controvérsia entre as diversas sociedades médicas sobre a necessidade de prevenção secundária ao câncer de próstata (Quadro 4).

Quadro 4. Recomendações sobre o rastreamento do câncer de próstata sob a ótica de algumas Sociedades Médicas.

Sociedades Médicas	**Recomendações**
U.S. Preventive Service Task Force (USPSTF) A *American Academy of Family Physician* (AAFP)	São contrárias ao rastreamento por evidências de que não há redução da mortalidade global [33-36].
American Câncer Society (ACS)	Recomenda o rastreamento a partir dos 50 anos e entre 40 e 45 para aqueles com alto risco [37].
American Urological Associaton (AUA)	- Homens com baixo risco (caucasianos ou sem história familiar) até os 40 anos, não se beneficiam com o rastreamento. Assim como os com mais de 70 nos e com expectativa de vida inferior a 10 – 15 anos. - Homens entre 40 e 54 anos com maior risco de doença devem procurar um urologista para individualizar seu programa de rastreamento. - Homens entre 55 e 69 anos, são fortemente recomendados que façam seu rastreamento devido à idade ter maior risco de incidência desta neoplasia. Tendo a periodicidade devendo ser decidida entre as partes. [38, 39]

Fonte: Elaborado pelo autor [34, 35, 40].

No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) recomenda que sejam mantidos os programas de rastreamento e, aqueles que procuram o sistema de saúde espontaneamente, devem ser informados sobre os riscos e benefícios do rastreamento, a fim de que individualizem o método com cada homem [41].

Recentemente, as diretrizes para o rastreamento do câncer de próstata estão sendo revistas por diversas entidades. Tem surgido novas evidências em relação à mortalidade de homens que fazem o rastreamento anual e novas revisões de banco de dados, que indicam a necessidade do rastreamento deste câncer [40, 42]. Embora já sejam encontradas publicações na literatura sobre o assunto [40], as instituições citadas no Quadro 4 ainda não definiram novas diretrizes, mantendo-se até o momento a decisão anterior.

1.1.2.2 O DIAGNÓSTICO DO CÂNCER DA PRÓSTATA

O diagnóstico do câncer de próstata é na maioria das vezes realizada pela biópsia prostática guiada por ultrassonografia transretal, sua indicação ocorre quando há elevação do PSA (Antígeno Prostático Específico), quando há presença de nódulo ou alteração na consistência da próstata [10]. Embora novos métodos associados à biópsia convencional tenham sido estudados, este ainda reflete o melhor índice de positividade, em torno de 40% [43, 44].

A biópsia transretal é um exame desconfortável e doloroso. O paciente é posicionado desnudo, em decúbito lateral esquerdo, com flexão forçada de MMII (membros inferiores). É então introduzido o *probe* ultrassonográfico, com preservativo não lubrificado e acoplado à pistola de coleta de fragmentos. A anestesia é somente local com lidocaína gel à 2%. São coletados no mínimo 12 fragmentos de forma bilateral, mesmo quando há suspeita somente de um lado da próstata. A biópsia transretal possui complicações como sangramentos retais, hematúria e hematospermia, além de infecções locais [45].

O desconforto deste método gera preconceitos e fuga de alguns pacientes na fase precoce da doença. A Figura 1 demonstra o método de biópsia transretal, de forma simplificada.

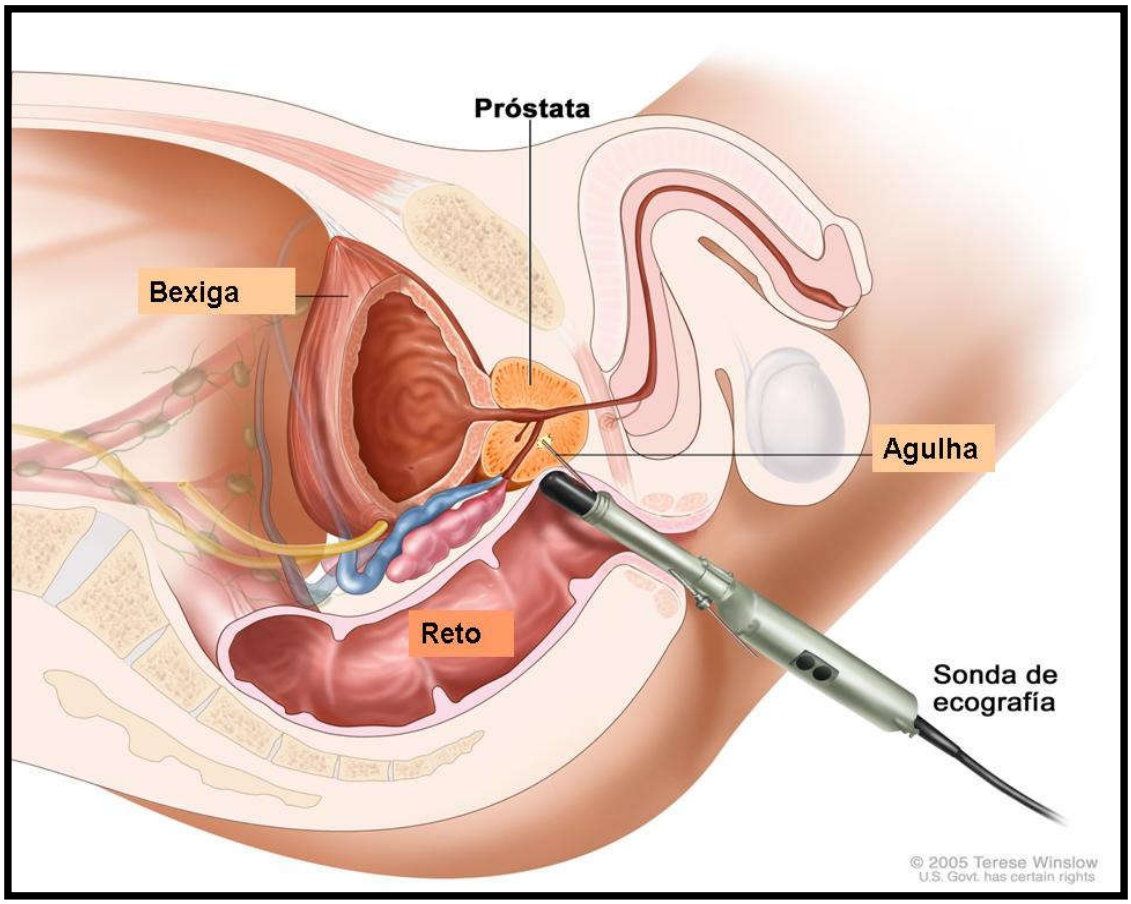


Figura 1: Biópsia transretal da próstata [46]

Após a realização da biópsia, advém-se a necessidade de estadiar, ou seja, classificar o câncer da próstata, para melhor indicar o seu tratamento.

O câncer de próstata é estadiado segundo a classificação de Gleason, que avalia o grau de diferenciação das células neoplásicas prostáticas, com escores variando entre 2 e 10. Quanto maior o valor, mais indiferenciado e agressivo é o tumor [47].

A prostatectomia radical, na maioria das vezes, é indicada para pacientes com potencial tratamento curativo pela cirurgia, geralmente com Gleason até 7 e PSA abaixo de 20 ng/ml [47]. A título de informação, quando o câncer de próstata

está presente geralmente o nível do PSA está acima de 4 ng/ml. Entretanto, um nível abaixo desse valor não significa que o câncer não esteja presente. Quase 15% dos homens com PSA abaixo de 4 ng/ml são diagnosticados com câncer de próstata na biópsia. Os homens com nível de PSA na faixa de 4 ng/ml e 10 ng/ml, tem chance de 1 em 4 de ter a doença. Se o PSA se encontra acima de 10 ng/ml, a probabilidade de ter câncer de próstata é superior a 50% [6].

A cirurgia realizada pode ser por três vias, a retro-púbica, perineal e laparoscópica. A técnica mais comumente realizada é a retro-púbica [48]. Quando a cirurgia não está indicada, outros métodos de acompanhamento ou tratamento são aplicados, como a vigilância ativa, radioterapia ou hormonioterapia, entre outros [5, 10].

1.1.3 O CÂNCER DE BEXIGA

O câncer de bexiga é o 4° tipo de câncer mais comum nos homens e o 13° em mulheres, essa discrepância pode ser explicada pelo tabagismo, principal fator de risco para o surgimento desta neoplasia, que é mais prevalente em homens[49].

O tabagismo é o principal fator de risco para o câncer de bexiga, estando relacionado com o surgimento e prognóstico da doença. É considerado responsável por 50% dos cânceres em homens e 40% em mulheres. O risco de desenvolvimento em fumantes é 2 a 3 vezes maior em relação aos não tabagistas [50, 51].

A incidência de câncer de bexiga aumenta com a idade, sendo o diagnóstico mais freqüente entre a 6ª e a 7ª década de vida, onde cerca de 70% dos casos a lesão diagnosticada é superficial [52].

Outro fator de risco importante diz respeito a exposição ocupacional às aminas aromáticas, em indústrias de tintas, couro, refinarias de petróleo, borracha, têxteis, de produtos para cabeleireiros e gráficas. Em países africanos, o *Schistosoma haematobium* é um importante fator de risco para um tipo específico de câncer de bexiga, o carcinoma de células escamosas.

Além disso, o histórico familiar, em especial em parentes de 1º grau, indica o risco 1,5 a 2 vezes maior no desenvolvimento de câncer de bexiga, se comparados a população em geral. Quando há associação entre a ligação familiar e o tabagismo esse risco pode subir para cerca de 5 vezes [49].

O câncer de bexiga está muito relacionado com a exposição a fatores ambientais e ao envelhecimento [53]. E o tipo histológico mais freqüente (cerca de 90% dos casos) é o carcinoma urotelial [5].

Segundo dados no INCA, em 2016, no Brasil, são esperados 9.670 novos casos de câncer de bexiga, sendo 7.200 novos casos em homens e 2.470 em mulheres [54].

São escassos os estudos sobre medidas de prevenção, mas acredita-se que a restrição aos fatores de risco seja a principal medida para evitar a neoplasia.

Os tumores vesicais são, na maioria, malignos, sendo a característica benigna muito rara, tais como metaplasia epitelial, papiloma invertido, adenomas e cistite cística [53].

Lima Júnior et al. (2015) descreveram a classificação dos tumores vesicais em três tipos principais: carcinoma urotelial, carcinoma de células escamosas (CCE) e adenocarcinomas, cujas prevalências estão mostradas na Tabela 1. O carcinoma urotelial é originário das células do epitélio de transição que recobrem quase todo o trato urinário e o CCE está associado à infecção crônica pelo *Schistosoma haematobium*. Já os adenocarcinomas são classificados como primários (de úraco e não úraco) e secundários (originários de metástates de outros órgãos como reto, estômago e endométrio)[53].

Existem ainda tipos raros como os sarcomas, melanomas, carcinomas de pequenas células e tumores carcinóides [53].

Os principais fatores relacionados com o prognóstico do tumor de bexiga são [53]:

- grau histológico;
- estadiamento;
- carcinoma in situ (CIS);
- multifocalidade (mais de três lesões);
- tamanho de lesões (>3 cm);

- aspecto endoscópico da lesão tumoral (séssil ou sólido é pior);

- tempo de recidiva após tratamento (menos de um ano, pior prognóstico);

- outros fatores menos importantes: invasão linfovascular, idade, sexo, ploidia tumoral, marcadores tumorais, perfuração vesical durante ressecção endoscópica (RTU) e invasão prostática.

Tabela 1: Câncer de Bexiga: Tipos histológicos e prevalências.

Tipo Histológico	Prevalência (%)	Observação
Carcinoma urotelial	90%	Perda da polaridade celular, núcleos grandes, irregulares e hipercromáticos, com nucléolo proeminente.
Carcinoma escamoso	8%	Associado à infecção crônica pelo *Schistosoma haematobium.*
Adenocarcinomas	<2%	De Úraco e não-úraco, normalmente semelhantes aos adenocarcinomas intestinais.
Outros tipos	raros	Sarcomas, melanomas, carcinomas de pequenas células e tumores carcinóides.

Fonte: Elaborado pelo autor [53] .

O estadiamento do câncer de bexiga baseia-se no sistema TNM e é determinado pelo grau de invasão da parede vesical após RTU da lesão [55]. A Figura 2 **A** e **B** demonstram o estadiamento destas lesões.

TNM	Descrição
T	Tumor primário
T0	Ausência de tumor
Tis	Carcinoma *in situ*
Ta	Tumor papilífero não invasivo
T1	Tumor papilífero invasão lâmina própria
T2	Invasão muscular
T2a	Invasão superficial
T2b	Invasão profunda
T3	Invasão gordura perivesical
T3a	Invasão microscópica
T3b	Invasão macroscópica
T4	Invasão órgãos adjacentes
T4a	Invasão próstata, útero, vagina
T4b	Invasão da parede pélvica e/ou abdominal
N	Linfonodos regionais
N1	Linfonodo único ≤ 2 cm
N2	Linfonodo único entre 2 a 5 cm ou múltiplos ≤ 5 cm
N3	Linfonodos > 5 cm
M	Metástases a distância
M0	Ausência de metástases
M1	Mestásteses presentes

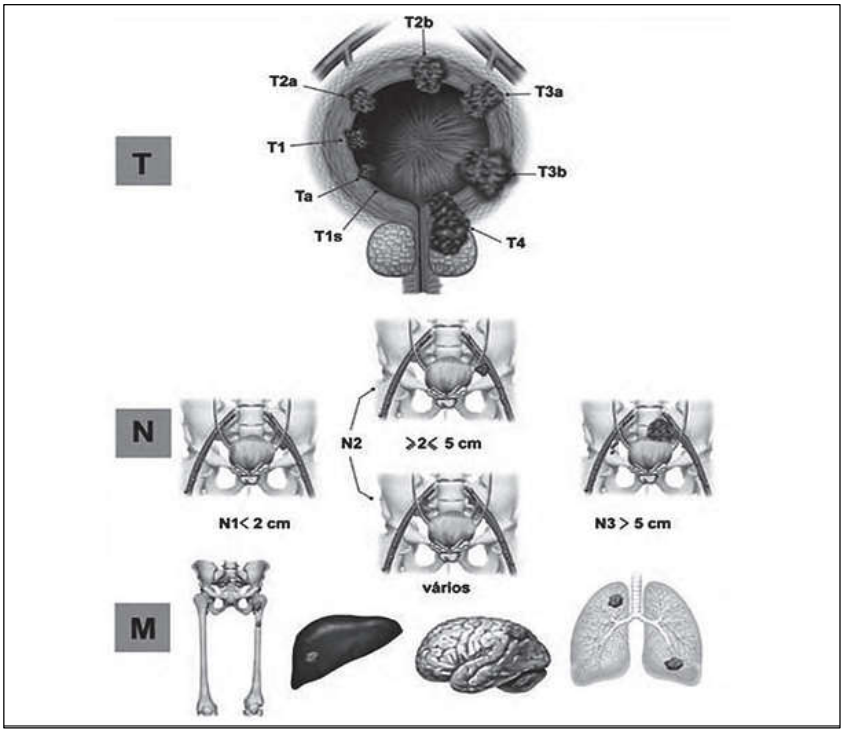


Figura 2 A e B: Classificação TNM [56].

A capacidade para predizer quais tumores vesicais invasivos apresentarão metástases à distância ou recidivas pélvicas está predominantemente relacionada ao estadiamento TNM. Historicamente, os principais fatores estudados são a profundidade da invasão da parede vesical, a graduação histológica, o carcinoma *in situ*, as variantes histológicas, multicentricidade e a invasão linfovascular [53].

A profundidade da invasão da parede vesical pelo tumor é reconhecida como o fator de prognóstico mais importante. Pacientes com tumores pT2N0 têm sobrevida global de 78% em cinco anos, estatisticamente superior a pacientes com tumores pT3N0 (58%) ou pT4N0 (47%) [53].

Idade avançada, *status* funcional prejudicado, carcinoma *in situ*, tumores de alto grau, diferenciação escamosa padrão de crescimento invasivo *versus* nodular/trabecular, hidronefrose, invasões perineural e vascular conferem piores prognósticos. Além do estadiamento TNM, a invasão vascular e a hidronefrose são fatores independentes em análises multivariadas [53].

O prognóstico também está claramente relacionado ao comprometimento linfonodal pélvico. Pacientes com linfonodos negativos após cistectomia radical têm risco de recidivas locais ou a distância de 30 a 40%, comparado aos 70 a 80% nos casos com linfonodos comprometidos. O grau de comprometimento linfonodal, assim como número de linfonodos retirados durante linfadenectomia pélvica, também são importantes. Em análises multivariadas, a extensão tumoral extracapsular e o envolvimento neoplásico em mais de cinco linfonodos são fatores adversos para sobrevida global. Outros estudos mostram que a retirada de menos de dez linfonodos pélvicos é fator de prognóstico adverso independente [53, 56].

1.1.3.1 DIAGNÓSTICO DO CÂNCER DE BEXIGA

O quadro clínico mais comum é a hematúria, presente em 80 a 90% dos casos. Normalmente indolor, macroscópica e intermitente, podendo ainda estar presente a polaciúria, a disúria, a noctúria e a urgência miccional. Uma vez descartadas outras patologias que levam a hematúria, como infecção urinária ou litíase, deve-se proceder à realização de exames complementares, como tomografias computadorizadas, citologia oncótica da urina, que embora útil, não muda a sobrevida [5, 53].

A pesquisa de células tumorais na urina, denominada citologia oncótica, é um exame simples, realizado a partir da coleta básica de urina, seguida de análise patológica rudimentar. Embora possua elevada especificidade, em torno de 94%, possui sensibilidade muito baixa, cerca de 35%, favorecendo um grande número de falso-negativos, principalmente em tumores de baixo grau [56].

O exame considerado padrão ouro para diagnóstico e acompanhamento do câncer de bexiga é a cistoscopia, que permite a avaliação da lesão, realização de biópsias e ressecções parciais ou totais. Assume geralmente sensibilidade e especificidade acima de 90%. Possui como o inconveniente o fato de ser um exame invasivo, que necessita de internação e anestesia, além do risco de infecções e lesões diretas, tais como: traumas uretrais, vesicais e até ureterais durante a ressecção uretral, que estão diretamente associadas ao método [5].

Os exames de imagem são reservados para avaliação loco-regional e à distância. O sítio mais comum de matástases à distância do câncer de bexiga é o pulmão [53, 56].

1.1.4 O CÂNCER DE RIM

Com o avanço tecnológico e a facilidade do acesso a exames de imagem, tais com ultrassonografia (US), tomografia computadorizada (TC) e rassonância nuclear magnética (RNM), houve um aumento significativo do número de tumores diagnosticados de forma incidental, os chamados incidentalomas renais. Esses tumores são massas renais descobertas durante a investigação de outras condições clínicas. A avaliação radiológica e a caracterização destas lesões são fundamentais para o manejo clínico destes pacientes [5, 57].

O tipo mais comum de câncer de rim é o carcinoma de células renais (CCR), correspondente a 90% dos casos. Segundo dados norte americanos, são diagnosticados cerca de 60 mil novos casos por ano e registrados 13 mil óbitos no mesmo período, representando uma proporção de 2:1 entre homens e mulheres, com pico de incidência entre 50 e 60 anos de idade [57].

Diversos fatores de riscos já foram analisados para possível associação com o câncer de rim. O que mostrou maior ligação com este câncer foi o tabagismo, sendo diretamente proporcional ao acúmulo de carga tabágica. Outros fatores como obesidade, exposição a cádmio, petróleo e asbesto também podem estar associados [50, 58].

Ainda não existe consenso em relação às medidas preventivas primárias, sabe-se apenas que a diminuição da exposição aos fatores de riscos pode reduzir as chances de câncer.

Os tumores renais tendem a apresentar crescimento e invasão tecidual local, podendo disseminar-se por via linfática ou hematogênica. Os linfonodos mais acometidos geralmente estão na região peri-hilar do rim, mas qualquer linfonodo retroperitoneal pode ficar comprometido. Preferencialmente, as metástases

hematogênicas se espalham para pulmões, ossos, pele, fígado e cérebro, em ordem decrescente, e, virtualmente, para qualquer outro sítio [57].

O estadiamento mais utilizado é do sistema TNM, definido pela *American Joint Committee on Cancer*, atualizado em 2009 [59]. A Tabela 3 demonstra a classificação para o câncer de rim.

Os maiores determinantes da sobrevida dos pacientes com câncer renal são extensão anatômica do tumor (estadiamento), subtipo histológico, características sarcomatóides, grau de anaplasia celular (grau de Furhman), estado clínico geral do paciente, sintomas locais, tempo de aparecimento de metástases (sincrônico ou metacrônico com a nefrectomia) e realização de nefrectomia prévia. Fatores secundários incluem ploidia nuclear, índices de proliferação do tumor e densidade microvascular [60-62].

Estádio	Descrição		
Tx	Falta informação quanto ao tumor primário		
T0	Sem evidências de tumor primário		
T1a	Tumor <4 cm limitado ao rim		
T1b	Tumor >4 cm e <7 cm limitado ao rim		
T2a	Tumor >7 cm e <10 cm limitado ao rim		
T2b	Tumor >10 cm limitado ao rim		
T3a	Tumor compromete gordura perirrenal, gordura do seio renal ou adrenal, sem ultrapassar a fáscia de Gerota		
T3b	Tumor estende-se para veia renal, seus ramos segmentares ou veia cava inferior abaixo do diafragma		
T3c	Tumor estende-se para veia cava inferior acima do diafragma ou invade a parede da veia cava inferior		
T4	Tumor estende-se para além da fáscia de Gerota		
Nx	Sem informações sobre linfonodos regionais		
N0	Ausência de metástases em linfonodos regionais		
N1	Metástase num único linfonodo regional		
N2	Metástases em mais de um linfonodo regional		
Mx	Sem informações sobre metástases a distância		
M0	Ausência de metástases a distância		
M1	Metástases a distância		
	Grupo de estádio		
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T1 ou T2	N1	M0
	T3	N0 ou N1	M0
IV	T4	qualquer N	M0
	Qualquer T	N2	M0
	Qualquer T	qualquer N	M1

Figura 3: Classificação TNM, 2009 [63].

1.1.4.1 DIAGNÓSTICO DO CÂNCER DE RIM

A maioria dos pacientes com câncer de rim é assintomática, onde somente 10% apresentam a tríade clássica e 30% a hematúria. Grande parte dos diagnósticos é feita por exames complementares.

Os exames complementares mais comumente utilizados são a velocidade de hemossedimentação (VHS), que costuma estar elevada em cerda de 75% dos casos, diminuição da fosfatase alcalina e anemia. Não existindo marcadores para o CCR [57].

O exame US é o método mais utilizado devido a sua facilidade de execução, baixo preço e acessibilidade. Embora de grande utilidade, a US não consegue fazer a avaliação de massas sólidas, bem como acometimentos secundários, tais como metástases, invasão vascular e linfonodal, sendo necessária a utilização de outros métodos de imagem [5].

A TC é o principal exame utilizado na avaliação de pacientes com CCR, consegue avaliar, além da lesão primária, as lesões por contiguidade, vasculares e à distância. A RNM normalmente está reservada para pacientes que não podem fazer uso de contraste iodado na ocasião da TC [57].

A biópsia renal é um método invasivo, onde ocorre a coleta de fragmentos de rim por agulha fina, guiado por US ou TC. Possui eficácia de até 80% [11]. Embora tenha uma boa taxa de sucesso diagnóstico, é um método que necessita de anestesia geral e possui complicações como sangramentos e possível perfurações órgãos adjacentes, além de haver descrição para implante em tecido gorduroso adjacente ao rim pós-biópsia, indicando implante secundário a este exame diagnóstico [64], demonstrando um risco de implante metastático iatrogênico.

1.2 A METABONÔMICA

A metabonômica é definida como uma “medida quantitativa da resposta metabólica dinâmica e multiparamétrica dos organismos vivos às modificações fisiopatológicas ou genéticas” [65]. Envolve a determinação do perfil dinâmico e tempo dependente, dos metabólitos dentro do organismo e como eles se alteram em decorrência de algum processo biológico [16].

O termo possui origem grega “meta” significando mudança e “nomos” regras ou leis, criado por Jeremy Nicholson, Elaine Holmes e John Lindon do *Imperial College of London* para descrever a geração de modelos quimiométricos, capaz de classificar as mudanças do metabolismo, ou seja, a detecção, identificação, quantificação e a classificação das mudanças metabólicas [66].

É muito freqüente encontrarmos na literatura os termos “metabonômica” e “metabolômica” como sinônimos. Entretanto, existem diferenças relacionadas à aplicação das estratégias procedimentais. No caso da “metabolômica” o pesquisador busca uma descrição analítica das amostras biológicas e tem por objetivo a identificação e quantificação dos metabólitos presentes no biofluido e que poderia estar associado a uma discriminação de grupos com estados metabólicos diferentes, como uma patologia específica [12, 13].

Já no caso da “metabonômica”, a identificação de todos os metabólitos não é o objetivo principal, mas sim a busca por perfil de metabólitos endógenos, associados a um estado metabólico específico [12].

Embora sutis, observa-se as diferenças de estratégias de cada método e consequentemente as diferenças analíticas. Na “metabolômica”, em função da necessidade de identificação de cada metabólito, frequentemente, utiliza-se uma técnica de separação de misturas, como a cromatografia em fase gasosa ou líquida,

associada a um sistema de detecção com alta sensibilidade, como a espectometria de massas. Já na “metabonômica” é mais freqüente o uso da espectometria de RNM, sem a separação prévia dos componentes da mistura [12].

O número de estudos científicos empregando esses métodos vem aumentando cada dia, pois eles têm mostrado enorme potencial na investigação do estado fisiológico, diagnóstico de doenças, descoberta de novos biomarcadores e identificação das vias metabólicas alteradas devido a doenças ou tratamentos [66, 67].

O gráfico 1 ilustra o que foi produzido a partir do banco de dados Scopus, podendo-se observar o crescimento anual de publicações com os termos “metabonomic” *OR* “metabonomics” *OR* “metabolomic” *OR* “metabolomics” desde janeiro de 1999, na base de dados do PubMed.

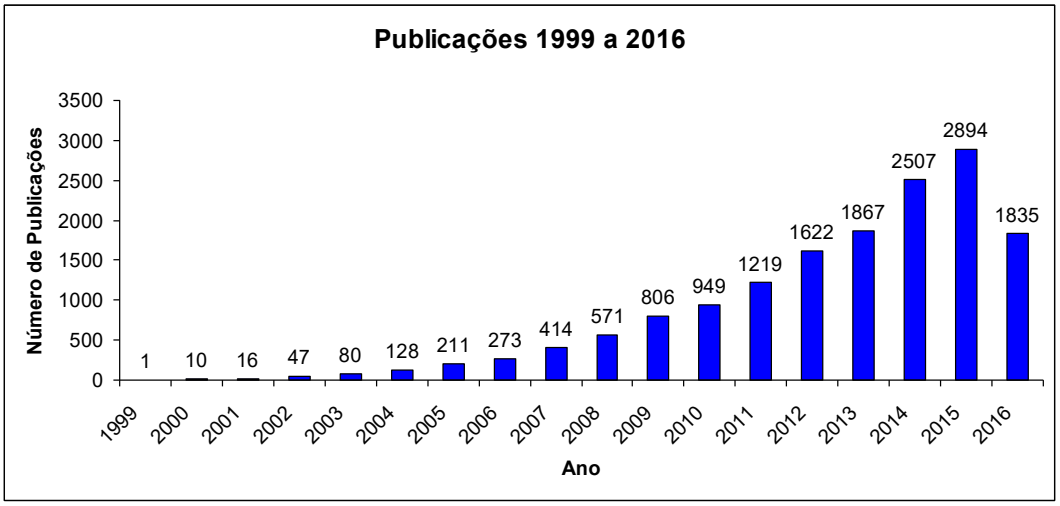


Gráfico 1: Número de publicações até junho de 2016. Fonte: Elaborado pelo autor.

A metabonômica fundamenta-se no princípio da homeostasia, ou seja, se um ser vivo é exposto a uma situação de estresse, doença ou a algum agente químico, o organismo responde na tentativa de neutralizar esta ação externa, havendo mudanças na concentração e no fluxo dos metabólitos endógenos, quebrando o

equilíbrio, desencadeando ajustes do ambiente extracelular, de forma a manter o meio interno estável. É essa alteração no perfil metabólico que pode ser avaliada pela espectroscopia de RNM [65, 68, 69], esperando a partir destes espectros identificar um determinado perfil para cada agressão específica.

Outros métodos podem ser empregados para estudar este perfil metabólico, como a espectometria de massa, a cromatografia gasosa acoplada a espectometria de massa, a cromatografia líquidade de alta performance ou a técnica de espectometria óptica, mas a RNM e a espectometria de massa são as melhores técnicas devido à produção rápida e adequada dos conjuntos metabólicos [15].

Na área da saúde quando se fala em RNM, vem à tona a Ressonância Nuclear Magnética de Imagem (RMI), que é um método diagnóstico capaz de gerar imagens pela medida das moléculas de água, permitindo distinguir tecidos moles com nitidez e sem usar radiação ionizante. Recentemente a utilização da espectroscopia de Ressonância Nuclear Magnética (RMS) vem aumentando, principalmente com a associação deste método aos scanners convencionais de RMI. A RMS fornece informações sobre a estrutura química e consequentemente dos metabólitos teciduais além das imagens [70-72].

Nas técnicas associadas, mais frequentemente observada em RNM de crânio, utilizam-se campos magnéticos da ordem de 1,5 T de baixa resolução, no caso da estratégia metabonômica convencional utilizam-se campos magnéticos da ordem de 7 T, resultando em espectros de melhor resolução e, consequentemente, a identificação e quantificação relativa aos diferentes metabólitos.

A espectometria de RNM é muitas vezes preferida em relação às outras ferramentas, por ser rápida e requerer pouco ou nenhum pré-tratamento, além de dispensar o uso de amostras padrões para co-injeção e identificação de compostos.

Embora existam outros isótopos, como o ^{13}C, ^{31}P e ^{15}N, a abundância natural do isótopo de hidrogênio-1 (99,98%) e sua ocorrência no organismo fazem com que a RNH de ^{1}H seja escolhida para gerar o perfil de biomateriais. Esta técnica fundamenta-se na interação dos núcleos atômicos com a radiação eletromagnética, quando estes estão sujeitos a um campo magnético. Os núcleos atômicos possuem um *spin,* que faz com que os núcleos se comportem como barras magnéticas muito pequenas. Na presença de um campo magnético, alinham-se a favor ou contra este campo, originando diferentes estados de energia. Quando se irradia a amostra com a correta radiofreqüência, provoca-se a excitação dos *spins* que absorvem esta energia, posteriormente, liberando-as e fornecendo o espectro de RNM, sendo este representado graficamente pela intensidade destas absorções *versus* às freqüências absorvidas [17].

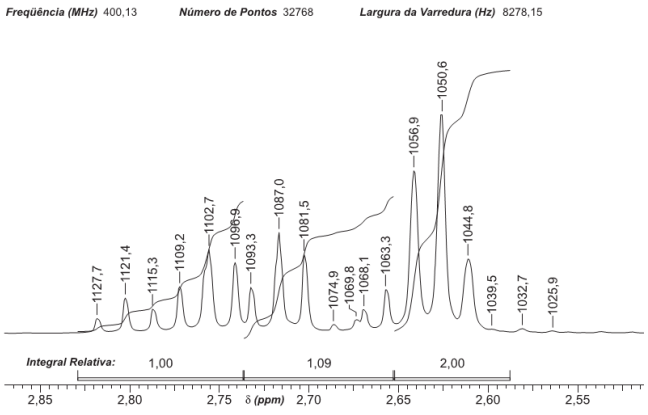
O espectro de RNM pode detectar vários componentes em uma única medida e nele cada metabólito pode gerar um ou mais sinais (picos). A intensidade do sinal está relacionada à quantidade de *spins* e corresponde a concentração de determinado metabólito, refletindo alterações bioquímicas fisiológicas ou patológicas. Apesar da espectroscopia de RNM de ^{1}H ter seu papel inicial na elucidação das estruturas químicas, a técnica tem alcançado imenso e crescente valor em caracterizar as consequências de doenças e toxicidade por drogas ou modificações genéticas.

A princípio, todos os núcleos de um mesmo isótopo deveriam apresentar a mesma freqüência de ressonância, mas o ambiente químico em que este está inserido provoca uma discreta alteração chamada de deslocamento químico (δ). Na prática, o δ é expresso em partes por milhão (ppm), ou seja, considerando que a frequência do núcleo é de origem em mega-hertz (MHz) e a alteração provocada

pelo ambiente é da ordem de Hertz (Hz), o espectro é representado em uma dimensão que tem δ e na outra a intensidade dos sinais. O que significa que a mesma substância apresenta sinais diferentes no espectro de RNM de ^{1}H, fornecendo dados acerca da estrutura química das espécies [71].

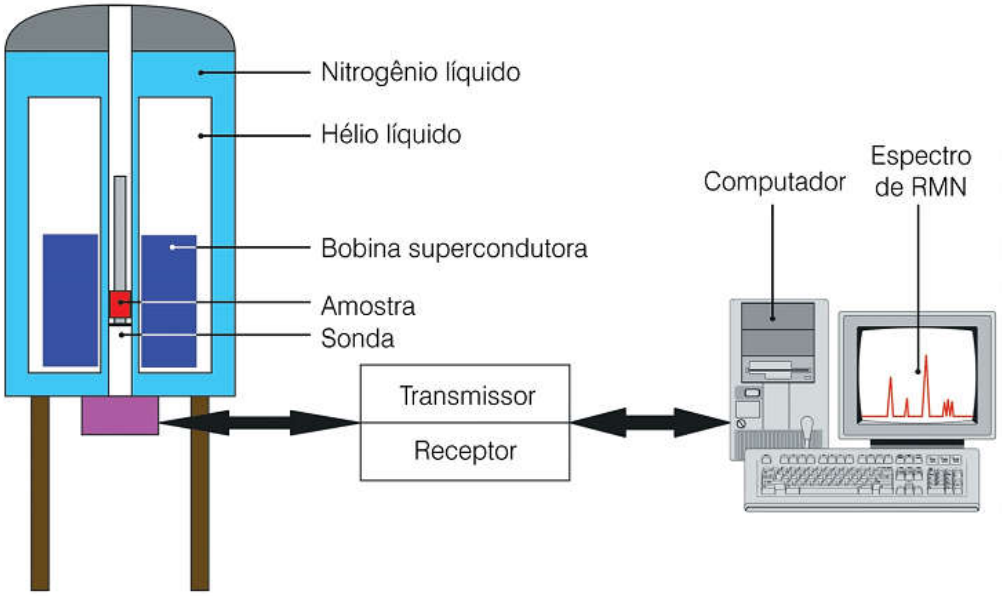
Para exemplificar a Figura 3 é uma representação gráfica das regiões espectrais, onde os metabólitos podem ser identificados. A Figura 4 representa um esquema para a obtenção deste espectro.

Figura 4: Simulação de espectro de RNM.



Fonte: Constantino et. al (2006) [73].

Figura 5: Representação esquemática de obtenção dos espectros.



Fonte: Colgano et al. (2002) [74].

Os materiais biológicos, normalmente utilizados neste tipo de estudo são os fluidos, a maioria obtida de forma não invasiva, tais como pela urina. Contudo, uma grande variedade de fluidos podem ser utilizadas, como líquido cefalo-raquidiano (LCR), seminal, sinovial, amniótico, biliar, aspirados pulmonares, sobrenadantes e até tecidos obtidos por procedimentos invasivos ou não [66].

A urina e o plasma são amostras de fácil obtenção e proporcionam uma “visão” do organismo de forma homogênea e em sua totalidade, onde podem ser identificados marcadores de doenças tanto para diagnóstico como para acompanhamento. O plasma fornece informações sobre dados e substâncias que ainda estão ativas no organismo enquanto que na urina pode-se identificar o que está sendo eliminado [75-77].

Entretanto, a análise urinária contém uma grande vantagem em relação ao plasma, pois como a coleta da amostra não é invasiva, permite a reavaliação repetida sem transtorno para o paciente, o que é interessante tanto em doenças agudas como no acompanhamento de doenças crônicas.

Uma preocupação importante, principalmente quando se utiliza urina como biofluido, é a variação do pH, que pode variar em situação de estresse ou estocagem [15, 67, 78]. Portanto, como o δ é função do pH do meio, se faz necessário a utilização de uma solução-tampão de fosfatos para uniformizar o pH, assegurando a comparabilidade dos dados espectrais entre os diferentes estudos metabonômicos.

Lauridsen et al. (2007) descrevem detalhadamente a técnica de estocagem e utilização da urina em estratégias metabonômicas, mantendo certos procedimentos metodológicos como, por exemplo, a estocagem de urina a -25ºC por até 26 semanas, a adição de uma solução tampão de fosfato para concentração de 0,3M e a utilização de solução de preservação, com azida de sódio, caso seja necessária a estocagem temporária de amostras até 4ºC com o intuito de padronizar a prática da metabonômica, que é corroborado por outros autores [15, 65, 71, 78].

Durante o processo de aquisição dos espectros deve ser observado que os biofluidos possuem grande quantidade de água, ocasionando um intenso sinal no espectro da RNM, o que dificulta a visualização de alguns sinais associados às moléculas dos metabólitos. Assim sendo, os espectros de RNM de ^{1}H da urina são medidos utilizando-se de uma sequência de pulsos para supressão do sinal da água, sendo mais comum a utilização de pulsos de radiofreqüência (RF) [15].

Uma vez suprimido o sinal da água, um grande número de metabólitos serão detectados, ocorrendo uma sobreposição de sinais devido á estreita faixa para

deslocamento químico, aproximadamente 10 a 12 ppm, especialmente em espectômetros de campo magnético médio (4,7T a 9,45T, com freqüências de 200 a 400 MHz). Os aparelhos de amplo espectro, por exemplo, com 18,8T e frequência de 800MHz, apresentarão um maior sinal de dispersão e contribuirão para o aumento da complexidade do espectro e sua sensibilidade [15].

Um fator limitante para a informação gerada é a complexidade, havendo centenas de variáveis que dificilmente poderiam ser processadas manualmente, necessitando de uma estratégia estatística avançada. A estratégia aplicada a dados químicos numéricos, ou quimiometria, para reduzir e redimensionar o conjunto de dados é a estatística multivariada. Esta técnica pode ser supervisionada ou não supervisionada. O método não supervisionado é utilizado para estabelecer se existe algum grupamento dentro no conjunto de dados, mapeiam as amostras de acordo com suas propriedades sem o conhecimento das classes das amostras, já as técnicas supervisionadas utiliza informações de classes para treinar um grupo de amostras de dados, otimizando a separação entre duas ou mais classes[79].

O método não supervisionado, também chamada de técnica de reconhecimento de padrão, possui como método mais frequente a análise dos componentes principais (PCA), onde a matriz dos dados originais é projetada em um subespaço definido por combinações lineares com máxima variância. Assim, o primeiro componente principal (PC1) é o eixo que descreve o máximo possível de variância no espaço multidimensional original e a segunda é o componente ortogonal, que estatisticamente não está relacionada com o PC1 e descreve o máximo de variância ainda não descrito pela PC1. AS duas ou três primeiras PCs fornecem as melhores representações possíveis em termos de bioquímica [13, 80].

Já as técnicas supervisionadas mais comuns são a análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) e sua variante ortogonal (OPLS-DA), análise discriminante linear (LDA), análise de classificação simples (SIMCA – "*soft independent modelling of class analogy"*), entre outras que permitem analisar os espectros de forma mais simples rápida e reprodutível [17, 80, 81].

Cada biofluido possui uma característica própria, composição bioquímica única, que se altera em resposta a estímulos fisiológicos ou patológicos, promovendo uma "impressão digital" metabólica, a qual é específica da natureza ou sítio de agressão [65].

A melhor maneira de obter as principais informações metabonômicas é pela combinação de espectroscopia de RNM com métodos estatísticos multivariados e métodos quimiométricos, permitindo identificar mudanças no perfil metabólico dos biofluidos endógenos.

Embora existam outros métodos para produzir e analisar o perfil metabólico de cada biomaterial, tais como a espectometria de massa (MS), a cromatografia gasosa acoplada a espectometria de massas (GC/MS), a cromatografia líquida de alta performance (HPLC) ou técnicas de espectometria óptica, a RNM e a MS são as melhores técnicas uma vez que podem produzir um conjunto de dados metabonômicos de forma rápida e adequada [17].

A construção de um modelo quimiométrico deste perfil é realizada através de *softwares* que analisam os espectros dos biofluidos com determinadas enfermidades, na expectativa de encontrar um padrão.

Uma grande preocupação em relação ao uso clínico da metabonômica é a possível variação inerente a cada paciente, principalmente quando comparadas a modelos animais, onde o controle é muito mais rigoroso. Apesar da grande variação

existente na população humana, o emprego de análises matemáticas multivariadas consegue obter uma resposta adequada retirando os fatores individuais inerentes [17, 71, 82-84].

1.2.1 APLICAÇÕES CLÍNICAS

Nos últimos anos, vem crescendo o número de trabalhos em pesquisas clínicas, enfocando o uso da metabonômica, utilizando amostras de urina ou soro.

Recentemente algumas publicações vem mostrando importante contribuição em doenças cardiovasculares, neurológicas, infecciosas e como marcadores urológicos. Além da medicina clínica, já existem publicações de sua aplicabilidade na medicina forense [85-91].

Le Moyec (2002) demonstrou por meio da metodologia metabonômica que a toxicidade dos aminoglicosídeos e dos glicopeptídeos não está limitada à toxicidade tubular proximal, mas também envolve a região medular no néfron [92].

No mesmo ano, Brindle et al. demonstraram a gravidade da doença arterial coronariana em amostras de soro, com acurácia de 90%, quando comparada a arteriografia [83]. Em 2006 este estudo foi contestado por Kirschenlohr demonstrando que este seria um marcador fraco, evidenciou-se assim a possibilidade de aplicação da espectrometria de RNM de ^{1}H nas diversas áreas clínicas [93].

O uso do perfil metabólico em áreas como, por exemplo, a investigação forense, levou a elucidação de fatos legais para identificar um suspeito por meio de sua “Impressão digital metabólica” [90].

Biomarcadores oncológicos tem sido estudados por diversos grupos na tentativa de diagnosticar gliomas, glioblastomas, linfomas, melanomas, câncer de cólon e reto, câncer de mama entre outros [84, 89, 94-100].

Na urologia o método metabonômico tem sido utilizado em várias subáreas. Chen et al. (2015) publicaram um estudo com a investigação de infertilidade por via

metabonômica [101] assim como Aaroson et al. (2010) que investigou o perfil metabólico de homens azoospérmicos [102].

Especificamente nos casos de tumores urológicos, Bivalacqua em 2011 publicou uma revisão sobre o uso da metabonômica na onco-urologia, onde descreve o uso deste método em investigação infantil, mas afirma que para outros tipos de tumores esse método ainda é controverso [103].

Em 1992, Narayan já demonstrava o potencial da espectometria de RNM de ^{1}H na investigação de doenças prostáticas [104], corroborado com Ferro et al. e Tosoian et al., ambos de 2016, que concordam com o fato de que o PSA é um marcador que possui muitas falhas tanto no diagnóstico quanto no acompanhamento do câncer de próstata, e que novos métodos diagnósticos devem estar em contínua investigação [105, 106]. Alguns autores também defendem este método para além do diagnóstico, como um marcador de acompanhamento [107, 108].

Para o câncer de bexiga, diversos estudos [108-113] tem sido conduzidos na tentativa de descobrir um marcador de diagnóstico e de acompanhamento para esta neoplasia.

Uma busca na plataforma *PubMed*, até o mês de junho deste ano, revela que foram indexados 106 trabalhos sobre estes biomarcadores, alguns são relativos a genética e outros a epigenética [110-112]. Alguns autores utilizam a metodologia metabonômica, tais como Wittmann et al, que publicou uma coorte com aproximadamente 25 voluntários em 2014 [113]. Cheng et al em 2015 identificou possíveis 14 metabólitos envolvidos no câncer de bexiga [109]. Em 2016, Hong publicou um editorial referindo os avanços em relação à busca de marcadores, mas nenhum eficiente, indicando que as pesquisas devem continuar [114].

Para a investigação de doenças renais alguns autores já utilizaram a metodologia metabonômica para avaliar a má perfusão, lesões agudas neonatais e alterações teciduais [115-118]. Com relação às neoplasias malignas, Weiss, Kim e Zira et al. em 2011 revelavam a importância do método para a investigação de doenças renais, inclusive neoplasias [91, 119]. Kim et al. e Catchpole et al., ambos em 2011 identificaram possíveis marcadores biológicos para o CCR, mas não definiram algum em definitivo [120, 121]. Em 2014, Ngo et al., publicou um artigo onde defendia a investigação de marcadores para o CCR uma vez que teria baixo custo e serviriam, além do diagnóstico, para o acompanhamento de neoplasias metastásicas e para pacientes de alto risco [122].

1.3 JUSTIFICATIVA PARA A INVESTIGAÇÃO

As neoplasias urológicas encontram-se entre as mais prevalentes no ser humano, muitas ainda não possuem marcadores para diagnóstico ou acompanhamento. A identificação de marcadores adquiridos de forma não invasiva ainda é um desafio.

Somado a isso, um método em que com uma única coleta possa ser identificada mais de uma neoplasia ainda não foi descrito.

A metabonômica parece ser uma estratégia clinicamente viável, principalmente por ser um método sensível na identificação de metabólitos endógenos, em amostras coletadas de forma pouco (plasma/soro) ou não invasiva (urina/sêmen).

Especificamente para este estudo, as amostras de urina foram escolhidas por serem de fácil aquisição. O estudo piloto constitui-se de 20% da amostra principal e é útil, neste caso, para indicar o potencial de detecção de câncer de próstata, bexiga ou rim a partir da metabonômica.

A caracterização de um método diagnóstico e descoberta de um biomarcador oncológico para estes cânceres irão consolidar sua aplicação clínica.

A viabilidade econômica, embora ainda difícil na prática clínica atual, é bastante promissora, uma vez que os novos aparelhos de RNM estão vindo acoplados de módulos de RMS, mostrando que possivelmente no futuro poderão ser adquiridos espectros de boa qualidade durante exames de imagens convencionais sem a necessidade de grande acréscimo financeiro.

No momento o exame de RNM de crânio acoplado com espectometria é realizado para investigação neurológica e possui custo estimado de R$ 268,75, conforme a tabela do Sistema único de Saúde (SUS) [123] e já consta no rol de

procedimentos da Agência Nacional de Saúde Suplementar (ANS) [124]. Estima-se que na área da urologia, uma vez que aplicado este método (RNM), o valor não seja muito diferente.

Neste sentido, esta pesquisa aborda o uso método de diagnóstico de neoplasias urológicas pela estratégia metabonômica em amostras de urina de pacientes com câncer de próstata, bexiga e rim, a partir de estudo piloto.

Não obstante, este estudo limita-se a investigação da viabilidade clínica da estratégia metabonômica e, não propriamente, da identificação de um biomarcador.

Em tempo, espera-se no futuro, poder elucidar o uso de biomarcadores oncológicos pela estratégia metabonômica por RNM como uma ferramenta útil para o diagnóstico e rastreamento de tipos diferentes de câncer.

2. OBJETIVO

Avaliar o método de diagnóstico de neoplasias urológicas pela estratégia metabonômica em amostras de urina de pacientes com câncer de próstata, bexiga e rim.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 SUBMISSÃO AO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP).

O presente estudo foi submetido ao CEP do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC/UFPE) e aprovado (Protocolo No.: 33003214.3.0000.5208). Todos os participantes da pesquisa assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo I).

3.2 SELEÇÃO DE VOLUNTÁRIOS

Os participantes da pesquisa foram selecionados do ambulatório de urologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC/UFPE).

A partir do recrutamento, os participantes formaram um grupo controle (sem neoplasia), um grupo com portadores de câncer de próstata (CP), um com portadores de câncer de rim (CR) e outro com portadores de câncer de bexiga (CB). Todos os voluntários, à exceção do grupo controle, deveriam ser portadores de neoplasia única, sem tratamento inicial e não ter outro câncer ativo.

Para estabelecimento do número de participantes deste estudo, considerando a margem de erro aceitável (5%), o nível de confiança (95%), a acurácia e a precisão esperada para determinação dos resultados tidos como verdadeiros para investigação por via metabonômica, com base em estudo anterior de Godoy *et al* em 2010 cuja proporção esperada para positividade foi de 94%, a amostra deste estudo deverá corresponder a 60 pacientes, sendo 30 no grupo experimental e 30 no controle [125]. O cálculo foi baseado em uma distribuição normal, conforme fórmula abaixo descrita.

$$N=Z*Z(P(1-P))/(D*D)$$

Onde: P refere-se a proporção Esperada; D, a Semi-amplitude do Intervalo de Confiança (IC); e, Z é igual a 1,96, considerando o IC de 95%.

O número de voluntários, por ser um estudo em fase de piloto, foi estabelecido como uma fração de 20% do número total de participantes. Neste caso, o número de participantes neste piloto seria no mínimo de 12 participantes.

Para o controle foram selecionados pacientes do ambulatório de prevenção urológica que não possuíam nenhuma doença urológica ou câncer de qualquer sistema orgânico.

Os voluntários com câncer de próstata foram todos diagnosticados com esta neoplasia por meio de biópsia prostática transretal e que não havia iniciado nenhum tratamento.

Os voluntários com câncer de bexiga, foram aqueles com diagnóstico desta neoplasia realizado por cistoscopia e biópsia e que não haviam sidos submetidos à imunoterapia com Bacilo de Calmette-Guérin (onco BCG), ou mitomicina C, bem como qualquer outro tratamento intra-vesical.

E os voluntários com câncer de rim foram aqueles que tiveram a confirmação do diagnóstico de CCR por meio de exame anatomopatológico em pós-operatório.

Todos aqueles que possuíam neoplasias concomitantes ou que o exame anatomopatológico não revelou a neoplasia maligna foram excluídos. No grupo de pacientes com câncer renal, os participantes com diagnóstico de carcinoma urotelial também foram excluídos, devido à semelhança deste tipo histológico com o câncer de bexiga e não com o CCR.

Os voluntários forneceram 3ml de urina para análise que foi enviada para o Departamento de Química Fundamental (DQF) da Universidade Federal de Pernambuco, para serem submetidas à RNM de ^{1}H.

3.3 ESPECTOMETRIA DE RNM ^{1}H

O material após acondicionamento em freezer foi encaminhado ao Laboratório da Central Analítica do Departamento de Química Fundamental para serem submetidos á análise.

Às amostras foram adicionadas 200µL solução-tampão de fosfatos (fosfato monobásico de sódio + fosfato dibásico de sódio - Na_2HPO_4 / NaH_2PO_4 – 0,2 mol L^{-1}) para eliminar o efeito do pH urinário a cada 400 µL de urina *in* natura. Após a homogeinização, a solução foi transferida para o tubo de RNM de ^{1}H de 5mm de diâmetro interno e introduzida no espectômetro *Varian Unit Plus (Varian NMR)* operando a 300MHz, realizando uma sequência de pulsos com pré-saturação para supressão do sinal da água na aquisição do espectro. O tempo para o processamento da análise é de aproximadamente 4 minutos.

Uma vez obtidos os sinais originados pelo espectômetro, procedeu-se o processamento, pela transformação de Fourier, seguido da calibração da escala, utilizando um padrão de referência interna, correção da linha de base do espectro.

Os seguintes parâmetros foram empregados: janela espectral igual a 5 KHz, tempo de aquisição igual a 6,4s, pulso de 90°, *delay* de saturação igual a 3,0s e 32 repetições. Todos os espectros foram processados utilizando *line boardening* igual a 0,3Hz e o sinal de 3,06 ppm, atribuído ao grupo metil da creatinina, foi utilizado como referência o deslocamento químico. As distorções da linha de base e fase foram corrigidas manualmente.

Os espectros de RNM ^{1}H (δ 0,0 – 10,0 ppm) foram automaticamente reduzidos a 154 regiões de igual comprimento (δ 0,05 ppm), excluindo a região entre δ 4.2 e 6.4 ppm, para eliminar os sinais da água e uréia. Transformando os gráficos (espectro) em dados numéricos construímos uma matriz onde as linhas refletem as

amostras e as colunas as variáveis [12, 18, 126]. Além disso, o espectro foi normalizado em função da intensidade de cada região, utilizando o *VNMR6.1 software* (Varian, Inc.).

Com a matriz de dados processada, foram realizados tratamentos estatísticos multivariados (PCA, PLS-DA, OPLS-DA e LDA), utilizando o *software* Statistica 8.0 e a já referenciada plataforma on-line *MetaboAnalyst*, construindo assim, os modelos metabonômicos [127].

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados espectrais depois de reunidos em uma matriz cotendo *n* linhas, onde *n* é o número de casos, e 155 colunas (variáveis), sendo 154 regiões espectrais (BINS) e uma variável de classe (positivo ou negativo para a doença). Os dados foram normalizados na linha usando a expressão $\frac{x = (x_i - \bar{x})}{s}$, onde x_i é a área de integração da variável i (deslocamento químico δ_i), $\bar{x}$ é a média das áreas de integração de cada variável para aquela amostra, e *s* é o desvio padrão observado. Esta matriz foi utilizada como entrada para a análise de componentes principais (PCA), resultando em *n-1* PC's. Nenhum agrupamento natural foi observado. Portanto, foram utilizados métodos supervisionados: PLS-DA, OPLS-DA e LDA.

Para as PLS-DA e OPLS-DA foram aplicadas na matriz de dados original após pré-processamento: normalização pela soma e auto-escalonamento. Para investigar os metabólitos associados à discriminação entre os grupos foi utilizado o escore de importância de variáveis para projeção (VIP), como ponto de corte >1.

A seleção de variáveis para a construção do modelo usando LDA teve início separando-se os dados espectrais em função do seu *status* fisiopatológico, determinada doença ou controle, sendo obtido o espectro médio de cada grupo. Esses espectros foram subtraídos evidenciando os δ mais importantes para a discriminação entre os grupos. Uma vez separados, os δ foram utilizados como dados de entrada para a LDA, sendo selecionadas 10 variáveis por Lambda de Wilks, para construir o modelo metabonômico. O modelo foi validado por validação cruzada total e posteriormente tratados estatisticamente pelo *Software* Statistica e a plataforma on-line *MetaboAnalyst.*

Uma vez realizadas as inferências, foram criados modelos metabonômicos onde são calculados sensibilidade, especificidade, e valores preditivos positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN).

4. RESULTADOS

Foram selecionados 26 voluntários do ambulatório de Urologia do HC/ UFPE, distribuídos em grupo Controle (07), voluntários saudáveis; Câncer de Próstata (CP) com 09 voluntários; Câncer de Bexiga (CB) com 05 voluntários e Câncer de Rim (CR) com 05 voluntários.

O grupo controle composto por homens entre 60 e 67 anos, sem neoplasia oncológica ativa; CP com homens entre 61 e 69 anos, com diagnóstico de câncer de próstata e sem nenhum tratamento iniciado; CB com 02 homens com idade entre 70 e 76 anos e 3 mulheres com idades entre 57 e 75 anos; e, CR com um homem e idade de 35 anos e 4 mulheres com idades entre 54 e 64 anos.

Grupos	Nº. de Voluntários	Faixa Etária	Proporção de Homens:Mulheres
Controle	7	60-67	7:0
CP	8	61-69	9:0
CB	5	57-76	2:3
CR	5	35-64	1:4

Tabela 2. Resumo do número de voluntários e idades por grupo.

As amostras foram submetidas ao tratamento conforme o protocolo do laboratório central do DQF/UFPE para submissão à RNM de ^{1}H e posterior aquisição dos espectros para depois construção de modelos metabonômicos. Em todos os casos não houve uma separação dos espectros na análise exploratória (PCA), sendo então submetidos a métodos supervisionados PLS-DA, OPLS-DA e LDA.

Houve separação entre os grupos de CB e CR, porém discreta devido ao pequeno número da amostra, não sendo possível criação de modelo metabonômico para cada grupo, tratando os dois grupos em conjunto. Neste caso, as amostras dos grupos CB e CR foram agrupadas para análise como se fosse um único grupo, criando assim uma matriz para análise e comparação ao grupo controle. A separação no grupo CP permitiu a criação de um modelo específico, apesar de não possuir o número amostral ideal.

Para os grupos CB e CR associados, foram utilizadas 17 amostras de urina, sendo: 7 saudáveis, 5 voluntários diagnosticados com câncer de bexiga e 5 diagnosticados com câncer de rim.

Os arranjos utilizados para a construção dos modelos estatísticos foram: PCA, PLS-DA, OPLS-DA e LDA, usando o pré-processamento e normalização pela soma.

Resultados semelhantes foram obtidos usando o modelo PLS-DA

Abaixo são apresentados os resultados do modelo OPLS-DA e LDA, separadamente.

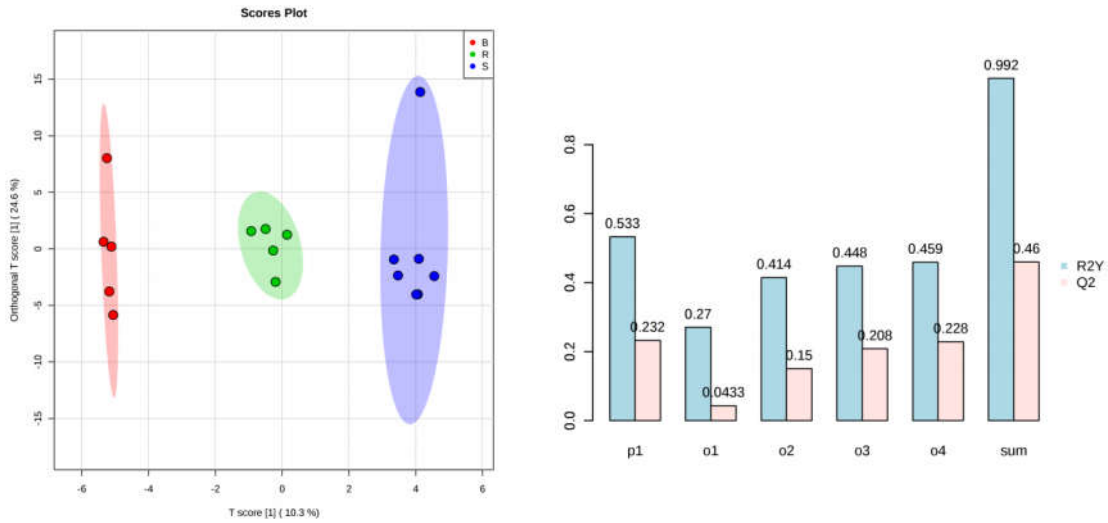


Figura 6. *Scores plot*: À esquerda, gráfico de escores OPLS-DA e, à direita, Gráfico com os valores de R2Y (variação entre os grupos) e Q2 (capacidade preditiva) obtidos para o modelo OPLS-DA.

A Figura 6 discrimina os grupos estudados sem área de confundimento, os valores de R2Y (99,2%) e Q2 (46,0%), indicam a variância explicada pelo modelo e o poder de predição, respectivamente.

Com o intuito de obter um modelo alternativo quanto à classificação das amostras estudadas, foi construído um modelo estatístico baseado no LDA. Os resultados indicam que modelo metabonômico construído obteve VPP de 100%, VPN de 85,7%, especificidade de 100% e sensibilidade de 90,9%. Estes resultados são mostrados na Figura 7 e Tabela 3.

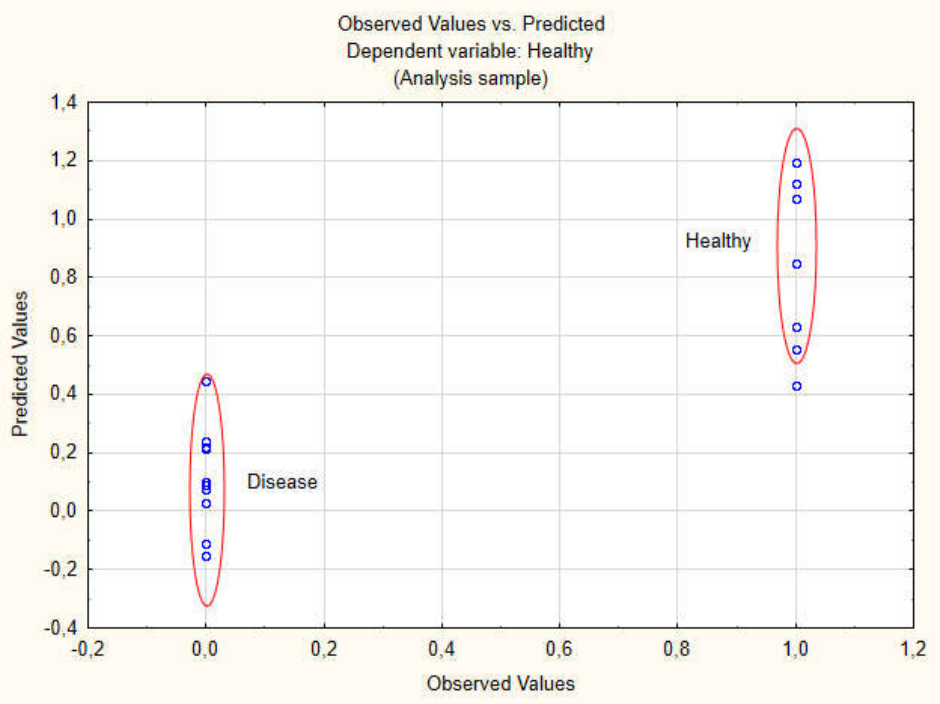


Figura 7. *Scores plot2*: Gráfico dos escores obtidos na função discriminante (LDA) pelas amostras fornecidas por voluntários saudáveis do grupo controle (healthy) e pacientes diagnosticados com câncer de bexiga ou rim (disease).

A Tabela 3 mostra os valores preditivos, positivo e negativo, para as amostras em conjunto após a análise de variação cruzada, mostrando uma clara separação entre o grupo controle e o grupo CB/CR agrupados.

Matriz de Classificação - LDA			
Classe	Percentual correto	Controle P = 0,4118	CB/CR P = 0,5882
Controle	100%	7	0
CB/CR	100%	0	10
Total	100%	7	10
LDA com LOOCV (***Com 5 variáveis***)			
	Controle	CB/CR	
Controle	6	1	85,7%
CB/CR	0	10	100%
TOTAL	6	11	94,1%

Tabela 3. Matriz de Classificação e Validação cruzada (LOOCV) obtidos pela LDA. Controle VS CB/CR.

Quanto aos resultados de comparação do grupo controle com o grupo com CP, foram utilizadas 15 amostras de urina, sendo 7 saudáveis e 8 voluntários diagnosticados com câncer de próstata. Da mesma forma que na análise anterior, foram utilizados para a construção dos modelos estatísticos os seguintes arranjos: PCA, PLS-DA, OPLS-DA e LDA, usando o pré-processamento e normalização pela soma.

A Figura 8 discrimina os grupos estudados sem área de confundimento, os valores de R2Y (91,4%) e Q2 (15,8%). Os resultados encontrados a partir do LDA indicam que modelo metabonômico construído classificou corretamente todas as amostras, em virtude disso, os valores de VPP, VPN, especificidade e sensibilidade foram iguais a 100%. Estes resultados são mostrados na Figura 9 e Tabela 4.

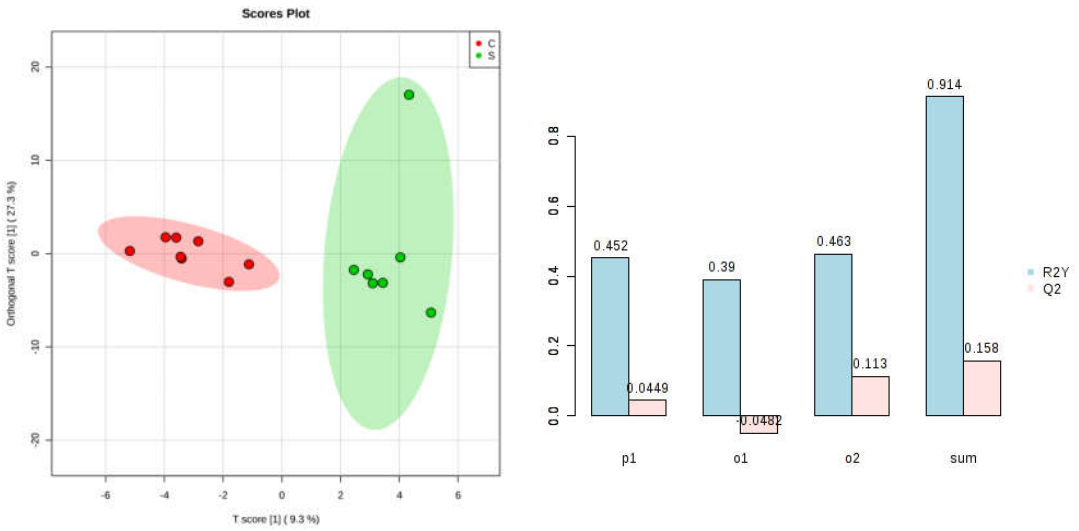


Figura 8. À esquerda, gráfico de escores OPLS-DA e, à direita, Gráfico com os valores de R2Y e Q2 obtidos para o modelo OPLS-DA.

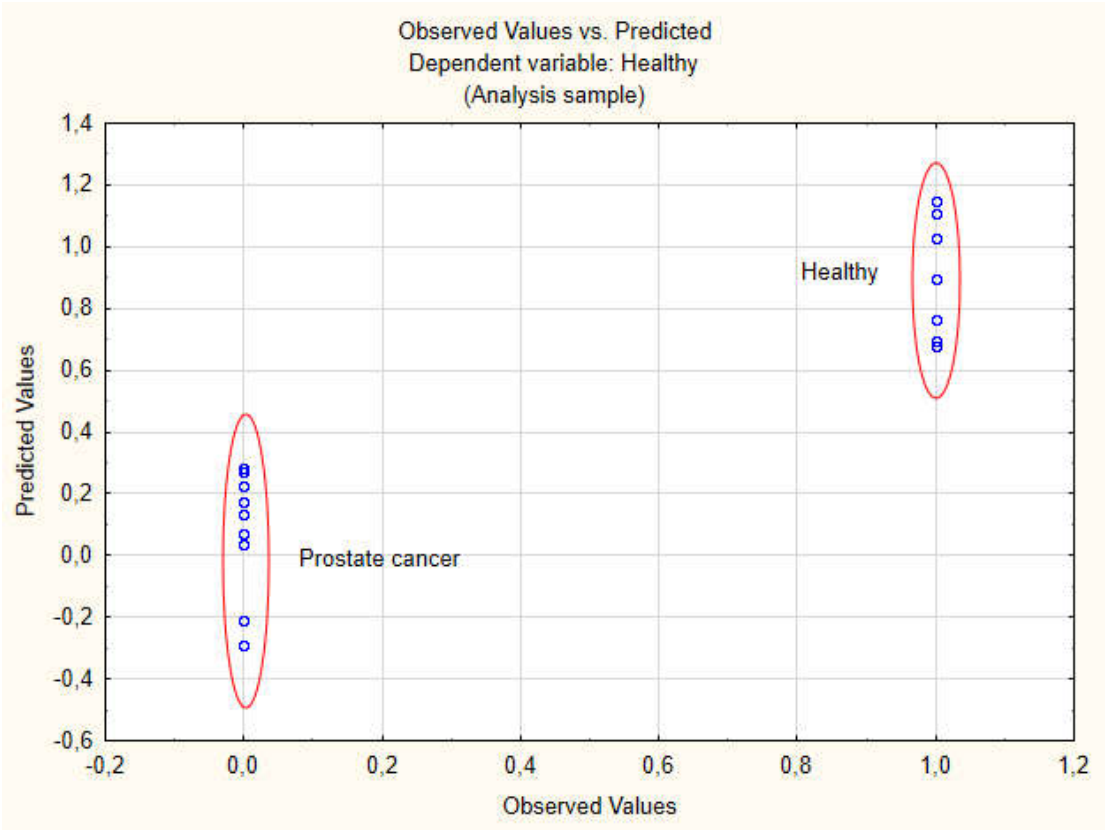


Figura 9. Gráfico dos escores obtidos na função discriminante (LDA) pelas amostras fornecidas por voluntários saudáveis (healthy) e pacientes diagnosticados com câncer de próstata (Prostate cancer).

Matriz de Classificação - LDA			
Classe	Percentual correto	Controle P = 0,4375	CP P = 0,5625
Controle	100%	7	0
CP	100%	0	8
Total	100%	7	8
LDA com LOOCV (***Com 4 variáveis***)			
	Controle	CP	
Controle	7	0	100%
CP	0	8	100%
TOTAL	7	8	100%

Tabela 4. Matriz de Classificação e Validação cruzada (LOOCV) obtidos pela LDA. Controle VS CP.

Neste caso, a comparação do grupo controle com a CP foi excelente, demonstrando uma sensibilidade, especificidade e VPP e VPN de 100% (Tabela 4).

5. DISCUSSÃO

Os espectros de RNM de biofluidos podem ser avaliados de forma quantitativa, em relação à forma física do espectro e qualitativa, em relação à estrutura química das substâncias que compõe o espectro.

Considerando a avaliação qualitativa, observa-se que o objetivo deixou de ser a quantificação de determinada substância e passou a ser a análise das mudanças de perfil dos metabólitos endógenos, produzindo um padrão sobre uma determinada alteração, que pode ter significado diagnóstico ou classificatório.

A ascensão da metodologia metabonômica tem a vantagem de ser não-invasiva e de fornecer uma “impressão digital” do estado metabólico de cada pessoa a partir de uma pequena amostra de um biofluido, por exemplo, de urina [13, 15]. Por isso, este método tem sido utilizado na tentativa de diagnosticar diversas patologias oncológicas [82, 84, 119].

Diversas metodologias não-invasivos e seguras, com boa acurácia tem sido estudadas, incluindo a via metabonômica. Muitos autores buscam o diagnóstico ou biomarcadores por diversas técnicas [109, 113, 128].

Lodi et al. (2011) mostraram o valor da via metabonômica em vários tipos de câncer, pelo fornecimento do que chamaram de “impressão digital” do câncer, além da importância no seguimento destas patologias [129]. Urquidi et al. em 2012 corroboraram sobre a importância do método em sua revisão sobre os mais diversos tipos de biomarcadores [130].

O presente estudo se propõe a criar um modelo estatístico a partir do espectro de urina adquirido através de RNM em um modelo com padrão metabólico para o câncer de próstata, bexiga e rim. Ou seja, através de uma única coleta, tentar montar um modelo que possa diagnosticar essas doenças sem a necessidade de

um método invasivo. Mas não há, neste estudo, o objetivo de descobrir um marcador específico.

Sobre a composição da amostra, pode-se considerar que a seleção de voluntários não foi homogênea. O grupo controle formado por homens pode ser perfeitamente pareado ao grupo CP, mas torna-se frágil para os grupos CB e CR. A ausência de mulheres no grupo controle gera um fator de confundimento, especialmente pelo metabolismo inerente às mulheres. Além disso, houve discrepância de faixas etárias, de forma mais acentuada no grupo CR, com média de idade inferior ao controle.

Portanto, é necessária uma melhor distribuição dos voluntários com a ampliação da amostra no controle, incluindo mulheres e voluntários de outras faixas etárias.

Para equalizar as amostras decidiu-se pela criação de um modelo único, associando os grupos CB e CR (CB/CR).

Os resultados apresentados pelos espectros de CB e CR em conjunto, embora não sejam resultados de comparação entre todos os grupos, mostram-se promissores na descoberta da presença de doença maligna, onde o grupo controle era sabidamente saudável e o grupo CB/CR, embora agrupado com doenças diferentes, é composto em sua totalidade de portadores de uma doença maligna urológica em atividade.

O perfil de sensibilidade de 90,9%, especificidade de 100%, VPP de 100% e VPN de 85,7% mostram uma grande capacidade desse modelo para o diagnóstico destas patologias. A biópsia direta possui valores acima de 90% para o câncer de bexiga e de rim, devido à avaliação tecidual direta [5, 53].

No caso específico do câncer de rim, por biópsia guiada por exames de imagem, principalmente por TC, observa-se uma sensibilidade de 97,7%, especificidade de 100%, VPP e VPN de 100% [131], mas esta é uma modalidade invasiva. Os valores encontrados no modelo metabonômico são próximos daqueles observados na biópsia. Não há publicações confiáveis para métodos diagnósticos não invasivos para o câncer de rim.

Para o câncer de bexiga, em métodos não-invasivos como a citologia oncótica, a positividade depende do grau de diferenciação do tumor, com uma variação da sensibilidade entre 21-53%, especificidade entre 81-95%, VPP entre 71-90% e VPN entre 57-67% [132]. Outros métodos não-invasivos, por exemplo, pela transcrição gênica de sedimentos urinários, observa-se sensibilidade de 81,5% e especificidade de 91,3% [133]. Goodison et al. (2012), demonstraram, através de um modelo estatístico, pelo do cruzamento de 8 biomarcadores a sensibilidade de 90% e especificidade de 97% para o diagnóstico do câncer de bexiga [134].

Este estudo revela uma tendência positiva para validação do método diagnóstico para câncer de rim e de bexiga. Foi observada uma acurácia superior para o diagnóstico do câncer de bexiga, quando comparados os modelos de citologia oncótica e o cruzamento estatístico de biomarcadores aos padrões de especificidade (100%) e sensibilidade (90,9%) da estratégia metabonômica (Tabela 5).

Tabela 5. Comparação de estudos CB/CR.

	Câncer de Rim	Câncer de Bexiga		CB/CR
	Biópsia Guiada Maturen, 2007	Citologia oncótica, McCroskey, 2015	Combinação de biomarcadores Goodison, 2012	Metabonômica
Sensibilidade	97,7%	21-53%	90%	90,9%
Especificidade	100%	81-95%	97%	100%
VPP	100%	71-90%	Não calculado	100%
VPN	100%	57-68%	Não calculado	85,7%

Fonte: Elaborado pelo autor à partir de [131, 132, 134]

Quanto ao câncer de próstata os valores encontrados foram de 100% para sensibilidade, especificidade, VPP e VPN, estando acima dos valores obtidos inclusive por biópsia transretal, que é de 86,4% de sensibilidade, especificidade de 60,7%, VPP de 63,3% e VPN de 85% [135], comportando-se como um método promissor para diagnóstico desta patologia, principalmente por ser completamente não invasivo.

Quando comparados a outros métodos não-invasivos, Mengual et al. em 2016, encontraram sensibilidade de 77% e especificidade de 67% com o método de transcrição gênica de sedimentos urinários [128], sendo estes abaixo dos valores encontrados no presente estudo.

Aggio et al (2016) em 2016, utilizando a técnica de cromatografia do soro conseguiu resultados satisfatórios para câncer de bexiga e próstata, incluindo ainda um grupo onde havia amostras dos dois tipos de câncer, atingindo sensibilidade e especificidade de 96 e 100%, 95 e 96% e 78 e 98%, respectivamente [136]. Esses resultados são semelhantes aos encontrados no presente estudo, principalmente,

por tentar detectar mais de uma patologia e conseguindo um perfil de sensibilidade e especificidade também muito elevado. A Tabela 6 resume os principais resultados.

Tabela 6. Comparação de estudos CP

	Câncer de próstata			
	Biópsia Transretal Sohail, 2015	Transcrição gênica Mengual, 2016	Cromatografia, Aggio, 2016	Metabonômica
Sensiblidade	86,4%	77%	95%	100%
Especificidade	60,7%	67%	96%	100%
VPP	63,3%	Não calculado	Não calculado	100%
VPM	85%	Não calculado	Não calculado	100%

Fonte: Elaborado pelo autor à partir de [128, 135, 136]

As limitações deste estudo devem-se principalmente a homogeneidade da amostra e a composição dos grupos, especialmente relativa ao agrupamento dos grupos CB e CR (CB/CR). Apesar disto, a estratégia metabonômica parece ser um bom modelo para diagnóstico de câncer urológico, sendo melhor em alguns casos até que métodos invasivos.

6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

A estratégia metabonômica mostrou-se promissora como método de diagnóstico de neoplasias urológicas em amostras de urina de pacientes com câncer de próstata, bexiga e rim.

Os resultados encontrados no estudo piloto encorajam a continuidade deste projeto, após as correções metodológicas necessárias, além de nortearem a expansão desta linha de pesquisa.

Está em andamento uma pesquisa dedicada à avaliação de um modelo metabonômico para câncer de próstata pelos espectros da RNM de sêmen, soro e urina.

REFERÊNCIAS

1. Lei, Y. and Y. Liu, *[Induction of proto-oncogens c-fos and c-jun expression in BALB/c-3T3 cells by cadmium chloride].* Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban, 2003. **34**(2): p. 260-1.
2. Shevchenko, N.A., et al., *[Structural changes of chromatin during proto-oncogene activation by cycloheximide: dose-effect].* Biokhimiia, 1992. **57**(10): p. 1491-8.
3. Piccirillo, J.F. and A.R. Feinstein, *Clinical symptoms and comorbidity: significance for the prognostic classification of cancer.* Cancer, 1996. **77**(5): p. 834-42.
4. Oliveira, M.M., et al., *Estimated number of people diagnosed with cancer in Brazil: data from the National Health Survey, 2013.* Rev Bras Epidemiol, 2013. **18 Suppl 2**: p. 146-157.
5. Xavier Júnior, C.V. and M. Hachul, *Tumores urológicos no Brasil / Urologic tumor in Brazil.* Revista Brasileira de Medicina, 2014. **71**(11): p. 410-414.
6. Daniyal, M., et al., *Epidemiology, etiology, diagnosis and treatment of prostate cancer.* Asian Pac J Cancer Prev, 2015. **15**(22): p. 9575-8.
7. Cuzick, J., et al., *Prevention and early detection of prostate cancer.* Lancet Oncol, 2014. **15**(11): p. e484-92.
8. Mulhem, E., N. Fulbright, and N. Duncan, *Prostate Cancer Screening.* Am Fam Physician, 2015. **92**(8): p. 683-8.
9. Alberts, A.R., I.G. Schoots, and M.J. Roobol, *Prostate-specific antigen-based prostate cancer screening: Past and future.* Int J Urol, 2015. **22**(6): p. 524-32.
10. Marques, C.d.L.T.d.Q., J.D.d.S. Neto, and N.F.L. Júnior, *Câncer de Próstata*, in *Oncologia - Uma Abordagem Multidisciplinar*, A. Campos, Editor. 2015, Carpe Diem: Recife. p. 427-434.
11. Volpe, A., C. Terrone, and R.M. Scarpa, *The current role of percutaneous needle biopsies of renal tumours.* Arch Ital Urol Androl, 2009. **81**(2): p. 107-12.
12. Dunn, W.B. and D.I. Ellis, *Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies.* TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2005. **24**(4): p. 285-294.
13. Nicholson, J.K. and J.C. Lindon, *Systems biology: Metabonomics.* Nature, 2008. **455**(7216): p. 1054-6.
14. Brindle, J.T., et al., *Application of chemometrics to 1H NMR spectroscopic data to investigate a relationship between human serum metabolic profiles and hypertension.* Analyst, 2003. **128**(1): p. 32-6.
15. Lenz, E.M. and I.D. Wilson, *Analytical Strategies in Metabonomics.* Journal of Proteome Research, 2007. **6**(2): p. 443-458.
16. Nicholson, J.K., et al., *Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function.* Nat Rev Drug Discov, 2002. **1**(2): p. 153-61.
17. Keun, H.C., *Metabonomic modeling of drug toxicity.* Pharmacol Ther, 2006. **109**(1-2): p. 92-106.
18. Coen, M., et al., *NMR-based metabolic profiling and metabonomic approaches to problems in molecular toxicology.* Chem Res Toxicol, 2008. **21**(1): p. 9-27.
19. Hyndman, I.J., *Review: the Contribution of both Nature and Nurture to Carcinogenesis and Progression in Solid Tumours.* Cancer Microenviron, 2016. **9**(1): p. 63-9.
20. Keller, R.R., et al., *Carcinogen-specific mutations in preferred Ras-Raf pathway oncogenes directed by strand bias.* Carcinogenesis, 2016.

21. Chun, Y.J. and D. Kim, *Cancer Activation and Polymorphisms of Human Cytochrome P450 1B1.* Toxicol Res, 2016. **32**(2): p. 89-93.
22. Romaguera, A.M.d.A. and A.C.O.d. Santos, *Biologia Tumoral*, in *Oncologia - Uma Abordagem Multidisciplinar*, A. Campos, Editor. 2015, Carpe Diem: Recife. p. 29-25.
23. Li, W., et al., *Shikonin Suppresses Skin Carcinogenesis via Inhibiting Cell Proliferation.* PLoS One, 2015. **10**(5): p. e0126459.
24. Neto, A.B.d.S., et al., *Epidemiologia do Câncer*, in *Oncologia - Uma Abordagem Multidisciplinar*, A. Campos, Editor. 2015, Carpe Diem: Recife. p. 91-96.
25. Reiter, E.R.D., J.B., *Epidemiology, etiology, and prevention of prostate cancer*, in *Campbell's Urology*, P.C. Walsh, Editor. 2002, Saunders: Philadelphia, Pennsylvania, USA. p. Chapter 85.
26. Collin, S.M., et al., *Prostate-cancer mortality in the USA and UK in 1975-2004: an ecological study.* Lancet Oncol, 2008. **9**(5): p. 445-52.
27. Ferlay, J., et al., *Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008.* Int J Cancer, 2010. **127**(12): p. 2893-917.
28. Bashir, M.N., *Epidemiology of Prostate Cancer.* Asian Pac J Cancer Prev, 2015. **16**(13): p. 5137-41.
29. Tao, Z.Q., et al., *Epidemiology of prostate cancer: current status.* Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2015. **19**(5): p. 805-12.
30. Zeegers, M.P., A. Jellema, and H. Ostrer, *Empiric risk of prostate carcinoma for relatives of patients with prostate carcinoma: a meta-analysis.* Cancer, 2003. **97**(8): p. 1894-903.
31. Shao, Y.H., et al., *Contemporary risk profile of prostate cancer in the United States.* J Natl Cancer Inst, 2009. **101**(18): p. 1280-3.
32. Júnior, C.d.L.T.d.Q.M.J.D.d.S.N.N.F.L., *Câncer de Próstata*, in *Oncologia - Uma Abordagem Multidisciplinar*, A. Campos, Editor. 2015, Carpe Diem: Recife - PE.
33. Jemal, A., et al., *Prostate Cancer Incidence and PSA Testing Patterns in Relation to USPSTF Screening Recommendations.* Jama, 2015. **314**(19): p. 2054-61.
34. Li, J., Z. Berkowitz, and I.J. Hall, *Decrease in Prostate Cancer Testing Following the US Preventive Services Task Force (USPSTF) Recommendations.* J Am Board Fam Med, 2015. **28**(4): p. 491-3.
35. Barocas, D.A., et al., *Effect of the USPSTF Grade D Recommendation against Screening for Prostate Cancer on Incident Prostate Cancer Diagnoses in the United States.* J Urol, 2015. **194**(6): p. 1587-93.
36. Bhindi, B., et al., *Impact of the U.S. Preventive Services Task Force recommendations against prostate specific antigen screening on prostate biopsy and cancer detection rates.* J Urol, 2015. **193**(5): p. 1519-24.
37. Byers, T., et al., *The American Cancer Society challenge goal to reduce US cancer mortality by 50% between 1990 and 2015: Results and reflections.* CA Cancer J Clin, 2016.
38. Gershman, B., et al., *Impact of Prostate-specific Antigen (PSA) Screening Trials and Revised PSA Screening Guidelines on Rates of Prostate Biopsy and Postbiopsy Complications.* Eur Urol.
39. Tao, T., H. Guan, and M. Chen, *[2014 Annual Meeting of the American Urological Association: early screening and molecular markers of prostate cancer].* Zhonghua Nan Ke Xue, 2015. **21**(6): p. 555-60.

40. Shoag, J., et al., *Lethal Prostate Cancer in the PLCO Cancer Screening Trial.* Eur Urol, 2016. **70**(1): p. 2-5.
41. INCA, I.N.d.C. *Rastreamento do câncer de próstata*. 2013 [cited; Available from: http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/rastreamento_prostata_resumido.2013.pdf.
42. Shoag, J.E., S. Mittal, and J.C. Hu, *Reevaluating PSA Testing Rates in the PLCO Trial.* N Engl J Med, 2016. **374**(18): p. 1795-6.
43. Castello-Porcar, A., F. Garcia-Morata, and J.M. Martinez-Jabaloyas, *Prostate cancer detection rate at second and third biopsy. Predictive factors and risk groups for cancer diagnosis.* Arch Esp Urol, 2014. **67**(7): p. 605-14.
44. Arsov, C., et al., *Prospective randomized trial comparing magnetic resonance imaging (MRI)-guided in-bore biopsy to MRI-ultrasound fusion and transrectal ultrasound-guided prostate biopsy in patients with prior negative biopsies.* Eur Urol, 2015. **68**(4): p. 713-20.
45. Anastasiadis, A., et al., *Complications of prostate biopsy.* Expert Rev Anticancer Ther, 2013. **13**(7): p. 829-37.
46. *Herencia Genetica y Enfermedad*. 2005 [cited; Available from: http://herenciageneticayenfermedad.blogspot.com.br/2016/04/cancer-de-prostata-pdqversion-para.html.
47. Zequi, S.d.C. and R.S.M. Campos, *Câncer de Próstata Localizado*, in *Urologia Fundamental*, A.N. Júnior, M.Z. Filho, and R.B.d. Reis, Editors. 2010, Planmark
São Paulo. p. 205 - 214.
48. Warren, J.L., et al., *Evaluation of Trends in the Cost of Initial Cancer Treatment.* J Natl Cancer Inst, 2008.
49. Mahdavifar, N., et al., *Epidemiology, Incidence and Mortality of Bladder Cancer and their Relationship with the Development Index in the World.* Asian Pac J Cancer Prev, 2016. **17**(1): p. 381-6.
50. Purdue, M.P. and D.T. Silverman, *Clearing the Air: Summarizing the Smoking-related Relative Risks of Bladder and Kidney Cancer.* Eur Urol, 2016.
51. van Osch, F.H., et al., *Quantified relations between exposure to tobacco smoking and bladder cancer risk: a meta-analysis of 89 observational studies.* Int J Epidemiol, 2016.
52. Truta, A., et al., *Novel non invasive diagnostic strategies in bladder cancer.* Clujul Med, 2016. **89**(2): p. 187-92.
53. Lima Júnior, N.F. and J. Domingos Neto, *Câncer de Bexiga*, in *Oncologia - Uma Abordagem Multidisciplinar*, A. Campos, Editor. 2015, Carpe Diem: Recife. p. 452-456.
54. Vigilância, I.N.d.C.J.A.G.d.S.C.d.P.e. *Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil*. 2015 [cited.
55. Boustead, G.B., et al., *Stage, grade and pathological characteristics of bladder cancer in the UK: British Association of Urological Surgeons (BAUS) urological tumour registry.* BJU Int, 2014. **113**(6): p. 924-30.
56. Urologia, S.B.d. and S.B.d. Patologia, *Câncer de bexiga: diagnóstico*. 2008, scielo. p. 100-101.
57. Foinquinos, R.C., et al., *Massas Renais*, in *Oncologia - Uma Abordagem Multidisciplinar*, A. Campos, Editor. 2015, Carpe Diem: Recife. p. 457-462.

58. Moura, M.A., et al., *The magnitude of the association between smoking and the risk of developing cancer in Brazil: a multicenter study.* BMJ Open, 2014. **4**(2): p. e003736.
59. Yasunaga, Y., et al., *[Validation of 2009 TNM classification based on a prognostic analysis of 350 patients treated for renal cell carcinoma].* Nihon Hinyokika Gakkai Zasshi, 2012. **103**(3): p. 540-7.
60. Utsunomiya, N., et al., *[Risk factors for recurrence in pT3aN0M0 renal cell carcinoma according to 2009 TNM classification].* Hinyokika Kiyo. **60**(1): p. 1-5.
61. Cho, M.C., et al., *Prognostic factor for Korean patients with renal cell carcinoma and venous tumor thrombus extension: application of the new 2009 TNM staging system.* Int Braz J Urol. **39**(3): p. 353-63.
62. Yasunaga, Y., et al., *[Validation of 2009 TNM classification based on a prognostic analysis of 350 patients treated for renal cell carcinoma].* Nihon Hinyokika Gakkai Zasshi. **103**(3): p. 540-7.
63. Cho, M.C., et al., *Prognostic factor for Korean patients with renal cell carcinoma and venous tumor thrombus extension: application of the new 2009 TNM staging system.* Int Braz J Urol, 2013. **39**(3): p. 353-63.
64. Laird, A., et al., *Renal cell carcinoma needle biopsy: sowing the seed for later complications?* BMJ Case Rep. **2014**.
65. Nicholson, J.K., J.C. Lindon, and E. Holmes, *'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data.* Xenobiotica, 1999. **29**(11): p. 1181-9.
66. Zhang, A., et al., *Recent and potential developments of biofluid analyses in metabolomics.* Journal of Proteomics, 2012. **75**(4): p. 1079-1088.
67. Bharti, S.K. and R. Roy, *Quantitative 1H NMR spectroscopy.* TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2012. **35**: p. 5-26.
68. Webb-Robertson, B.J., et al., *A study of spectral integration and normalization in NMR-based metabonomic analyses.* J Pharm Biomed Anal, 2005. **39**(3-4): p. 830-6.
69. Zhang, S., et al., *Advances in NMR-based biofluid analysis and metabolite profiling.* The Analyst, 2010. **135**(7): p. 1490-1498.
70. Gallagher, F.A., *An introduction to functional and molecular imaging with MRI.* Clin Radiol, 2010. **65**(7): p. 557-66.
71. Holmes, E., T.M. Tsang, and S.J. Tabrizi, *The application of NMR-based metabonomics in neurological disorders.* NeuroRx, 2006. **3**(3): p. 358-72.
72. Wolahan, S.M., D. Hirt, and T.C. Glenn, *Translational Metabolomics of Head Injury: Exploring Dysfunctional Cerebral Metabolism with Ex Vivo NMR Spectroscopy-Based Metabolite Quantification.* 2015.
73. Constantino, M.G., et al., *Simulação de desdobramentos complexos de espectros de RMN de 1H*. 2006, scielo. p. 160-167.
74. Colnago, L.A., F.C.L. Almeida, and A.P. Valente, *Espectrometria de Massa e RNM Multidimensional e Multinuclear.* Atualidades em Química, 2002: p. 9-14.
75. Zhang, A., et al., *Exploratory urinary metabolic biomarkers and pathways using UPLC-Q-TOF-HDMS coupled with pattern recognition approach.* Analyst, 2012. **137**(18): p. 4200-8.
76. Zhang, A., et al., *Urine metabolomics.* Clin Chim Acta, 2012. **414**: p. 65-9.
77. Ryan, D., et al., *Recent and potential developments in the analysis of urine: a review.* Anal Chim Acta, 2011. **684**(1-2): p. 8-20.

78. Lauridsen, M., et al., *Human urine as test material in 1H NMR-based metabonomics: recommendations for sample preparation and storage.* Anal Chem, 2007. **79**(3): p. 1181-6.
79. Nicholson, J.K. and J.C. Lindon, *Systems biology: Metabonomics.* Nature, 2008. **455**(7216): p. 1054-1056.
80. Panebianco, V., et al., *PCA3 urinary test versus 1H-MRSI and DCEMR in the detection of prostate cancer foci in patients with biochemical alterations.* Anticancer Res, 2011. **31**(4): p. 1399-405.
81. Wang, Y., et al., *Spectral editing and pattern recognition methods applied to high-resolution magic-angle spinning 1H nuclear magnetic resonance spectroscopy of liver tissues.* Anal Biochem, 2003. **Dec**(323): p. 26-32.
82. Roberts, M.J., et al., *Metabolomics: a novel approach to early and noninvasive prostate cancer detection.* Korean J Urol, 2011. **52**(2): p. 79-89.
83. Brindle, J.T., et al., *Rapid and noninvasive diagnosis of the presence and severity of coronary heart disease using 1H-NMR-based metabonomics.* Nat Med, 2002. **8**(12): p. 1439-44.
84. Wang, H., et al., *(1)H NMR-based metabolic profiling of human rectal cancer tissue.* Mol Cancer, 2013. **12**(1): p. 121.
85. Amiot, A., et al., *(1)H NMR Spectroscopy of Fecal Extracts Enables Detection of Advanced Colorectal Neoplasia.* J Proteome Res, 2015. **14**(9): p. 3871-81.
86. Atzei, A., et al., *Metabolomics in paediatric respiratory diseases and bronchiolitis.* J Matern Fetal Neonatal Med, 2011. **24 Suppl 2**: p. 59-62.
87. Beneduci, A., et al., *Perspectives of 1H-NMR-based urinary metabonomics in Fabry disease.* J Nephrol, 2010. **23 Suppl 16**: p. S213-20.
88. Kim, I.Y., et al., *1H NMR-based metabolomic study on resistance to diet-induced obesity in AHNAK knock-out mice.* Biochem Biophys Res Commun, 2010. **403**(3-4): p. 428-34.
89. Puchades-Carrasco, L., et al., *Serum metabolomic profiling facilitates the non-invasive identification of metabolic biomarkers associated with the onset and progression of non-small cell lung cancer.* Oncotarget, 2016. **7**(11): p. 12904-16.
90. Scano, P., et al., *1H NMR metabolite fingerprinting as a new tool for body fluid identification in forensic science.* Magn Reson Chem, 2013. **51**(8): p. 454-62.
91. Weiss, R.H. and K. Kim, *Metabolomics in the study of kidney diseases.* Nat Rev Nephrol, 2011. **8**(1): p. 22-33.
92. Le Moyec, L., et al., *Aminoglycoside and glycopeptide renal toxicity in intensive care patients studied by proton magnetic resonance spectroscopy of urine.* Crit Care Med, 2002. **30**(6): p. 1242-5.
93. Kirschenlohr, H.L., et al., *Proton NMR analysis of plasma is a weak predictor of coronary artery disease.* Nat Med, 2006. **12**(6): p. 705-10.
94. Tong, T., et al., *Dynamic 1H-MRS assessment of brain tumors: a novel approach for differential diagnosis of glioma.* Oncotarget, 2015. **6**(31): p. 32257-65.
95. Amiot, A., et al., *(1)H NMR Spectroscopy of Fecal Extracts Enables Detection of Advanced Colorectal Neoplasia.* J Proteome Res. **14**(9): p. 3871-81.
96. Tang, C., et al., *Gene mutation profiling of primary glioblastoma through multiple tumor biopsy guided by 1H-magnetic resonance spectroscopy.* Int J Clin Exp Pathol, 2015. **8**(5): p. 5327-35.

97. Aburano, H., et al., *Differences between glioblastomas and primary central nervous system lymphomas in 1H-magnetic resonance spectroscopy.* Jpn J Radiol, 2015. **33**(7): p. 392-403.
98. Mundra, V., et al., *Systemic delivery of nanoparticle formulation of novel tubulin inhibitor for treating metastatic melanoma.* Drug Deliv Transl Res, 2015. **5**(3): p. 199-208.
99. Rosi, A., et al., *(1) H NMR spectroscopy of glioblastoma stem-like cells identifies alpha-aminoadipate as a marker of tumor aggressiveness.* NMR Biomed, 2015. **28**(3): p. 317-26.
100. Battal, B., V. Akgun, and B. Karaman, *Value of 3T 1H-magnetic resonance spectroscopy in the differentiation of benign and malignant breast tumors.* Acta Radiol, 2014. **55**(4): p. 416-7.
101. Chen, X., et al., *Metabolomics analysis of seminal plasma in infertile males with kidney-yang deficiency: a preliminary study.* Evid Based Complement Alternat Med. **2015**: p. 892930.
102. Aaronson, D.S., et al., *A novel application of 1H magnetic resonance spectroscopy: non-invasive identification of spermatogenesis in men with non-obstructive azoospermia.* Hum Reprod, 2010. **25**(4): p. 847-52.
103. Bivalacqua, T.J., *Metabolomics and urologic oncology.* Urol Oncol, 2011. **29**(5): p. 550.
104. Narayan, P. and J. Kurhanewicz, *Magnetic resonance spectroscopy in prostate disease: diagnostic possibilities and future developments.* Prostate Suppl, 1992. **4**: p. 43-50.
105. Ferro, M., et al., *Biomarkers in localized prostate cancer.* Future Oncol, 2016. **12**(3): p. 399-411.
106. Tosoian, J.J., et al., *Urinary Biomarkers for Prostate Cancer.* Urol Clin North Am, 2016. **43**(1): p. 17-38.
107. Kumar, D., et al., *NMR spectroscopy of filtered serum of prostate cancer: A new frontier in metabolomics.* Prostate, 2016.
108. Huang, G., et al., *Metabolomic evaluation of the response to endocrine therapy in patients with prostate cancer.* Eur J Pharmacol, 2014. **729**: p. 132-7.
109. Cheng, Y., et al., *Metabolomics in bladder cancer: a systematic review.* Int J Clin Exp Med, 2015. **8**(7): p. 11052-63.
110. Li, C.W. and B.S. Chen, *Network Biomarkers of Bladder Cancer Based on a Genome-Wide Genetic and Epigenetic Network Derived from Next-Generation Sequencing Data.* Dis Markers. **2016**: p. 4149608.
111. Perez, A., et al., *A Pilot Study on the Potential of RNA-Associated to Urinary Vesicles as a Suitable Non-Invasive Source for Diagnostic Purposes in Bladder Cancer.* Cancers (Basel), 2014. **6**(1): p. 179-92.
112. Wang, H., *Predicting MicroRNA Biomarkers for Cancer Using Phylogenetic Tree and Microarray Analysis.* Int J Mol Sci, 2016. **17**(5).
113. Wittmann, B.M., et al., *Bladder cancer biomarker discovery using global metabolomic profiling of urine.* PLoS One, 2014. **9**(12): p. e115870.
114. Hong, S.K., *Biomarkers for bladder cancer: The search continues!* Investig Clin Urol, 2016. **57**(2): p. 73-4.
115. Mussap, M., et al., *Emerging biomarkers and metabolomics for assessing toxic nephropathy and acute kidney injury (AKI) in neonatology.* Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 602526.

116. Zhong, F., et al., *1H NMR spectroscopy analysis of metabolites in the kidneys provides new insight into pathophysiological mechanisms: applications for treatment with Cordyceps sinensis.* Nephrol Dial Transplant, 2012. **27**(2): p. 556-65.
117. Nath, J., et al., *Metabolomic perfusate analysis during kidney machine perfusion: the pig provides an appropriate model for human studies.* PLoS One, 2014. **9**(12): p. e114818.
118. Tugnoli, V., et al., *1H-NMR and 13C-NMR lipid profiles of human renal tissues.* Biopolymers, 2003. **72**(2): p. 86-95.
119. Zira, A.N., et al., *(1)H NMR metabonomic analysis in renal cell carcinoma: a possible diagnostic tool.* J Proteome Res, 2010. **9**(8): p. 4038-44.
120. Kim, K., et al., *Urine metabolomic analysis identifies potential biomarkers and pathogenic pathways in kidney cancer.* Omics, 2011. **15**(5): p. 293-303.
121. Catchpole, G., et al., *Metabolic profiling reveals key metabolic features of renal cell carcinoma.* J Cell Mol Med, 2011. **15**(1): p. 109-18.
122. Ngo, T.C., C.G. Wood, and J.A. Karam, *Biomarkers of renal cell carcinoma.* Urol Oncol, 2014. **32**(3): p. 243-51.
123. Saúde, M.d. *Tabela de procedimentos SUS*. 2016 [cited; Available from: http://sigtap.datasus.gov.br/tabela-unificada/app/sec/inicio.jsp.
124. ANS, A.N.d.S.S., *Rol de procedimentos 2016.* 2015.
125. Godoy, M.M., et al., *Hepatitis C virus infection diagnosis using metabonomics.* J Viral Hepat, 2010. **17**(12): p. 854-8.
126. Hoerr, V., et al., *Characterization and prediction of the mechanism of action of antibiotics through NMR metabolomics.* BMC Microbiol, 2016. **16**(1): p. 82.
127. Xia, J., et al., *MetaboAnalyst 3.0-making metabolomics more meaningful*. 2015.
128. Mengual, L., et al., *Using gene expression from urine sediment to diagnose prostate cancer: development of a new multiplex mRNA urine test and validation of current biomarkers.* BMC Cancer, 2016. **16**: p. 76.
129. Lodi, A. and S.M. Ronen, *Magnetic resonance spectroscopy detectable metabolomic fingerprint of response to antineoplastic treatment.* PLoS One, 2011. **6**(10): p. e26155.
130. Urquidi, V., C.J. Rosser, and S. Goodison, *Molecular diagnostic trends in urological cancer: biomarkers for non-invasive diagnosis.* Curr Med Chem, 2012. **19**(22): p. 3653-63.
131. Maturen, K.E., et al., *Renal mass core biopsy: accuracy and impact on clinical management.* AJR Am J Roentgenol, 2007. **188**(2): p. 563-70.
132. McCroskey, Z., et al., *Accuracy and interobserver variability of the cytologic diagnosis of low-grade urothelial carcinoma in instrumented urinary tract cytology specimens.* Am J Clin Pathol, 2015. **144**(6): p. 902-8.
133. Ribal, M.J., et al., *Gene expression test for the non-invasive diagnosis of bladder cancer: A prospective, blinded, international and multicenter validation study.* Eur J Cancer, 2016. **54**: p. 131-8.
134. Goodison, S., et al., *A multi-analyte assay for the non-invasive detection of bladder cancer.* PLoS One, 2012. **7**(10): p. e47469.
135. Sohail, S.K., et al., *Power doppler ultrasonography guided and random prostate biopsy in prostate cancer diagnosis - a comparative study.* J Pak Med Assoc, 2015. **65**(1): p. 65-8.

136. Aggio, R.B., et al., *The use of a gas chromatography-sensor system combined with advanced statistical methods, towards the diagnosis of urological malignancies.* J Breath Res, 2016. **10**(1): p. 017106.

ANEXOS

ANEXO 1

Hospital das Clínicas
UFPE

SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(para maiores de 18 anos ou emancipados – Res. 466/2012)

Convidamos o (a) Sr. (a) para participar como voluntário (a) da pesquisa **Investigação de Câncer de Urológico por Metabonômica baseada na Espectroscopia de RMN de urina**, que está sob a responsabilidade do pesquisador Dr. **Leslie Clifford Noronha Araujo** e sob a Orientação do Prof. Dr. **Salvador Vilar Correia Lima**.
Endereço: Av. Professor Moraes Rêgo, S/N - Departamento de Urologia - Bloco A do Hospital das Clínicas - 5º Andar - Cidade Universitária - Recife - CEP 50740-600.
Fone: (81) 2126-3649/ (81) 8616-3025 (inclusive ligações a cobrar)
e-mail: Leslie.clifford@gmail.com / salvador@ufpe.br

Também participa desta pesquisa Flávia Cristina Morone Pinto. Telefone para contato: (81) 86163025.

Este Termo de Consentimento pode conter alguns tópicos que o senhor não entenda. Caso haja alguma dúvida, pergunte à pessoa a quem está lhe entrevistando, para que o senhor esteja bem esclarecido sobre tudo que está respondendo. Após ser esclarecido sobre as informações a seguir, caso aceite em fazer parte do estudo, rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa o Sr. não será penalizado de forma alguma. Também garantimos que o Senhor tem o direito de retirar o consentimento da sua participação em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer penalidade.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

O Sr. está sendo convidado para participar de um estudo de pesquisa sobre as possíveis alterações metabólicas (características) encontradas na urina de pessoas portadoras de câncer de próstata, câncer de rim ou câncer de bexiga. Antes de o Sr decidir se quer ou não participar, deve ler as seguintes informações e fazer quantas perguntas forem necessárias para ter certeza que entendeu o que será realizado caso deseje participar. Se decidir participar, o Sr precisará assinar e datar este documento, recebendo uma cópia.

O objetivo deste estudo é avaliar se alterações metabólicas (características) encontradas na urina de pacientes com câncer e podem em um futuro melhorar a forma de diagnóstico e tratamento destas doenças. Com resultados tentaremos melhorar as indicações e o seguimento do tratamento do câncer, diminuindo complicações, os custos e a necessidade de exames desnecessários, melhorando a qualidade do tratamento específico.

Aceitando participar o Sr. deverá fornecer uma amostra de sangue e de sêmen (esperma), que será coletado no laboratório central do HC-UFPE. Este material (sangue e esperma), será tratado diretamente no laboratório e analisado no Laboratório de Química da UFPE. Não havendo necessidade de nenhum outro exame ou procedimento invasivo, bem como não haverá alteração do tipo ou da programação de seu tratamento na unidade de urologia. Durante o estudo o Sr. poderá ser perguntado sobre alguns detalhes de sua evolução clínica pelo pesquisador, respondendo a um questionário.

O Sr. será acompanhado normalmente no ambulatório de urologia e não haverá nenhum prejuízo para o seu tratamento.

Não há riscos estimados pois a coleta de urina será espontânea.

Os benefícios estão relacionados ao desenvolvimento de um método diagnóstico não invasivo e seguro que poderá servir tanto para o diagnóstico quanto para o acompanhamento dos pacientes com câncer de próstata.

As informações desta pesquisa serão confidencias e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa ficarão armazenados em computador pessoal, sob a responsabilidade do pesquisador responsável, no endereço acima informado, pelo período de 5 anos.

O (a) senhor (a) não pagará nada para participar desta pesquisa. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidos pelos pesquisadores (ressarcimento de transporte e alimentação). Fica também garantida indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extra-judicial.

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br.

_____

Salvador Vilar Correia Lima

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO (A)

Eu, _____, CPF _____, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e de ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do estudo **Investigação de Câncer de Urológico por Metabonômica baseada na Espectroscopia de RMN de urina**, como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pelo(a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade (ou interrupção de meu acompanhamento/ assistência/tratamento).

Local e data: _____ _____ _____ _____

Impressão digital

Assinatura do participante: _____

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e o aceite do voluntário em participar:

Nome: _____
Assinatura: _____

Nome: _____
Assinatura: _____