



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**DIAGNÓSTICO DO CÂNCER DE PRÓSTATA UTILIZANDO METABOLÔMICA
EXPLORATÓRIA E ATR-FITR – PROVA DE CONCEITO.**

Leandro Alves de Oliveira

UBERLÂNDIA - MG

2025

LEANDRO ALVES DE OLIVEIRA

**DIAGNÓSTICO DO CÂNCER DE PRÓSTATA UTILIZANDO METABOLÔMICA
EXPLOTATÓRIA E ATR-FTIR - PROVA DE CONCEITO.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Thúlio Marquez Cunha

UBERLÂNDIA- MG

2025

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

O48d Oliveira, Leandro Alves de, 1972-
2025 Diagnóstico do câncer de próstata utilizando metabolômica
exploratória e ATR-FITR [recurso eletrônico] : prova de conceito /
Leandro Alves de Oliveira. - 2025.

Orientador: Thúlio Marquez Cunha.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de
Pós-graduação em Ciências da Saúde.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.te.2025.5046>
Inclui bibliografia.
Inclui ilustrações.

1. Ciências médicas. I. Cunha, Thúlio Marquez, 1979-, (Orient.). II.
Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-graduação em
Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 61

André Carlos Francisco
Bibliotecário-Documentalista - CRB-6/3408



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - Acadêmico

Av. Pará, 1720, Bloco 2H, Sala 11 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
Telefone: (34) 3225-8628 - www.ppcsa.famed.ufu.br - ppcsa@famed.ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Ciências da Saúde			
Defesa de:	Defesa de Tese Doutorado Nº 06/PPGCSAUDE			
Data:	24.06.2025	Hora de início:	13:00h	Hora de encerramento:
Matrícula do Discente:	11813CSD016			
Nome do Discente:	Leandro Alves de Oliveira			
Título do Trabalho:	DIAGNÓSTICO DO CÂNCER DE PRÓSTATA UTILIZANDO METABOLÔMICA EXPLORATÓRIA E ATR-FITR – PROVA DE CONCEITO			
Área de concentração:	Ciências da Saúde			
Linha de pesquisa:	2: Diagnóstico, Tratamento e Prognóstico das Doenças e Agravos à Saúde			
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Desenvolvimento de Plataformas Nanobiotecnológicas para o Diagnóstico de Doenças Pulmonares			

Reuniu-se no Bloco 2E - Sala 210 | Campus Umuarama, Uberlândia/MG, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, composta pelos Profs. Drs. Larissa Prado Maia (UEMG), Bianca Uliana Picolo (UFU), Ricardo de Lima Favaretto (Ebserh HC-UFU) e Thúlio Marquez Cunha (UFU), orientador do candidato. Em web conferência, pela plataforma ConferênciaWeb, também membro da banca, o prof. Dr. Ricardo Garcia de Freitas (Hospital MaterDei).

Iniciando os trabalhos a presidente da mesa, Dr. Thúlio Marquez Cunha, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato, agradeceu a presença dos membros da banca, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(as) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação

interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Ricardo Garcia de Freitas, Usuário Externo**, em 24/06/2025, às 14:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Larissa Prado Maia, Usuário Externo**, em 24/06/2025, às 15:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Bianca Uliana Picolo, Professor(a) Substituto(a) do Magistério Superior**, em 24/06/2025, às 15:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Thúlio Marquez Cunha, Professor(a) do Magistério Superior**, em 24/06/2025, às 15:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ricardo de Lima Favaretto, Usuário Externo**, em 24/06/2025, às 15:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **6445244** e o código CRC **875C04D1**.

Dedicatória

*Ao seu Hélio, meu pai, e em tudo que ele vive,
com Nossa Pai
no meu lar,
com a minha família,
no meu trabalho,
com meus amigos.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Thúlio Marquez Cunha, por sustentar a todo momento as necessidades da pesquisa, meus sinceros agradecimentos. Agradeço também ao nosso mentor Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart (in memorian) e ao Prof. Dr. Mario Machado Martins pelos ensinamentos passados de forma sempre generosa.

Agradeço a todos colaboradores do Laboratório de Nanobiotecnologia em especial à Prof. Dra. Bianca Uliana Picolo, Prof. Dr. Robinson Sabino Silva, Dra. Hebreia Oliveira Almeida Souza, Dr Abel Dib Rayashi. Aos colegas urologistas Dr. Ricardo de Lima Favaretto, Prof. Dr. Omar Pacheco Simão, Prof. Dr. Sebastião Antônio Borba.

RESUMO

Introdução: o diagnóstico do câncer de próstata enfrenta vários desafios, um dos principais problemas é ausência de um marcador câncer específico e as complicações da biopsia de próstata. Esses desafios destacam a necessidade de ferramentas diagnósticas mais disruptivas e eficazes para melhorar a precisão do diagnóstico.

Objetivo: identificar metabólicos e desenvolver plataformas diagnósticas utilizando metabolômica exploratória e ATR-FTIR com algoritmos de inteligência artificial para o diagnóstico de câncer de próstata. **Metodologia:**

Na metabolômica exploratória foram analisados 46 participantes divididos em 3 grupos: grupo 1 (pacientes com diagnóstico de câncer de próstata n=19) grupo 2 (pós-operatório de prostatectomia radical n=11), grupo 3 (controle n =16), dos quais foram coletadas amostras de sangue. Foi realizado a extração dos metabolitos com metanol, os dados obtidos foram analisados com uma estratégia de metabolômica exploratória e criação de algoritmos pela inteligência para classificação dos grupos. Na ATR-FTIR foram analisados 20 participantes divididos em 2 grupos: grupo 1 (pacientes com diagnóstico de câncer de próstata n=11), grupo 2 (controle n=9), dos quais foram coletadas amostras de sangue . Os dados espectrais de soro foram obtidos utilizando o Espectrômetro FTIR Agilent Cary 630 no modo de refletância total microatenuada (ATR), abrangendo uma faixa de números de onda de 4000 a 650 cm⁻¹. Os dados espectrais foram analisados em ferramentas de IA.

Resultados: Na metabolômica exploratória foram identificados no total 1.744 metabólitos. Foi utilizado filtro de frequência de 100%, análise ANOVA com p<0,05 e fold change maior ou igual a 2 e obteve-se 11 metabólitos diferencialmente expressos. Dentre estes resultados com diferenças, 2 metabolitos se destacam por estarem ausentes no grupo 1: Pi22 refere-se a um determinado fosfoinositídeo (PI) e C19 Sphingosine-1-phosphate. No emprego da inteligência artificial foi criado algoritmo no modelo de Gradiente Boosting com sensibilidade de 96% e especificidade de 98% e com acurácia de 97% para diagnóstico de câncer de próstata. Empregando ferramentas de inteligência artificial (IA), os resultados demonstraram que o algoritmo de Rede Neural proporcionou a discriminação mais eficaz entre pacientes dos 2 grupos. Essa abordagem de pré-processamento com sensibilidade de 100%, especificidade de 100% e precisão de 100% na diferenciação entre os grupos. **Conclusão:** As avaliações metabolômica

exploratória do soro e ATR-FTIR do soro combinadas a aprendizado de máquina apresentam-se como potencial ferramenta diagnóstica do câncer de próstata. O emprego da metabolômica exploratória encontrou dados promissores para dois metabolitos que estavam ausentes no grupo 1, sendo indicados para estudos futuros como possíveis biomarcadores, também foi possível desenvolver um algoritmo de inteligência artificial com alta sensibilidade, especificidade e acurácia para diagnóstico de câncer de próstata.

Palavras-Chave: Câncer de Próstata; Metabolômica; Inteligência Artificial; ATR-FTIR

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Tese

Figura 1: Modelo de síntese do antígeno prostático específico (PSA) em tecido prostático normal versus câncer de próstata	13
Figura 2: Visão geral das formas de PSA	14
Figura 3: Esquema da espectrometria de massa de amostras líquidas	20
Figura 4: Espectrômetro de massa de alta resolução (LC-MS/MS)	21
Figura 5: Regiões do campo eletromagnético	23
Figura 6: Espectro ATR-FTIR	24
Figura 7: Métodos de avaliação amostral na espectroscopia FTIR	26
Figura 8. Imagem de aparelho ATR-FTIR	27
Figura 9: Desenho do estudo METABOLÔMICA EXPLORATÓRIA e FTIR ATR respectivamente	29

- Artigo 1

Figura 1 - Desenho do estudo	40
Figura 2: Clusterização hierárquica e heatmap	45
Figura 3: 3D-PCA	46
Figura 4: Matriz de confusão	47
Figura 5: Curva ROC para Scoring Sheet	48
Figura 6: Curva ROC para Random Forest	49
Figura 7: Curva ROC para Gradient Boosting 50	

- Artigo 2

Figura 1: Desenho do estudo	59
Figura 2: Média representativa com o respectivo desvio padrão dos espectros de ATR-FTIR (3700–900 nm) na saliva de pacientes do grupo 1 e grupo 2	62
Figura 3: Gráfico de pontuação da Análise de Componentes Principais para PC1 vs. PC2 (A) e cargas de PCA para PC1 e PC2 (B)	63
Figura 4: Gráfico de valor SHAP de importância do recurso do modelo de rede neural para discriminar indivíduos de controle e pacientes com câncer de próstata	65

LISTA DE TABELAS

- Tese

Tabela 1: Identificação de biomarcadores urinários e séricos de câncer de próstata	21
--	----

- Artigo 1

Tabela 1: Características clínicas dos pacientes	44
Tabela 2 - Resultado sensibilidade, especificidade e acurácia	48

- Artigo 2

Tabela 1 : Características clínicas dos pacientes.....	62
Tabela 2: Algoritmos de aprendizado de máquina aplicados em espectros para discriminar indivíduos controle e pacientes com câncer de próstata	64
Tabela 3: Atribuição de banda do valor SHAP de cada característica para discriminar indivíduos de controle e pacientes com câncer de próstata e suas atribuições moleculares	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

aa - Aminoácidos

ADT -Terapia de deprivação androgênica

ATR - Attenuated total reflection

AUA - American Urological Association

BPH - Hiperplasia prostática benigna

CAAE - Certificado de Apresentação para Apreciação Ética

CaP - Câncer de Próstata

CEP - Comitê de Ética em Pesquisa

CG - Cromatografia gasosa

CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência)

cPSA - PSA complexado

cT - Estadiamento clínico

cT - Estadiamento clínico do tumor primário

dp - Profundidade da onda evanescente

DPSA – Densidade do PSA

DRE- Exame retal digital

EAU - European Association of Urology

EM – Espectrometria de massas

ERI – Elemento de reflexão interno

FAMED - Faculdade de Medicina

FDA - Food and Drug Administration

FIR - Far-infrared

FTIR - Fourier transform infrared spectroscopy

fPSA - PSA livre/não ligado

GC - Grupo Controle

GC-MS - Cromatografia gasosa e espectrometria de massa

GE - Grupo de estudo

HC - Hospital de Clínicas

hK2 – Calicreína humana

HPB - Hiperplasia prostática benigna

IA - Artificial intelligence

IES - Ionização por electrospray

ISUP - International Society of Urological Pathology

IV – Intravermelho

KLK3 - Calicreína relacionada à peptidase 3

LC - Liquid chromatography

LC-MS - Cromatografia líquida e espectrometria de massa

M - Metástase

MG - Minas Gerais

MIR - Mid-infrared

ML - Machine learning

mpMRI - Ressonância magnética multiparamétrica de próstata

MPP - Mass Profiler Professional

MS - Mass spectrometry

MSI - Metabolomics Standards Initiative

NIR - Near-infrared

OMS – Organização Mundial de Saúde

PCA - Principal component analysis

PCA3- Prostate Cancer Antigen 3

PET-PSMA - Tomografia por emissão de pósitrons com antígeno de membrana específico da próstata

PHI - Prostate Health Index

PI-RADS - Prostate Imaging Reporting and Data System

PTR - Prostatovesiculectomia radical

PR - Prostatovesiculectomia radical

PSA - Antígeno prostático específico

PSA I - Antígeno prostático específico livre

PSA T - Antígeno prostático específico total

ROC - Receiver Operating Characteristic

Rt - Radioterapia

RTU - Ressecção trans uretral

SBU - Sociedade Brasileira de Urologia

SHAP - Sapley Additive Explanations

SVM - Máquina de vetores de suporte

TCLE - Termo de consentimento livre e esclarecido

TNM - Tumor linfonodo metástase

Tu – Tumor

TR – Toque Retal

UFU – Universidade Federal de Uberlância

US - Ultrassonografia

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1. DIAGNÓSTICO DE CÂNCER DE PRÓSTATA.....	12
1.2. ANTÍGENO PROSTÁTICO ESPECIFICO (PSA).....	12
1.3. EXAME DIGITAL RETAL (DRE).....	14
1.4. TESTES RECENTES	15
1.4.1. PROSTATE HEALTH INDEX (PHI).....	15
1.4.2. 4KSCORE	16
1.4.2. PCA3 (PROSTATE CANCER ANTIGEN 3).....	16
1.5. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA MULTIPARAMÉTRICA (MPMRI).....	17
1.6. BIÓPIA PROSTÁTICA	17
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	19
2.1. INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL (IA).....	19
2.2. METABOLÔMICA EXPLORATÓRIA NO SORO	20
2.3 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURRIER (FTIR - FOURRIER TRANSFORMED INFRARED).....	22
3. OBJETIVOS.....	27
3.1. OBJETIVO GERAL:	27
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
4.1. ASPECTOS ÉTICOS E BIOSSEGURANÇA.....	28
4.2. DESENHO DO ESTUDO	28
4.3. FONTE DE DADOS	28
4.4. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	29
4.5. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	29
4.6. COLETA DE AMOSTRA BIOLÓGICA.....	30
4.7. VARIÁVEIS	30

4.8. ATR - FTIR.....	31
4.9. ANÁLISE MULTIVARIADA.....	31
4.10. ANÁLISE PREDITIVA COM ALGORITMOS DE APRENDIZADO DE MÁQUINA	32
4.11. METABOLÔMICA - (CL – MS).....	32
5 RESULTADO NA FORMA DE ARTIGOS.....	34
5.1 ARTIGO 1. METABOLÔMICA EXPLORATÓRIA E INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL NO DIAGNÓSTICO DO CÂNCER DE PRÓSTATA	34
5.2. ARTIGO 2. ATR - FTIR E INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL NO DIAGNÓSTICO DO CÂNCER DE PRÓSTATA.....	34
ARTIGO 1.....	35
ARTIGO 2.....	54
REFERÊNCIAS.....	70
ANEXO 1 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	76
ANEXO 2 – INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS	78
ANEXO 3 – PARECER CEP	81

1. INTRODUÇÃO

1.1. Diagnóstico de Câncer de próstata

O câncer de próstata (Cap) é uma das neoplasias malignas mais comuns entre os homens, especialmente em países com alto índice de desenvolvimento humano (Rebelo *et al.*, 2021). A detecção global tem aumentado, em parte devido ao uso mais difundido do teste de antígeno prostático específico (PSA) e envelhecimento da população, embora as taxas de mortalidade tenham permanecido relativamente estáveis (Merriel *et al.*, 2018; Schaeffer *et al.*, 2023). Nos Estados Unidos, estima-se que 288.300 novos casos foram diagnosticados em 2023, representando 29% dos novos casos de câncer em homens. (Schaeffer *et al.*, 2023)

O diagnóstico geralmente é feito por biópsia da próstata, que é indicada após a detecção de níveis elevados de PSA no sangue e/ou alteração do exame digital retal (Rebelo *et al.*, 2021). No entanto, o PSA não é um teste perfeito, pois pode resultar em falsos positivos e negativos, o que limita sua utilidade clínica como teste isolado (Merriel *et al.*, 2018), além disso, a biópsia é um procedimento invasivo com riscos de infecção e sepse. (Rebelo *et al.*, 2021).

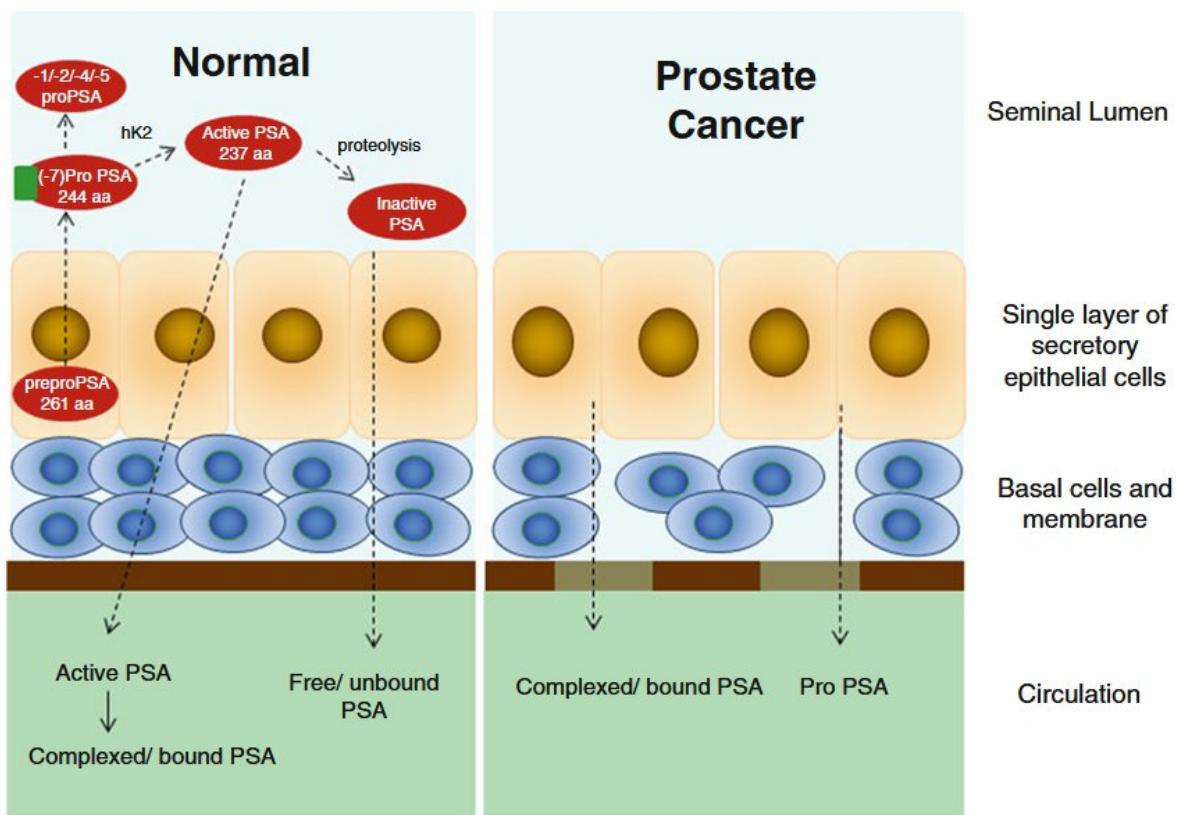
1.2. Antígeno prostático específico (PSA)

O antígeno prostático específico (PSA) de fato, uma calicreína, especificamente uma calicreína relacionada à peptidase 3 (KLK3), produzida pelas células epiteliais da próstata. Sua principal função biológica é atuar como uma protease que ajuda a liquefazer o sêmen, facilitando a motilidade dos espermatozoides. No contexto clínico, o PSA é amplamente utilizado como um marcador tumoral para o Cap embora não seja específico para o câncer, pois níveis elevados de PSA podem ocorrer em outras condições benignas, como hiperplasia prostática benigna (BPH) e prostatite.

O PSA dosado no sangue é utilizado principalmente para o rastreamento do câncer de próstata. No entanto, o uso do PSA para rastreamento é controverso devido à sua baixa especificidade, o que pode levar a diagnósticos excessivos e tratamentos desnecessários. Aproximadamente 25% dos homens com níveis de PSA entre 4 e 10 ng/mL terão um resultado positivo em uma biópsia subsequente. A velocidade de PSA ou cinética do PSA (aumento do PSA em um ano) é geralmente expressa em ng/mL

por ano. Um valor de velocidade de PSA superior a 0,35 ng/mL/ano em homens com PSA total abaixo de 4,0 ng/mL foi associado a um risco aumentado de Cap e mortalidade específica pela doença. Além disso, o PSA é utilizado no monitoramento de pacientes com câncer de próstata diagnosticado, ajudando a avaliar a resposta ao tratamento e a estratificação de risco para recorrência (Salman *et al.*, 2015).

Figura 1: Modelo de síntese do antígeno prostático específico (PSA) em tecido prostático normal versus câncer de próstata. (Balk *et al.*, 2003)

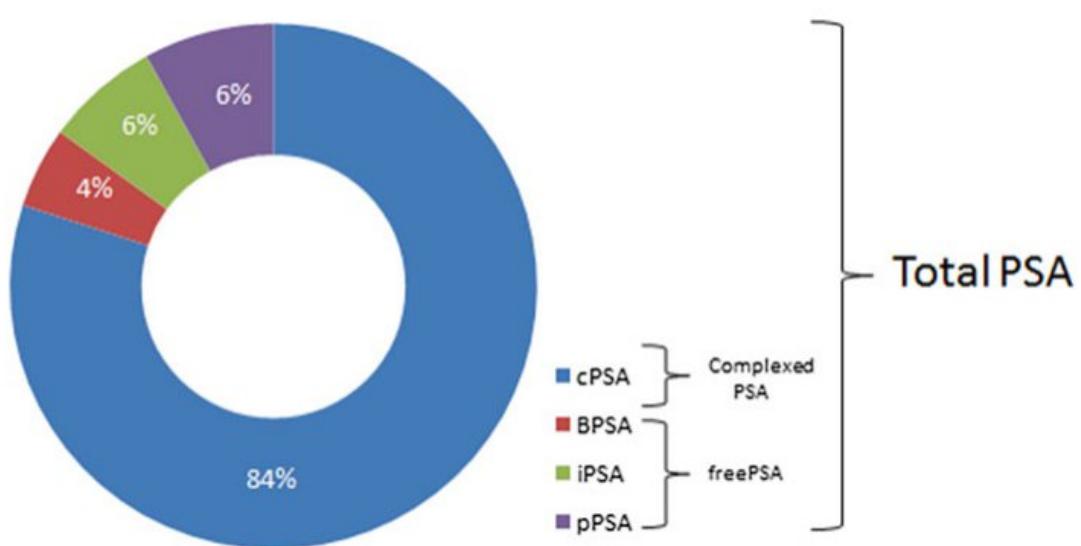


Em células epiteliais secretoras normais, o pré-pró-PSA inativo é produzido, contendo 261 aminoácidos (aa). A remoção de uma sequência líder de 17 aa resulta no (-7) pró-PSA inativo, contendo 244 aminoácidos. O pró-PSA produzido (pPSA) é secretado no lúmen seminal, onde principalmente a hK2 remove o peptídeo pró-líder para formar

PSA maduro e ativo, contendo 237 aminoácidos. Também são formadas formas truncadas de pPSA, todas enzimaticamente inativas. Uma pequena fração do PSA ativo pode difundir-se no soro, onde está ligada a inibidores de protease. A maior

fração de PSA ativo no lúmen sofre proteólise para gerar PSA inativo, que, em pequenas porções, entra na corrente sanguínea, onde circula como PSA livre/não ligado (fPSA). No câncer de próstata, a ruptura da camada de células basais e da membrana basal leva a uma diminuição no processamento luminal, resultando em níveis crescentes de PSA complexado (cPSA) e pPSA no soro, e níveis decrescentes de fPSA sérico.

Figura 2: Visão geral das formas de PSA.



Fonte: Salman *et al.*, 2015

1.3. Exame digital retal (DRE)

O exame retal digital (DRE) detecta menos da metade dos cânceres de próstata, especialmente os tumores pequenos, iniciais ou localizados na parte anterior da próstata, que não são palpáveis (baixa sensibilidade); alterações benignas, como hiperplasia prostática benigna (HPB) e prostatites, podem causar alterações semelhantes às do câncer no exame (baixa especificidade). Muitas diretrizes internacionais têm desencorajado o rastreamento em massa do câncer de próstata apenas com PSA e DRE, focando mais em decisões compartilhadas e baseadas no risco.

Como resultado, o DRE deixou de ser um exame obrigatório de triagem em muitos países.

O que dizem as diretrizes?

- Sociedade Brasileira de Urologia (SBU): ainda recomenda o toque retal como complemento, mas não como exame isolado.
- American Urological Association (AUA, 2023): não recomenda mais o TR como ferramenta de rastreamento, mas reconhece seu papel em avaliações clínicas dirigidas.
- European Association of Urology (EAU, 2024): sugere que o TR seja realizado em casos de elevação do PSA ou sinais clínicos, mas não como triagem sistemática.

1.4. Testes recentes

Os testes mais recentes para o diagnóstico do Cap incluem uma combinação de biomarcadores sanguíneos e urinários, além de técnicas avançadas de imagem. O PSA continua a ser um teste de triagem inicial, mas sua baixa especificidade leva a muitos falsos positivos e biópsias desnecessárias. Para melhorar a precisão, testes adicionais como o Índice de Saúde da Próstata (PHI), o teste 4Kscore, e o PCA3 são utilizados para avaliar o risco de câncer clinicamente significativo em homens com níveis elevados de PSA (Pinsky *et al.*, 2023; Boehm *et al.*, 2023).

1.4.1. Prostate Health Index (PHI)

O PHI é um teste diagnóstico que combina três subformas de antígeno prostático específico (PSA): PSA total, PSA livre e proPSA. (Fan *et al.*, 2021) Este índice é utilizado para melhorar a precisão na detecção do câncer de próstata, especialmente para diferenciar entre cânceres clinicamente significativos e indolentes.

O PHI tem demonstrado ser superior ao PSA isolado na previsão de Cap clinicamente significativo. Estudos indicam que o PHI pode ajudar a evitar biópsias desnecessárias, mantendo uma alta sensibilidade para a detecção de cânceres mais agressivos. Por exemplo, um estudo prospectivo mostrou que o PHI tem uma área sob a curva (AUC) de 0,792 para prever Cap clinicamente significativo em pacientes com lesões PI-RADS 4/5, e uma AUC ainda maior de 0,884 em lesões PI-RADS 3.

Um PHI abaixo de 35 foi associado a uma menor taxa de biópsias e uma menor detecção de câncer de próstata de alto grau, enquanto valores acima de 35 indicaram um risco maior de câncer clinicamente significativo. Em pacientes com lesões PI-RADS 3, um PHI acima de 30 foi altamente sensível para câncer clinicamente

significativo, permitindo evitar biópsias desnecessárias em cerca de 34,4% dos casos. Em um cenário clínico real, o uso do PHI foi associado a uma redução significativa nas taxas de biópsia, especialmente em pacientes com níveis de PSA entre 4 e 10 ng/mL (Fan *et al.*, 2021).

1.4.2. 4Kscore

4Kscore é um teste que utiliza um modelo baseado em quatro marcadores de calicreína no sangue para prever o risco de Cap de alto grau (Gleason ≥ 7) em homens que estão sendo considerados para biópsia. Este teste combina a medição de PSA livre, PSA total, calicreína humana 2 (hK2) e PSA intacto, além de considerar a idade, resultados de exame digital retal (DRE) e histórico de biópsias anteriores (Josefson *et al.*, 2024).

Estudos demonstraram que o 4Kscore tem um valor discriminativo elevado, com uma área sob a curva (AUC) de aproximadamente 0,82, indicando uma boa capacidade de prever câncer de próstata de alto grau. O uso do 4Kscore pode reduzir significativamente o número de biópsias desnecessárias, evitando até 58% das biópsias em alguns estudos, enquanto ainda detecta a maioria dos tumores de alto grau (Josefson *et al.*, 2024).

A decisão de realizar uma biópsia com base no 4Kscore deve ser discutida entre o paciente e o urologista, considerando o risco individual de câncer clinicamente significativo (Josefson *et al.*, 2024).

1.4.2. PCA3 (Prostate Cancer Antigen 3)

O PCA3 é um exame de urina coletado imediatamente após massagem prostática que mede a expressão de um RNA não codificante específico do tecido prostático, que está superexpresso em casos de Cap. O PCA3 é particularmente útil na predição dos resultados de biópsias, especialmente em situações de biópsias repetidas (Cui *et al.*, 2016).

A biópsia sistemática guiada por ultrassom, tradicionalmente usada para o diagnóstico, tem limitações significativas, incluindo a subestimação do grau do tumor em muitos casos.

1.5. Ressonância magnética multiparamétrica (mpMRI)

A ressonância magnética multiparamétrica (mpMRI) tem se mostrado superior na detecção de câncer clinicamente significativo e é frequentemente usada para guiar biópsias, reduzindo a incidência de classificação incorreta. (Ong *et al.*, 2020). O sistema Prostate Imaging Reporting and Data System (PI-RADS) é uma ferramenta padronizada utilizada na ressonância magnética multiparamétrica (mpMRI) para avaliar lesões na próstata e estimar a probabilidade de câncer clinicamente significativo. A versão atual, PI-RADS v2.1, classifica as lesões em uma escala de 1 a 5, com base em achados de imagem, incluindo T2 ponderada, difusão (DWI) e, em alguns casos, imagens de contraste dinâmico (DCE-MRI).

- PI-RADS 1: Muito baixa probabilidade de câncer clinicamente significativo.
- PI-RADS 2: Baixa probabilidade de câncer clinicamente significativo.
- PI-RADS 3: Probabilidade intermediária de câncer clinicamente significativo. Este é um ponto de desafio diagnóstico, pois as lesões são consideradas equívocas, com taxas de detecção de câncer variando entre 10% e 35%.
- PI-RADS 4: Alta probabilidade de câncer clinicamente significativo.
- PI-RADS 5: Muito alta probabilidade de câncer clinicamente significativo.

A precisão diagnóstica do PI-RADS v2.1 foi avaliada em uma meta-análise, que mostrou uma sensibilidade de 96% e especificidade de 43% para lesões PI-RADS ≥ 3 , e uma sensibilidade de 89% e especificidade de 66% para lesões PI-RADS ≥ 4 . A taxa de detecção de câncer (CDR) aumenta com a classificação PI-RADS, sendo de 6% para PI-RADS 1, 5% para PI-RADS 2, 19% para PI-RADS 3, 54% para PI-RADS 4 e 84% para PI-RADS 5 (Oerther *et al.*, 2024).

1.6. Biópsia prostática

Os avanços recentes na biópsia prostática (Mottet *et al.*, 2024), estão: biópsia por fusão de imagens: combinação de ultrassonografia e ressonância magnética para maior precisão e biópsia transperineal: alternativa que reduz risco de infecção.

Além disso, a tomografia por emissão de pósitrons com antígeno de membrana específico da próstata (PSMA PET/CT) emergiu como uma modalidade altamente sensível e específica, especialmente útil para a detecção de doença metastática e recorrência bioquímica após tratamento inicial (Albers *et al.*, 2024; Plas *et al.*, 2025)

Esta técnica é aprovada pela FDA nos EUA e é particularmente eficaz na detecção de metástases em linfonodos não aumentados e metástases ósseas (Albers *et al.*, 2024).

Apesar do potencial dos biomarcadores, a integração rotineira na prática clínica é limitada pela falta de evidências de alta qualidade que demonstrem benefícios em termos de sobrevida a longo prazo e custo-efetividade (Eggener *et al.*, 2020; Falagario *et al.*, 2022). Portanto, seu uso é recomendado em situações em que os resultados dos testes, em combinação com fatores clínicos, podem claramente influenciar a decisão de manejo (Eggener *et al.*, 2020).

A classificação do Cap pela International Society of Urological Pathology (ISUP) é baseada no sistema de grupos de grau (Grade Groups), introduzido em 2014 e posteriormente adotado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2016. Este sistema foi desenvolvido a partir do escore de Gleason, com o objetivo de simplificar e aprimorar a estratificação prognóstica, facilitar a comunicação com pacientes e reduzir o risco de overtreatment em tumores indolentes (Offermann *et al.*, 2020).

A classificação de Gleason é um sistema histopatológico utilizado para graduar o adenocarcinoma da próstata com base nos padrões arquiteturais das glândulas tumorais observadas em cortes histológicos. Desenvolvida por Donald Gleason em 1966, essa classificação permanece um dos principais fatores prognósticos para o Cap, sendo fundamental para a estratificação de risco, decisão terapêutica e predição de desfechos clínicos.

O sistema original atribui um padrão de 1 a 5 para as duas áreas tumorais predominantes, sendo o primeiro número referente ao padrão mais comum e o segundo ao segundo mais comum, resultando em uma soma (score de Gleason) que varia de 2 a 10. Entretanto, após revisões promovidas pela International Society of Urological Pathology (ISUP) em 2005 e 2014, padrões 1 e 2 praticamente não são mais utilizados em biópsias, e a classificação foi refinada para refletir melhor o comportamento biológico do tumor.

A classificação histológica ISUP divide os carcinomas prostáticos em cinco grupos de grau, baseados na soma dos padrões histológicos de Gleason mais prevalentes e secundários:

- Grupo de Grau 1 (ISUP 1): Gleason ≤6 (3+3)
- Grupo de Grau 2 (ISUP 2): Gleason 7 (3+4)

- Grupo de Grau 3 (ISUP 3): Gleason 7 (4+3)
- Grupo de Grau 4 (ISUP 4): Gleason 8 (4+4, 3+5, 5+3)
- Grupo de Grau 5 (ISUP 5): Gleason 9-10 (4+5, 5+4, 5+5)

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Inteligência Artificial (IA)

A IA está sendo cada vez mais aplicada para melhorar a precisão e a eficiência do diagnóstico do câncer de próstata, integrando imagens radiológicas e análises patológicas (Saha *et al.*, 2024).

O aprendizado de máquina em inglês *machine learning* (ML) é um ramo da Inteligência Artificial (IA) em que os sistemas computacionais são capazes de aprender automaticamente e melhorar progressivamente o desempenho de uma tarefa a partir de padrões e observações em dados, ou tomar a decisão mais apropriada com base no reconhecimento de padrões nos dados analisados, sem ser explicitamente programado (Schleider; Fazzio, 2021).

A ML pode ser dividido em três categorias: supervisionado, não supervisionado e reforçado. A análise de componentes principais em inglês, *principal component analysis (PCA)*, é um modelo linear não supervisionado que através da avaliação do conjunto da matriz de dados pode diferenciar grupos amostrais. O aprendizado supervisionado usa um conjunto com parte dos dados rotulados, para treinamento do algoritmo, estabelecendo a relação entre as amostras e seus rótulos. Esse modelo permite que os algoritmos aprendam com dados históricos ou de treinamento e aplique este conhecimento na etapa de validação, a todos os dados para derivar a saída correta (Wang *et al.*, 2022).

A utilização de vários algoritmos supervisionados como Regressão Logística, Árvore de Decisão, *Random Forest*, Máquina de Vetores de Suporte (SVM), entre outros, com diferentes características, permite avaliar diferentes desempenhos na busca pelo melhor modelo preditivo.

A SHAP (Shapley Additive Explanations) é uma técnica moderna e poderosa para interpretar os resultados de modelos complexos de aprendizado de máquina, como o SVM e redes neurais (Shapley, 1953).

A IA pode ajudar a correlacionar achados laboratoriais, radiológicos com padrões patológicos, melhorando a acurácia diagnóstica e auxiliando na tomada de decisão clínica.

Desta forma a busca de novos biomarcadores através de novas plataformas tecnológicas é necessária pela tecnologia metabolômica e ATR-FTIR juntamente com o emprego da inteligência artificial na criação de algoritmo que possam contribuir no diagnóstico.

2.2. Metabolômica exploratória no soro

A metabolômica é o estudo sistemático de metabólitos – pequenas moléculas (como aminoácidos, açúcares, ácidos graxos, etc.) presentes em células, tecidos, fluidos biológicos ou organismos inteiros.

A espectrometria de massas (MS) é uma das principais técnicas analíticas utilizadas na metabolômica por sua alta sensibilidade, seletividade e capacidade de identificar centenas a milhares de metabólitos simultaneamente. Na metabolômica, a MS é geralmente acoplada a técnicas de separação, como:

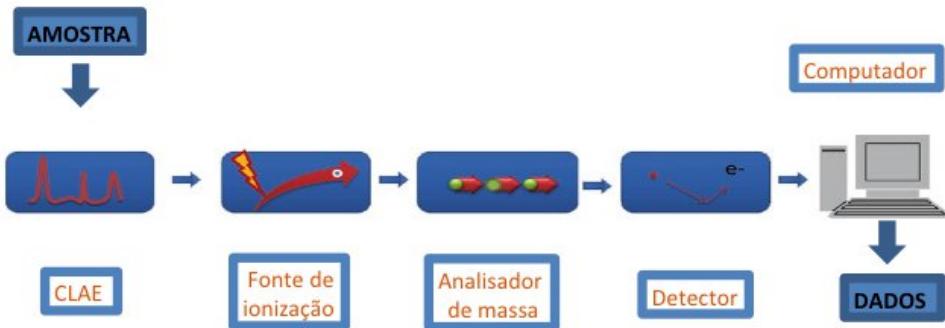
- CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) → LC-MS (do inglês, *Liquid Chromatography–Mass Spectrometry*)
- CG (cromatografia gasosa) → GC-MS (Gas Chromatography–Mass Spectrometry)

A espectrometria de massa (MS) desempenha um papel crucial no diagnóstico de doenças, oferecendo capacidades analíticas avançadas para a identificação e quantificação de biomoléculas. Esta técnica é particularmente valiosa na descoberta de biomarcadores e na inovação diagnóstica, contribuindo significativamente para a medicina personalizada.

A MS, especialmente quando combinada com a LC-MS, permite a análise de matrizes biológicas complexas e a detecção de moléculas em baixa abundância, o que é essencial para o diagnóstico precoce e preciso de doenças (Son *et al.*, 2024).

A capacidade da MS de mapear e perfilar quimicamente doenças a nível molecular também tem potencial para transformar a medicina de precisão, melhorando o diagnóstico, monitoramento e tratamento de doenças (Hu *et al.*, 2021).

Figura 3: Esquema da espectrometria de massa de amostras líquidas



Sequência da espectrometria de massa (MS) acoplada à cromatografia líquida (LC)-LC/MS, para análise proteômica. CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Fonte: Figura reproduzida e traduzida de May *et al.*, 2011 (pág.8).

Lima e colaboradores (2021), fizeram uma revisão sistemática mostrando o papel crescente da metabolômica por espectrometria de massa na identificação de biomarcadores urinários e séricos de câncer de próstata. (Tab1)

Tabela 1: Identificação de biomarcadores urinários e séricos de câncer de próstata

Categoria	Exemplos
Metabólitos urinários	Sarcosina, citrato, poliaminas
Metabólitos plasmáticos	Lipídios, ácidos graxos, 2HG
Proteínas Prostasina	AMACR, Annexina A3
Compostos voláteis	Aldeídos, cetonas (urina e ar)

Figura 4: Espectrômetro de massa de alta resolução (LC-MS/MS).



Espectrômetro de massa (*Agilent, 6520B Q-TOF*) acoplado `a CLAE (*Agilent Infinity 1260*) Foto do autor. LC-MS/MS – Tandem Liquid Chromatography - Mass Spectrometry; Q-TOF –Quadrupolo-Time of Flight; CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

2.3 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR - Fourier Transformed infrared)

A espetroscopia vibracional compreende técnicas ópticas específicas, como a de infravermelho (IV) e a espetroscopia Raman. Essas técnicas analisam as vibrações e rotações intramoleculares da amostra quando irradiada com luz, e podem ser aplicadas a amostras químicas, físicas e biológicas. A espetroscopia de infravermelho (IV) é definida em termos gerais como o estudo das características de absorção que resultam do movimento das ligações moleculares pela interação luz- matéria.

A luz infravermelha faz com que uma molécula entre num estado vibracional mais elevado devido à transferência de energia em determinados comprimentos de onda, resultando em picos (ou bandas) que podem ser interpretados qualitativamente

(posição do pico) e quantitativamente (intensidade/área do pico, intensidade relativa). Na espetroscopia de IV, as bandas resultam de uma alteração do momento de dipolo elétrico dos átomos das moléculas (Baker *et al.*, 2016).

Assim, uma molécula pode ser vista como um sistema de massas unidas por ligações com propriedades semelhantes a uma mola, que sofrem alterações no comprimento (alongamento) ou no ângulo da ligação (flexão). Algumas ligações podem se estender em fase (alongamento simétrico) ou fora de fase (alongamento assimétrico). Se uma molécula possui átomos terminais diferentes terão proporções variáveis do movimento de alongamento de cada grupo.

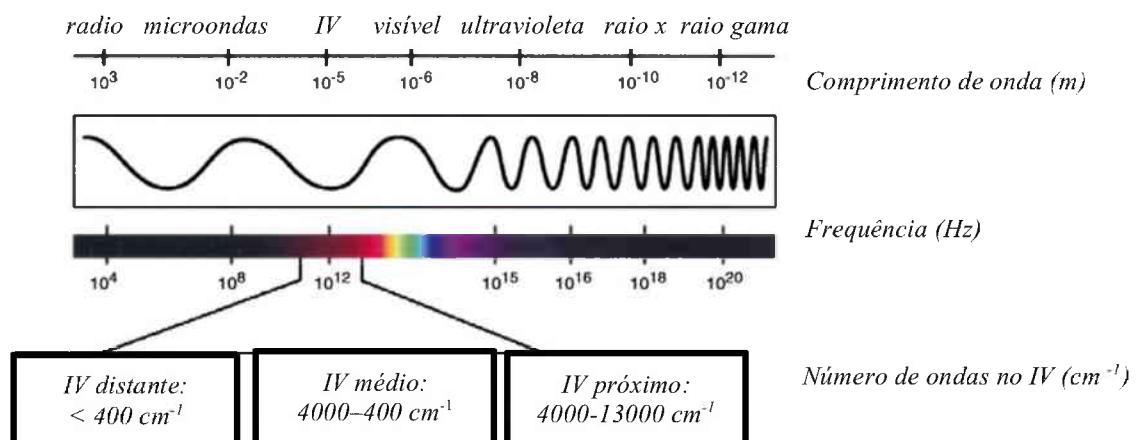
Como resultado, cada molécula produz um conjunto de características espectrais únicas, que as diferencia de todas as outras. O conjunto de características espectrais únicas de uma molécula se estende a um conjunto de moléculas, criando uma “impressão digital” da amostra (Stuart, 2005).

As ondas eletromagnéticas no IV caracterizam-se por maior comprimento de onda e, consequentemente, menor número de ondas, frequência e energia que a luz visível. O número de ondas é mais utilizado como grandeza no espectro IV, que corresponde à faixa entre 10 a 13000 cm⁻¹. Esta região é subdividida em três faixas, em relação à proximidade do espectro da luz visível: IV próximo ou *near infrared* (NIR 13000 – 4000 cm⁻¹), IV médio ou *medium infrared* (MIR 4000 – 400 cm⁻¹) e o IV distante ou *far infrared* (FIR < 400 cm⁻¹) (Stuart, 2005).(Fig.5)

Os espectrofômetros atuais, usados na análise de amostras biológicas, emitem radiação IV na faixa do MIR e possuem o interferômetro de *Michelson*, que substituiu a grade de difração dos antigos espectrofômetros dispersivos (Al-Saeed; Khalil, 2009). Isso permitiu um aumento no limite de detecção das vibrações, melhora da relação sinal/ruído e aumento na quantidade e velocidade das análises (várias leituras sucessivas do espectro com registro do valor médio). (Fig.5)

A transformada de Fourier é o cálculo matemático que faz um somatório de ondas sinusoidais de frequências diferentes, que acontece com o uso do interferômetro. Os componentes básicos para uso de FTIR são fonte de radiação IV, laser de referência, interferômetro, detector (dependem da região do espectro IV do aparelho) e processador (computador) (Stuart, 2005).

Figura 5: Regiões do campo eletromagnético

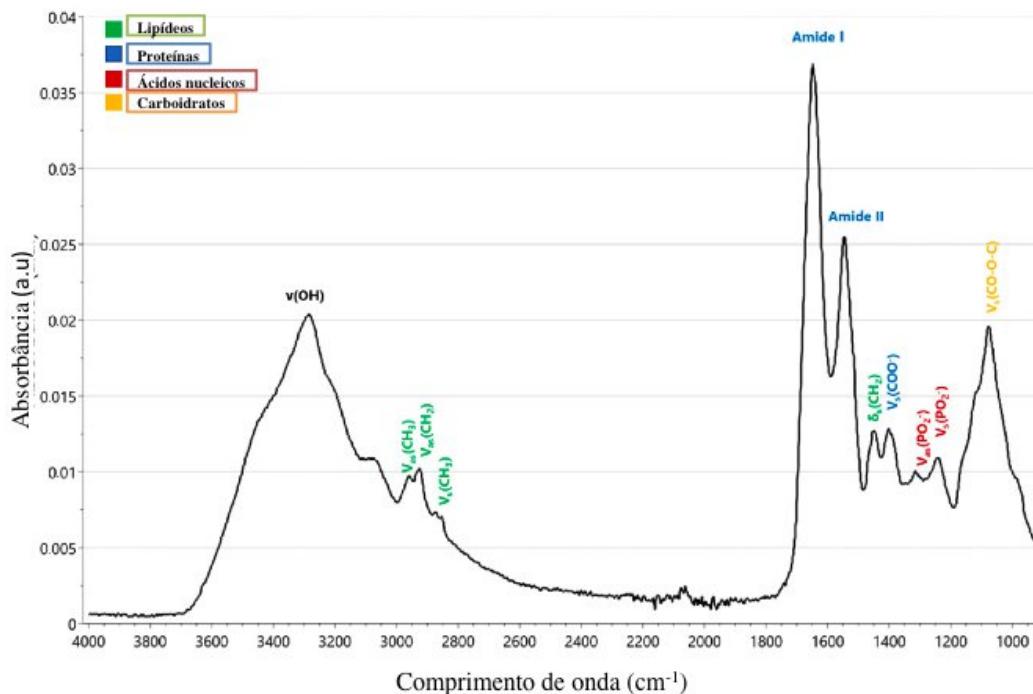


Esquema mostrando as diversas regiões do campo eletromagnético, com destaque para a região do infravermelho abaixo na figura. Fonte: Figura adaptada e traduzida de Noreen *et al.*, 2012 (pág. 1440).

A análise qualitativa e quantitativa de amostras biológicas é realizada na faixa do IV médio (MIR), onde ocorrem as vibrações das principais espécies moleculares que compõe tais amostras. Nesta faixa do IV médio, ainda temos quatro regiões onde as principais macromoléculas absorvem IV: estiramento das ligações simples -CH₂, -CH₃ dos ácidos graxos e proteínas (3050 – 2800 cm⁻¹); tripla ligação das nitrilas e carbonilas (2500 – 2000 cm⁻¹); duplas ligações entre carbono, oxigênio (1800-1700 cm⁻¹), dupla ligação carbono oxigênio e ligações nitrogênio/ hidrogênio e carbono/nitrogênio das bandas de proteína amida I e II (1700-1500 cm⁻¹), e as vibrações das ligações de fosfato dos ácidos nucleicos (1225 e 1080 cm⁻¹) e carboidratos (1200-900 cm⁻¹). Bibliotecas de dados de espectros de amostras biológicas tem sido coletadas ao longo dos anos (Baker *et al.*, 2016). (Fig.6)

A escolha do método de análise na espectroscopia FTIR depende principalmente da natureza física da amostra (estado físico, espessura, solubilidade) e da informação a ser coletada, se quantitativa ou qualitativa. Dependendo da modalidade de escolha, a radiação pode sofrer transmissão, transfleção e reflexão total atenuada (ATR - attenuated total reflection) (Stuart, 2005).

Figura 6: Espectro ATR-FTIR .



Traçado típico da região MIR mostrando picos entre 400 – 4000 cm^{-1} e seus principais grupos orgânicos. v: vibrações de alongamento, δ: Vibrações de flexão, s: simétricas, as: assimétricas. Fonte: Figura adaptada e traduzida de Delrue *et al*, 2023 .

No modo de transmissão, a luz IV passa uma única vez pelo substrato e pela amostra. A radiação infravermelha não é transmitida através de vidro, e deve-se utilizar janelas alternativas, o que encarece o processo. Por este motivo, o modo de transflecção tornou-se popular. Nesse método, a amostra (tecido, células ou biofluído) é colocada numa superfície altamente refletiva. O raio infravermelho passa pela amostra, reflete a superfície da lâmina e retorna pela amostra até o detector. Há uma vantagem de aumento da sensibilidade, pois o feixe de infravermelho atravessa a amostra duas vezes.

Os substratos de reflexão são baratos, compostos por uma lâmina de microscópio de vidro revestida com uma cobertura metálica fina, conhecida como slide de baixa emissividade (*low-e slide*). Uma desvantagem desse método é que a superfície refletiva gera um campo elétrico, resultando numa modulação dependente

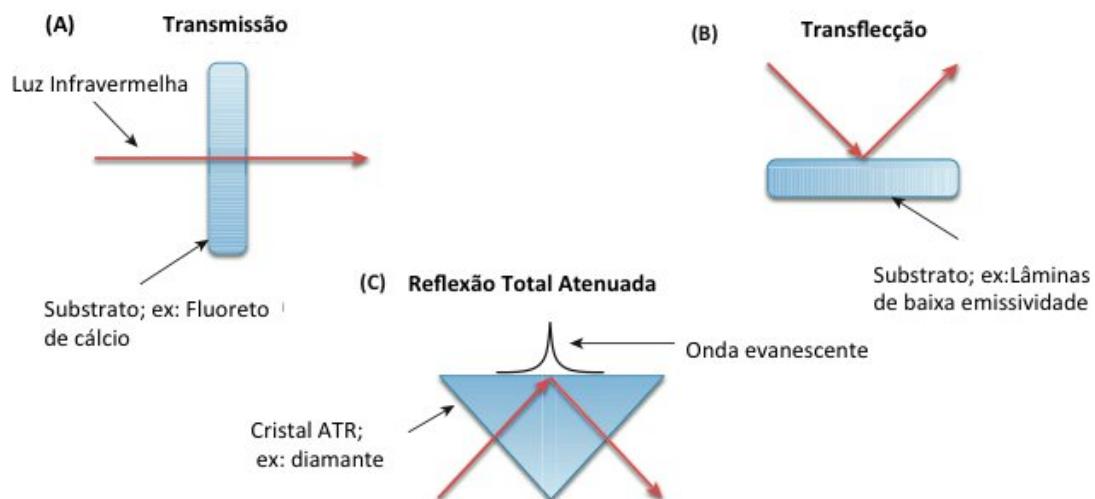
do número de campos elétricos formados acima desta superfície, o que pode levar a intensidades de absorção que variam não linearmente com a espessura, gerando interpretações espectrais não confiáveis (Bassan *et al.*, 2013).

No modo de Reflexão Total Atenuada (ATR), o feixe infravermelho passa por um cristal transparente de alto índice de refração (conhecido como elemento de reflexão interno - ERI). A luz entra no cristal do lado esquerdo e se propaga através da reflexão total ao longo do cristal. Em cada reflexão total, uma onda evanescente é gerada e penetra a amostra na superfície do cristal. A luz de saída do lado direito é então atenuada de acordo com a absorbância da amostra em análise (Hans; Muller; Sigrist, 2012). (Fig.7.)

O método ATR-FTIR não requer substratos especiais e exige pouca ou nenhuma preparação da amostra. Também tem a vantagem de analisar biofluidos que podem ser colocados diretamente no cristal de ATR, sendo estes analisados diretamente após processo de secagem (Diessel *et al.*, 2004). As análises por este método são rápidas e simples, sendo apropriado para processos diagnósticos. Já se mostrou uma ferramenta robusta para detecção de insuficiência renal (Khanmohammadi *et al.*, 2013), cânceres de ovário e endometrial (Gajjar *et al.*, 2013) e carcinoma basocelular (Khanmohammadi *et al.*, 2007), pela análise do soro sanguíneo.

A técnica de aprendizado de máquina associado ao FTIR mostrou-se uma ferramenta eficaz, rápida e reproduzível na construção de espectros de assinatura digital de amostras biológicas (Baker *et al.*, 2014). A espectroscopia FTIR associada à aprendizagem de máquina poderá ser uma alternativa interessante e econômica para auxiliar diagnósticos clínicos e/ou triagem pela alta resolução, fácil preparo de amostras e baixos custos de operação demonstrados em alguns estudos (Elmi *et al.*, 2017; Butler *et al.*, 2019).

Figura 7: Métodos de avaliação amostral na espectroscopia FTIR.



Representação esquemática dos três principais modos de amostragem para espectroscopia FTIR. A) transmissão; B) reflexão e C) reflexão total atenuada Fonte: Dorling; Baker, 2013 (p. 328).

Figura 8. Imagem de aparelho ATR-FTIR.



Fonte da imagem: internet Espectrômetro de bancada flexível, Cary 630 FTIR | Agilent[®]. ATR-FTIR: Attenuated Total Reflection - Fourier Transform Infrared.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral:

Identificar e analisar biomarcadores no sangue de pacientes com para diagnóstico de Cap.

3.2. Objetivos Específicos:

- Analisar o perfil metabolômico do soro em pacientes com câncer de próstata, comparando com o de indivíduos saudáveis.
- Identificar assinaturas moleculares na saliva de pacientes com câncer de próstata usando espectroscopia ATR-FTIR, comparando com o de indivíduos controle.
- Avaliar o potencial diagnóstico dos metabólitos na diferenciação entre pacientes câncer de próstata e indivíduos saudáveis, utilizando metabolômicos e modelos estatísticos supervisionados e não supervisionados.
- Avaliar o potencial diagnóstico das assinaturas moleculares de pacientes com câncer de próstata, com auxílio de inteligência artificial e aprendizagem de máquina.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Aspectos Éticos e Biossegurança

Neste estudo todos os métodos foram realizados seguindo as diretrizes éticas relevantes e de acordo com a Declaração de Helsinki (Associação Médica Mundial, 1964) e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) sob o Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) 71108817.2.0000.5152, e parecer número 3.533.461 aprovado em 19 de agosto de 2019. Todos os participantes deste estudo concordaram em participar e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

Todas as amostras usadas para análises metabolômicas foram gerenciadas de acordo com os protocolos de segurança do laboratório de Nanobiotecnologia Professor Doutor Luiz Ricardo Goulart Filho da Universidade Federal de Uberlândia.

4.2. Desenho do Estudo

Estudo clínico, epidemiológico, analítico, observacional, transversal, controlado, de pacientes sendo o grupo 1 com participantes com adenocarcinoma de próstata submetidos a prostatovesiculectomia radical (PTR), o grupo 2 com participantes com no mínimo 30 dias de seguimento pós PTR e PSA total $\leq 0,04$ ng/ml e grupo 3 (controle) constituído por homens sem diagnóstico clínico de Cap com idade >18 e ≤ 50 anos.

4.3. Fonte de Dados

Pacientes foram selecionados no serviço de Urologia da Faculdade de Medicina (FAMED) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) e as análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Nanobiotecnologia Professor Doutor Luiz Ricardo Goulart Filho do Instituto de Génética e Bioquímica da UFU no período de 2018 a 2024.

4.4. Critérios de Inclusão

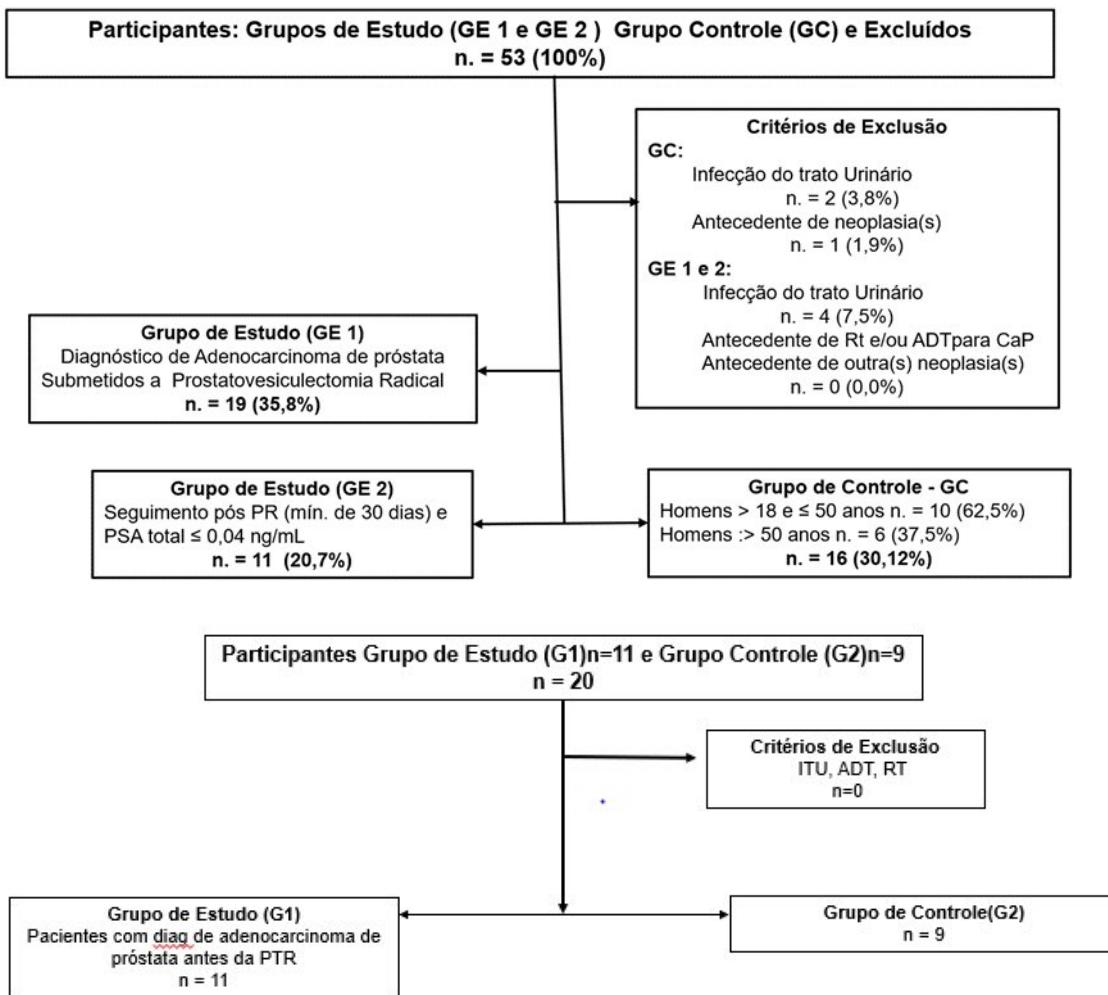
No grupo 1 foram incluídos participantes com diagnóstico de Cap que seriam submetidos a PTR aberta ou videolaparoscópica. O grupo 2 foi constituído por participantes com no mínimo 30 dias de seguimento pós PTR e com PSA total $\leq 0,04$ ng/ml. O grupo controle incluiu homens sem diagnóstico clínico de Cap com, idade >18 e ≤ 50 anos recrutados no período de 2018 a 2024.

4.5. Critérios de Exclusão

Nos grupos 1 e 2 deste estudo foram excluídos participantes com antecedente de até 30 dias de infecção do trato urinário, antecedente de radioterapia e/ou terapia de剥夺 androgênica (ADT) para tratamento de CaP e antecedente de outra(s) neoplasia(s).

No grupo 3 foram excluidos participantes com antecedente de 30 dias de infecção do trato urinário e antecedente de neoplasia(s).

Figura 9: Desenho do estudo Metabolômica exploratória e ATR-FTIR respectivamente



Fluxogramas dos estudos de metabolômica e ATR -FTIR respectivamente

Legenda: n. = número - % = percentagem - Rt = radioterapia - ADT = terapia de privação androgênica - PTR = prostatectomia radical - min. = mínimo - PSA = antígeno prostático específico - ng = nanograma - ml = mililitro

4.6. Coleta de amostra biológica

Nos grupos de estudo e controle foram coletados cerca de 10 ml sangue periférico de cada participante. No grupo 1, as coletas foram realizadas no dia do procedimento cirúrgico, na sala cirúrgica, antes da anestesia com jejum de no mínimo 8 horas.

As coletas dos participantes do grupo 2 e 3 foram realizadas com jejum de 8 horas no Laboratório de Nanobiotecnologia da UFU ou no Hospital de Clínicas (HC) da UFU com início imediato do processamento.

As amostras coletadas no HC da UFU foram enviadas ao Laboratório de Nanobiotecnologia da UFU com intervalo de até 3 horas após a coleta, para processamento. As amostras foram imediatamente centrifugadas e o plasma separado e congelado a menos de 70°C e armazenada em freezer para posterior realização das análises metabolômicas.

Todos os participantes submetidos a tratamentos cirúrgicos tiveram confirmação diagnóstica de câncer de próstata por exame anatomo-patológico das peças cirúrgicas, realizado pelo serviço de patologia do HC FAMED UFU.

4.7. Variáveis

Os dados foram agrupados em: dados demográficos (idade, sexo, raça); dados clínicos: história familiar de Cap avaliação clínica de infecção do trato urinário, antecedentes de neoplasia; toque retal e estadiamento clínico (cT); exames laboratoriais: pré operatório, PSA livre e total e densidade do PSA (DPSA), PSA total no seguimento (mínimo de 30 dias) pós prostatectomia radical; exames de imagem: ultrassonografia (US) trans abdominal ou trans retal de próstata; exames anátomo patológico das biópsias de próstata e das peças cirúrgicas e metabolômica exploratória.

4.8. ATR - FTIR

- Espectroscopia ATR-FTIR e processamento dos dados espectrais

Os dados espectrais do soro foram obtidos utilizando o Espectrômetro FTIR Agilent Cary 630, operando no modo de micro reflexão total atenuada (ATR), abrangendo a faixa de número de onda de 4000 a 650 cm⁻¹. A aquisição espectral foi realizada com resolução de 2 cm⁻¹, sendo cada espectro resultante da média de 32 varreduras coaditivas por amostra. A etapa pré-analítica de preparo das amostras consistiu na homogeneização do soro em microtubos por meio de vórtex durante 2 minutos. Em seguida, alíquotas de 30 µl de cada amostra foram transferidas para um substrato de alumínio, que apresenta vantagens de sustentabilidade e baixo custo, viabilizando análises em alto rendimento. As amostras foram então secas em chapa aquecida a 80°C por 15 minutos. A aquisição espectral foi realizada em temperatura ambiente (22–23°C), utilizando espectros do ar como fundo. Cada amostra foi analisada em triplicata para garantir a reproduzibilidade dos dados.

O processamento dos espectros foi realizado no software Orange 3.3.5 (Bioinformatics Lab da Universidade de Ljubljana, Eslovênia). Para obtenção da média, os espectros foram normalizados e a linha de base foi corrigida pelo método Rubberband, visando evitar erros na preparação e análise espectral das amostras. Para o cálculo do espectro médio, foi utilizada a região de 3700 a 800 cm⁻¹ do espectro original.

4.9. Análise Multivariada

Os dados espectrais foram truncados para abranger a região lipídica (3050–2800 cm⁻¹) e a região de impressão digital (1800–900 cm⁻¹), que serviram como entrada para a análise de componentes principais (PCA). A PCA foi empregada como análise exploratória inicial dos dados espectrais, com componentes principais construídos a partir dos escores (representando desvios de orientação da amostra) e dos loadings (indicando variância na direção do número de onda). Esta técnica não supervisionada reduz, de forma eficaz, a dimensionalidade e extrai as principais características ao projetar cada modo vibracional em uma subárea definida pelos componentes principais, preservando a maior parte da variação significativa dos dados.

4.10. Análise preditiva com algoritmos de aprendizado de máquina

Para a análise por aprendizado de máquina, foi empregado o software Orange Data Mining 3.35. Os dados espectrais utilizados foram truncados utilizando a região lipídica (3050–2800 cm⁻¹) associada à região de impressão digital (1800–900 cm⁻¹). A análise espectral do infravermelho foi dividida em duas etapas: pré-processamento e classificação. O pré-processamento consistiu em agregação, seleção de atributos e transformação de dados. Foram considerados os seguintes métodos de seleção de atributos: Dados brutos, Suavização Gaussiana + Normalização Min-Max, Suavização Gaussiana + Redução de Ruído PCA + Normalização Min-Max, e Filtro Derivada de Savitzky-Golay + Normalização Min-Max + Redução de Ruído MNF. Foram avaliados os desempenhos preditivos dos modelos algorítmicos: Redes Neurais Artificiais, AdaBoost, Random Forest e Máquina de Vetores de Suporte (SVM). O método leave one out foi adotado.

4.11. Metabolômica - (CL – MS)

- Análise metabolômica

Para extração de metabólitos, foram aliquotados 100 µL de soro de cada amostra e adicionou-se 1000 µL de metanol grau espectroscópico (grau HPLC) e o material foi homogeneizada em vórtex por 5 min. O material foi centrifugado por 15 min à 13000 g e o sobrenadante transferido para outro microtubo o qual foi submetido a concentrador a vácuo por 30 min. O material foi ressuspensionado em 400 µL de metanol, homogeneizado por 10 minutos em vórtex e filtrado em filtro de 0,22 micrometros.

As análises foram realizadas usando cromatografia líquida e espectrometria de massa (CLAE/EM), em um CLAE de alta eficiência (marca Agilent™ modelo Infinity 1260) hifenoado ao espectrômetro de massas (MS) de alta resolução do tipo Q-TOF da marca Agilent® modelo 6520 B com fonte de ionização por electrospray (IES) (CLAE/MS - Q-TOF - IES).

Os parâmetros cromatográficos foram: coluna Agilent modelo Poroshell, 3mm de diâmetro interno, 10 cm de comprimento, partículas de 2,7 µm, a fase móvel: água acidificada com ácido fórmico (0,1% v/v-1) (A) e metanol (B), com o gradiente: 10% de B (0 min), 98% de B (0-10 min); 98% de B (10-17 min). Os parâmetros de ionização foram: pressão do nebulizador de 20 psi, gás secante a 8L/min a uma temperatura de 220 °C e no capilar foi aplicado uma energia de 4,5KV.

A identificação dos constituintes foi realizada levando em consideração a massa de alta resolução (considerando o erro com a massa exata menores que 10 ppm), sendo estes dados cruzados com banco de dados e a literatura.

- Análise estatística

Na análise metabolômica o software Mass Hunter Qualitative v. 10.0 foi utilizado para processar os dados brutos. A ferramenta “Molecular feature extraction (MFE)” foi utilizado para extração dos espectros de massa e conversão para extensão .CEF. O software Agilent Mass Profiler Professional (MPP) v. B.13.1.1 foi utilizado para filtrar e alinhar os compostos moleculares extraídos. Os filtros utilizados foram: abundancia absoluta mínima = 5000 contagens; número mínimo de íons permitidos = 2; todas as cargas permitidas.

Os parâmetros de alinhamento foram: tolerância do tempo de retenção de 0,15 min; janela de massa 15 ppm + 2mDa. Os compostos moleculares presentes em 100% de pelo menos um grupo com um coeficiente de variação abaixo de 25% foram retidos para análise posterior de dados.

As análises estatísticas dos dados gerados na análise metabólica foram realizadas com os valores transformados log2. Foi aplicado o filtro de frequência de 100% e, em seguida, foi utilizado o teste T não pareado e o teste Benjamini- Hochberg como um teste de correção múltipla. Foi considerado como significativo o valor de $p < 0.05$ e o fold change igual ou maior que 2.00.

Os metabólitos foram identificados por meio do banco de dados METLIN 2019.

- Análise preditiva com algoritmos de aprendizado de máquina

Os dados foram tratados no Mass Hunter Qualitative v.10, seguido de alinhamento pelo Mass Hunter Profiler Profissional v.13 sendo exportados para extensão .CSV. As análises para construção de algoritmos de Inteligência Artificial foram realizadas usando o software Orange v. 3.38.1. Foram utilizados modelos supervisionados (Logistic Regression, CN2 Rule Induction, Tree, Random Forest, Gradient Boosting, SVM, Naive Bayes, AdaBoost, Neural Network, Stochastic Gradient Descent e Scoring Sheet) para classificação dos grupos.

Os cálculos de sensibilidade especificidade e acurácia foram realizados pela plataforma online MEDCALC.

5 RESULTADO NA FORMA DE ARTIGOS

5.1 Artigo 1. METABOLÔMICA EXPLORATÓRIA E INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL NO DIAGNÓSTICO DO CÂNCER DE PRÓSTATA – PROVA DE CONCEITO

5.2. Artigo 2. ATR - FTIR E INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL NO DIAGNÓSTICO DO CÂNCER DE PRÓSTATA – PROVA DE CONCEITO

ARTIGO 1

METABOLÔMICA EXPLORATÓRIA E INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL NO DIAGNÓSTICO DO CÂNCER DE PRÓSTATA – PROVA DE CONCEITO

EXPLORATORY METABOLOMICS AND ARTIFICIAL INTELLIGENCE IN THE DIAGNOSIS OF PROSTATE CANCER- PROOF OF CONCEPT

Leandro Alves de Oliveira¹, Sebastião Antônio Borba¹, Aline Gomes de Soua³, Hebreia Oliveira Almeida Souza², Mario Machado Martins³, Robison Sabino-Silva⁴, Abel Dib Rayashi⁵, Emília Rezende Vaz³, Vivian Alonso Goulart¹, Esther Campos Fernandez³, Luiz Ricardo Goulart Filho^{1*}, Thulio Marquez Cunha^{5**}.

*In memoriam

¹Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia, Minas Gerais, Brasil..

²Programa de Pós Graduação em Genética e Bioquímica, Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.

³Laboratório de Nanobiotecnologia, Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.

⁴Centro de Inovação em Diagnóstico Salivar e Nanobiotecnologia, Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.⁵Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.

** Endereço do autor correspondente:

E-mail: thcunha@yahoo.com.br (TMC)

Resumo

Introdução: o diagnóstico do câncer de próstata enfrenta vários desafios, um dos principais problemas é ausência de um marcador câncer específico e as complicações da biopsia de próstata. Esses desafios destacam a necessidade de ferramentas diagnósticas mais disruptivas e eficazes para melhorar a precisão do diagnóstico .

Objetivo: identificar metabólicos e desenvolver plataforma diagnóstica utilizando metabolômica e inteligência artificial para o diagnóstico de câncer de próstata. **Metodologia:** Foram analisados 46 participantes divididos em 3 grupos: grupo 1 (pacientes com diagnóstico de câncer de próstata n=19) grupo 2 (pós-operatório de prostatectomia radical n=11), grupo 3 (controle n=16) dos quais foram coletadas amostras de sangue. Foi realizado a extração dos metabolitos com metanol, os dados obtidos foram analisados com uma estratégia de metabolômica exploratória e criação de algoritmos pela inteligência para classificação dos grupos. **Resultados:** na metabolômica exploratória foram identificados no total 1.744 metabólitos. Para tratar estes dados foi utilizado filtro de frequência de 100%, análise ANOVA com $p<0,05$ e fold change maior ou igual a 2 e obtive-se 11 metabólitos diferencialmente expressos. Dentre estes resultados com diferenças 2 metabolitos se destacam por estarem ausentes no grupo 1: Pi22 refere-se a um determinado fosfoinosítideo (PI) e C19 Sphingosine-1-phosphate. No emprego da inteligência artificial foi criado algoritmo no modelo de Gradiente Boosting com sensibilidade de 96% e especificidade de 98% e com acurácia de 97% para diagnóstico de câncer de próstata. **Conclusão:** o emprego da metabolômica exploratória encontrou dados promissores para dois metabolitos que estavam ausentes no grupo 1, sendo indicados para estudos futuros como possíveis biomarcadores, também foi possível desenvolver um algoritmo de inteligência artificial com alta sensibilidade, especificidade e acurácia para diagnóstico de câncer de próstata.

Palavras-Chave: Câncer de Próstata; Metabolônica; Inteligência Artificial

Abstract

Introduction: The diagnosis of prostate cancer faces several challenges, one of the main problems being the absence of a specific cancer marker and the complications of prostate biopsy. These challenges highlight the need for more disruptive and effective diagnostic tools to improve diagnostic. **Objective:** To identify metabolites and develop a diagnostic platform using metabolomics and artificial intelligence for the diagnosis of prostate cancer. **Methodology:** Fourty-six participants were analyzed and divided into 3 groups: group 1 (patients diagnosed with prostate cancer n=19) and group 2 (postoperative radical prostatectomy n=11), group 3 (control n=16), from which blood samples were collected. The metabolites were extracted with methanol, ,

the data obtained were analyzed with an exploratory metabolomics strategy and creation of algorithms by artificial intelligence to classify the groups. **Results:** in the exploratory metabolomics, a total of 1,744 metabolites were identified. To process these data, a 100% frequency filter was used, ANOVA analysis with $p<0.05$ and fold change greater than or equal to 2, and 11 differentially expressed metabolites were obtained. Among these results with differences, 2 metabolites stand out for being absent in group 1: Pi22 refers to a certain phosphoinositide (PI) and C19 Sphingosine-1-phosphate. Using artificial intelligence, an algorithm was created in the Gradient Boosting model with 96% sensitivity and 98% specificity and 97% accuracy for the diagnosis of prostate cancer. **Conclusion:** the use of exploratory metabolomics found promising data for two metabolites that were absent in group 1, being indicated for future studies as possible biomarkers. It was also possible to develop an artificial intelligence algorithm with high sensitivity, specificity and accuracy for the diagnosis of prostate cancer.

Keywords: Prostate Cancer; Metabolomics; Artificial Intelligence

1. INTRODUÇÃO.

O câncer de próstata (Cap) é uma das neoplasias malignas mais comuns entre os homens, especialmente em países com alto índice de desenvolvimento humano¹. A detecção global tem aumentado, em parte devido ao uso mais difundido do teste de antígeno prostático específico (PSA) e envelhecimento da população, embora as taxas de mortalidade tenham permanecido relativamente estáveis^{2,3}. Nos Estados Unidos, estima-se que 288.300 novos casos foram diagnosticados em 2023, representando 29% dos novos casos de câncer em homens³.

O diagnóstico geralmente é feito por biópsia da próstata, que é indicada após a detecção de níveis elevados de PSA no sangue e/ou exame digital retal¹. No entanto, o PSA pode resultar em falsos positivos (hiperplasia prostática benigna-HPB, prostatite e infarto prostático) e negativos (tumor de próstata indiferenciado), o que limita sua utilidade clínica como teste isolado². Além disso, a biópsia é um procedimento invasivo com riscos de infecção e sepse¹. A ressonância magnética multiparamétrica (mpMRI) tem mostrado alta sensibilidade para detectar câncer clinicamente significativo e pode reduzir a necessidade de biópsias desnecessárias⁴. Medicina nuclear e novos biomarcadores vem ocupando espaço no diagnóstico.

A metabolômica é uma estratégia diagnóstica que vem sendo estudada e com resultados promissores, vários estudos utilizando a metabolômica exploratória estão em busca de um biomarcador ideal: metabolômica tecidual no Cap⁷, metabólitos energéticos são inversamente associados ao Cap⁸, hiperativação do ciclo do ácido tricarboxílico⁹, via da quinurenina enriquecida no Cap¹⁰ e a sua utilização juntamente com técnicas de IA pode ajudar no diagnóstico de CaP , a IA está sendo cada vez mais aplicada para melhorar a precisão e a eficiência do diagnóstico do câncer de próstata, integrando imagens radiológicas e análises patológicas¹¹

Desta forma nosso objetivo é detectar metabolitos capazes de diagnosticar Cap e desenvolver plataforma diagnóstica com metabolômica e IA para diagnóstico de Cap.

2. Materiais e métodos

2.1. Aspectos Éticos e Biosegurança

Neste estudo todos os métodos foram realizados seguindo as diretrizes éticas relevantes e de acordo com a Declaração de Helsinki (Associação Médica Mundial, 1964) e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) sob o Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) 71108817.2.0000.5152, e parecer número 3.533.461 aprovado em 19 de agosto de 2019. Todos os participantes deste estudo concordaram em participar e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

Todas as amostras usadas para análises metabolômicas foram gerenciadas de acordo com os protocolos de segurança do laboratório de Nanobiotecnologia Professor Doutor Luiz Ricardo Goulart Filho da Universidade Federal de Uberlândia.

2.2. Desenho do estudo.

Estudo clínico, epidemiológico, analítico, observacional, transversal, controlado, de pacientes sendo o grupo de 1 com participantes com Cap submetido a PTR, o grupo 2 com participantes com no mínimo 30 dias de seguimento pós PTR e PSA total $\leq 0,04$ ng/ml e grupo 3 (controle) constituído por homens sem diagnóstico clínico de câncer de próstata com idade >18 e ≤ 50 anos.

2.3. Fonte de dados.

Os pacientes foram selecionados no serviço de Urologia da Faculdade de Medicina (FAMED) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) e as análises laboratorias foram realizadas no Laboratório de Nanobiotecnologia Professor Doutor Luiz Ricardo Goulart Filho da UFU no período de 2018 a 2024.

2.4. Critérios de inclusão

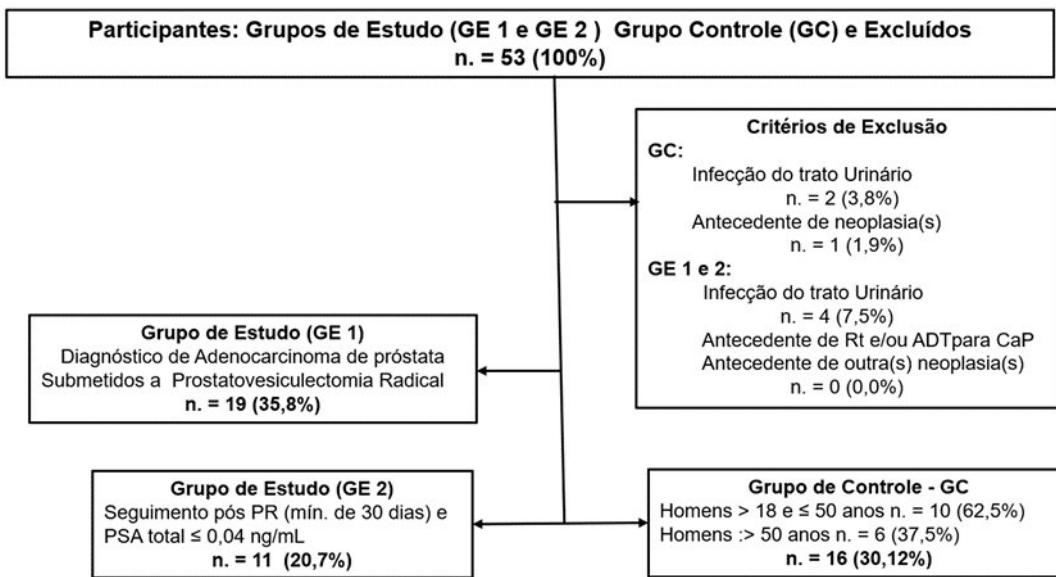
No grupo 1 foram incluídos participantes com diagnóstico de Cap que seriam submetidos a PTR aberta ou videolaparoscópica. O grupo 2 foi constituído por participantes com no mínimo 30 dias de seguimento pós PTR e com PSA total $\leq 0,04$ ng/ml. O grupo controle incluiu homens sem diagnóstico clínico de Cap com idade >18 e ≤ 50 anos recrutados no período de 2018 a 2024.

2.5. Critérios de Exclusão

Nos grupos 1 e 2 deste estudo foram excluídos participantes com antecedente de até 30 dias de infecção do trato urinário, antecedente de radioterapia e/ou terapia de剥夺 androgênica (ADT) para tratamento de CaP e antecedente de outra(s) neoplasia(s).

No grupo 3 foram excluidos participantes com antecedente de 30 dias de infecção do trato urinário e antecedente de neoplasia(s).

Figura 1 - Desenho do estudo



Fonte: os autores

Legenda: n. = número - % = percentagem - Rt = radioterapia - ADT = terapia de deprivação androgênica - PTR = prostatectomia radical - min. = mínimo - PSA = antígeno prostático específico - ng = nanograma - ml = mililitro

2.6. Coleta de amostra biológica

Nos grupos de estudo e controle foram coletados cerca de 10 ml sangue periférico de cada participante. No grupo 1, as coletas foram realizadas no dia do procedimento cirúrgico, na sala cirúrgica, antes da anestesia com jejum de no mínimo 8 horas.

As coletas dos participantes do grupo 2 e 3 foram realizadas com jejum de 8 horas no Laboratório de Nanobiotecnologia da UFU ou no Hospital de Clínicas (HC) da UFU com início imediato do processamento.

As amostras coletadas no HC da UFU foram enviadas ao Laboratório de Nanobiotecnologia da UFU com intervalo de até 3 horas após a coleta, para processamento. As amostras foram imediatamente centrifugadas e o plasma separado e congelado a menos de 70°C e armazenada em freezer para posterior realização das análises metabolômicas.

Todos os participantes submetidos a tratamentos cirúrgicos tiveram confirmação diagnóstica de câncer de próstata por exame anatomo-patológico das peças cirúrgicas, realizado pelo serviço de patologia do HC FAMED UFU.

2.7. Variáveis

Os dados foram agrupados em: dados demográficos (idade, sexo, raça); dados clínicos: história familiar de Cap avaliação clínica de infecção do trato urinário, antecedentes de neoplasia; toque retal e estadiamento clínico (cT); exames laboratoriais: pré operatório, PSA livre e total e densidade do PSA (DPSA), PSA total no seguimento (mínimo de 30 dias) pós prostatectomia radical; exames de imagem: ultrassonografia (US) trans abdominal ou trans retal de próstata; exames anátomo patológico das biópsias de próstata e das peças cirúrgicas e metabolômica exploratória.

2.8. Análise Metabolômica

Para extração dos metabólitos, foram aliquotados 100 µL de soro de cada material e adicionou-se 1000 µL de metanol grau espectroscópico e o material foi homogeneizado a em vórtex por 5 min. O material foi centrifugado por 15 min à 13000 g e o sobrenadante transferido para outro eppendorf o qual foi submetido a concentrador a vácuo por 30 min. O material foi ressuspêndido em 400 µL de metanol, homogeneizado por 10 minutos em vórtex e filtrado em filtro de 0,22 micrometros.

As análises de cromatografia líquida de alta eficiência hifenado ao espectrômetro de massas (CLAE/EM), em um CLAE (marca Agilent™ modelo Infinity 1260) hifenado ao espectrômetro de massas de alta resolução do tipo Q-TOF da marca Agilent® modelo 6520 B com fonte de ionização por electrospray (IES). Os parâmetros cromatográficos foram: coluna Agilent modelo Poroshell, 3mm de diâmetro interno, 10 cm de comprimento, partículas de 2,7 µm, a fase móvel: água acidificada com ácido fórmico (0,1% vv-1) (A) e metanol (B), com o gradiente: 10% de B (0 min), 98% de B (0-10 min); 98% de B (10-17 min). Os parâmetros de ionização foram: pressão do nebulizador de 20 psi, gás secante a 8L/min a uma temperatura de 220 °C e no capilar foi aplicado uma energia de 4,5KV.

A identificação dos constituintes foi realizada levando em consideração a massa de alta resolução (considerando o erro com a massa exata menores que 10 ppm, sendo estes dados cruzados com banco de dados e a literatura).

2.9. Análise estatística

2.9.1. Participantes

Foram comparados os 3 grupos: grupo 3 pacientes controle (n= 16), doentes, em pré-operatório imediato, grupo 1 (n= 19) e grupo 2 em seguimento ambulatorial, já submetidos à PTR com níveis de PSA total menores do que 0,04 ng/dl (n= 11).

Os pacientes do grupo 3 não foram elencados para realizar dosagem de PSA, toque retal ou qualquer outra forma de estratificação de risco, uma vez considerada a invasividade dos exames e custos, assim como os objetivos a que se propõem os nossos ensaios de metabolômica, rastreio de doentes.

Dessa forma, nos grupos 1 e 2 foram comparadas as seguintes variáveis: PSA total, PSA livre, Relação PSA livre/PSA total, Volume prostáticos, estadiamento cirúrgico e classificação ISUP 2014.

As características dos pacientes foram resumidas usando estatísticas descritivas padrão: média e desvio padrão para variáveis contínuas e contagem, porcentagem para variáveis categóricas.

Verificamos a normalidade da frequência de distribuição de variáveis quantitativas pelo teste de Shapiro-Wilk. Para comparação daquelas com distribuição normal, utilizamos o teste t de Welch, devido ao tamanho das amostras serem diferentes e, para aqueles com distribuição não normal, utilizamos o teste não paramétrico de Mann-Whitney.

Para variáveis qualitativas foi utilizado o teste exato de Fisher generalizado devido ao baixo número de frequência de observação em algum dos grupos (< 5) e o modelo de tabulação dos dados ser diferente de tabela 2x2, considerando um nível de significância de 0,05.

2.9.2. Metabolômica plasmática exploratoria no diagnóstico do CaP

O software MassHunter Qualitative v. 10.0 foi utilizado para processar os dados brutos. A ferramenta “Molecular feature extraction (MFE)” foi utilizado para extração dos espectros de massa e conversão para extensão .CEF. O software Agilent Mass Profiler Professional (MPP) v. B.13.1.1 foi utilizado para filtrar e alinhar os compostos moleculares extraídos. Os filtros utilizados foram: abundancia absoluta mínima = 5000 contagens; número mínimo de íons permitidos = 2; todas as cargas permitidas. Os parâmetros de alinhamento foram: tolerância do tempo de retenção de 0,15 min; janela de massa 15 ppm + 2mDa. Os compostos moleculares presentes em 100% de pelo menos um grupo com um coeficiente de variação abaixo de 25% foram retidos

para análise posterior de dados. Os metabólitos foram identificados por meio do banco de dados METLIN (incluídos no MPP)¹².

As análises estatísticas dos dados gerados na análise metabolômica foram realizadas com os valores transformados log2. Aplicou-se o teste T não pareado e o teste Benjamini- Hochberg como um teste de correção múltipla. Foi considerado como significativo o valor de $p < 0.05$ e o fold change igual ou maior que 2.00.

2.9.3. Algorítimo (I.A.)

Análise multivariada

Os dados foram tratados no Mass Hunter Qualitative v.07, seguido de alinhamento dos dados pelo Mass Hunter Profiler Profissional v.13.1 estes dados foram exportados para extensão C.SV. A análises para construção de algoritmos de Inteligência Artificial foram realizadas no software Orange v. 3.38.1, foram utilizados modelos supervisionados (Logistic Regression, CN2 Rule Induction, Tree, Random Forest, Gradient Boosting, SVM, Naive Bayes, AdaBoost, Neural Network, Stochastic Gradient Descent e Scoring Sheet) para classificação dos grupos. Os cálculos de sensibilidade especificidade e acurácia foram realizado pela plataforma online MEDCALC.

3. Resultados

3.1. Participantes

O grupo 3 é mais jovem que os outros grupos.

Quanto ao histórico familiar de neoplasia, demonstrou-se associação ($p= 0,0412$) entre ausência de histórico familiar e neoplasia prostática nos grupos de pacientes doentes e em seguimento em pós-operatório tardio.

Dessa forma, no grupo 1 e grupo 2 foram comparadas as seguintes variáveis: PSA total, PSA livre, Relação PSA livre/PSA total, volume prostáticos, estadiamento cirúrgico e classificação ISUP 2014. (Tab.1)

Tabela 1: Características clínicas dos pacientes.

VARIÁVEIS	GRUPO 1	GRUPO 2	valor de p
n.	19	11	
Idade (anos) Média ± DP	62 ± 8	66 ± 5,8	<0,0001
Cor	b (7 36,8%)	b (4 36,3%)	0.177
b = branco p = pardo n = negro (n. %)	p (11 57,8%)	p (4 36,3%)	
	n (1 5,2%)	n (3 27,2%)	
História familiar de câncer de próstata	s (3 15,7%)	s (5 45,4%)	0.0412
s = sim n = não (n. %)	n (16 84,2%)	n (6 54,5%)	
PSA total (t) ng/mL Média ± DP	8,7 ± 4,9	6,3 ± 1,5	0.2198
PSA livre (l) ng/mL Média ± DP	0,7 ± 0,4	0,6 ± 0,2	0.907
Relação PSA l/t Média ± DP	9.6 ± 3,3	13,3 ± 3,4	0.2577
Estadiamento clínico TNM (n. %)	T1c (8 42,1%)	T1c (11 100%)	0.0003
	T2a (9 47,3%)		
	T2c (2 10,5%)		
Estadiamento cirúrgico TNM (n. %)		T2c (8 72,7%)	0.0683
		T3a (3 27,2%)	
ISUP 2014 (n. %)	1 (8 42,1%)	1 (4 36,3%)	<0.0001
	2 (7 36,8%)	2 (5 45,4%)	
	3 (1 5,2%)	4 (1 9,0%)	
	4 (1 5,2%)	5 (1 9,0%)	
	5 (2 10,5%)		
Ultrassonografia de próstata gramas (g)	25-60 g	30- 70 g	>0,9999

Fonte: os autores

Legenda: PSA = antígeno prostático específico - ≤ = menor ou igual - ng = nanograma - ml = mililitro - t= total - ± = mais ou menos - DP = desvio padrão - Classif. = classificação - CaP = câncer de próstata - L = livre - US = ultrassonografia - g = gramas - Dens. = desnidade - cm³ = centímetros cúbico - ISUP= International Society of Uological Pathology - TNM = tumor, linfonodos metástases.

3.2. Metabolômica (LC-MS) plasmática no câncer de próstata

Foram identificados no total 1744 metabólitos. Utilizamos o filtro de frequência de 100% e obtivemos 16 metabólitos. Fizemos a análise estatística usando ANOVA com p<0.05 e fold change maior ou igual a 2 e obtivemos 11 metabólitos diferencialmente expressos.

Figura 2: Clusterização hierárquica e heatmap

Clustering Grupo 1 x grupo controle x grupo 2

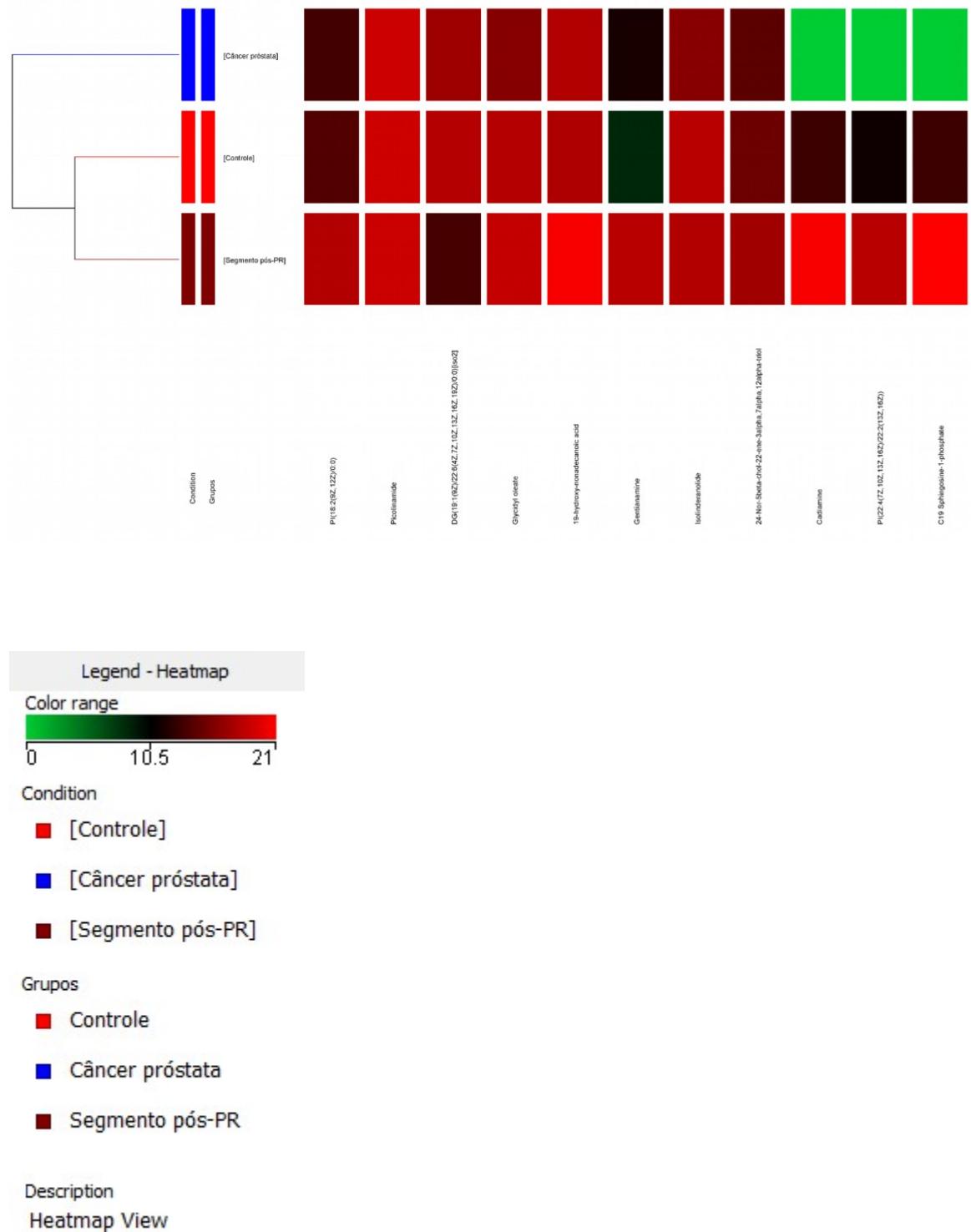
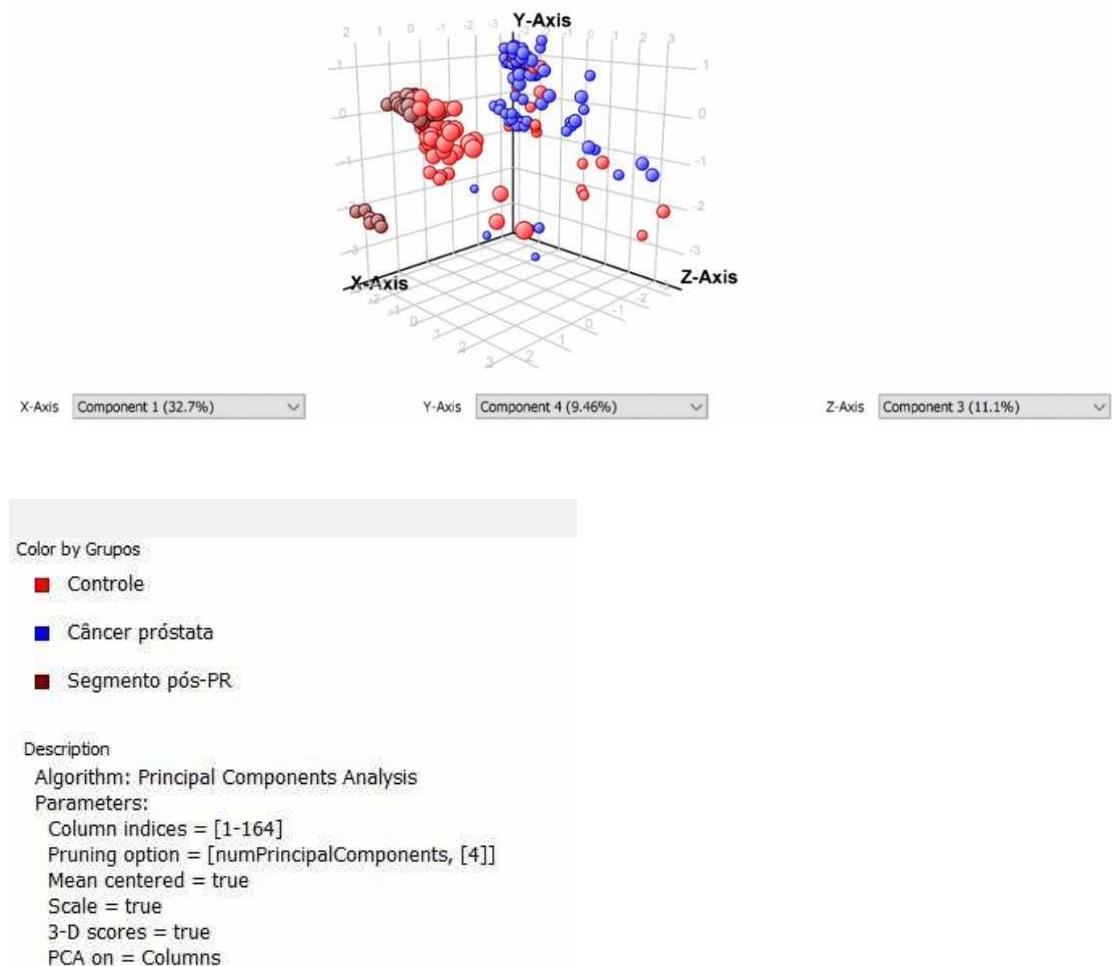


Figura 3: 3D-PCA (variância explicada)



Fonte: os autores

3.2. Inteligência artificial

Para criação de modelos predição supervisionado utilizou se para treinamento a estratégia de cross validation (com fold de 5) os resultados dos três melhores modelos estão apresentados na matriz de confusão (Figura 4) em seguida os valores de sensibilidade, especificidade e acurácia(Figura 5) e as curvas ROC (Figura 6, 7 e 8).

Figura 4: Matriz de confusão (comparando os grupos 1 e controle)

		Predicted		Σ
		Negativo Positivo		
Scoring Sheet	Actual	Negativo	96	4
	Actual	Positivo	5	95
		Σ	101	99
				200
		Predicted		Σ
		Negativo Positivo		
Random Forest	Actual	Negativo	98	2
	Actual	Positivo	4	96
		Σ	102	98
				200
		Predicted		Σ
		Negativo Positivo		
Gradient Boosting	Actual	Negativo	98	2
	Actual	Positivo	4	96
		Σ	102	98
				200

Fonte: os autores

Tabela 2 - Resultado sensibilidade, especificidade e acurácia

	S	E	VPP	VPN	A
Scoring Sheet	95%	96%	95%	95%	95%
Random Forest	96%	98%	98%	96%	97%
Gradient Boosting	96%	98%	98%	96%	97%

Fonte: os autores

Figura 5: Curva ROC para Scoring Sheet. (AUC 99.7%)

Figura 6: Curva ROC para RandomForest (AUC 99,8%)

Figura 7: Curva ROC para Gradient Boosting (AUC 99,8%)

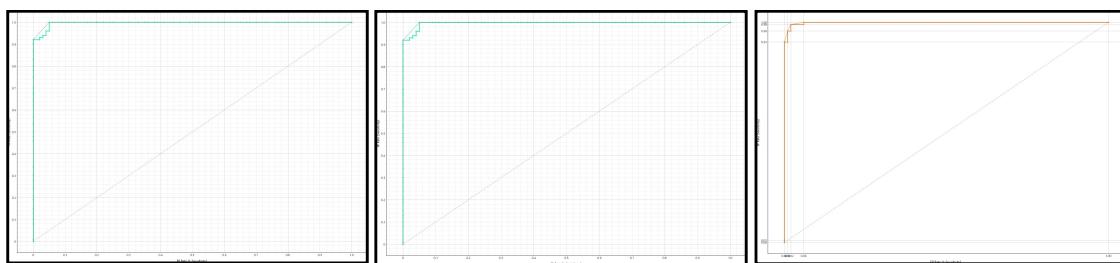


Fig. 5

Fig.6

Fig . 7

4. DISCUSSÃO

Analisando o resultado dos participantes as semelhanças das variáveis (cor, história familiar, PSA e suas derivações) é explicada por se tratar de uma mesma população com amostra oportunista no ambulatório do HC da UFU; a diferença do estadiamento clínico do grupo 1 com o estadiamento cirúrgico do grupo 2 se deve ao fato que na maioria das vezes os casos operados são subestadiados.

A idade jovem do grupo 3 se justifica tendo em vista o viés de seleção de voluntários: pacientes jovens, sem histórico familiar, sem qualquer queixa urinária e fora da faixa etária de maior incidência de câncer prostático.

A dificuldade de rastreio por inacessibilidade do serviço público, a ausência de sintomas nos estágios iniciais do CaP e a falta de informação levam a uma menor detecção da doença na população masculina justificando a ausência de relação de história familiar e diagnóstico.

Com o emprego da nanobiotecnologia com uso da metabolômicas encontramos 11 metabólitos com diferença significante nos 3 grupos estudados.

Na clusterização hierárquica (fig. 2) a expressão de metabólitos foi semelhante nos grupos: grupo 2 e grupo 3; diferenciando do grupo 1. No heatmap (fig. 3) dos 11 metabólitos 2 ficaram ausentes no grupo 1 com expressão muito próximas nos grupos 2 e 3 .

Corroborando com os achados acima no PCA os individuos grupo 2 estão mais proximos do grupo 3 e se distanciam do grupo 1.

Estes 2 metabolitos são: PI(22:4(7Z,10Z,13Z,16Z)/22:2(13Z, 16Z)) refere-se a um determinado fosfoinositídeo (PI), que é uma classe de fosfolipídios encontrados em membranas celulares, particularmente na bicamada fosfolipídica da membrana celular, que desempenha papéis importantes na transdução de sinal, membrana dinâmica e processos celulares; e a esfingosina-1-fosfato é um mediador lipídico crítico envolvido em uma série de processos fisiológicos, incluindo respostas imunológicas, desenvolvimento de vasos sanguíneos e sobrevivência celular. É também um alvo fundamental para intervenções terapêuticas em doenças como esclerose multipla e câncer.

Uma outra abordagem foi a busca de algoritmos de IA utilizando experimento de metabolômicas, entre os modelos utilizados foram escolhidos 3 algoritmos com resultados semelhantes (Scoring Sheet, Random Forest e Gradient Boosting) sendo os 2 últimos com resultados iguais e superiores ao primeiro, com sensibilidade 98%, especificadade 96%, acurácia 98% e área de curva ROC 99,8%.

A ausência de 2 metabólitos no Cap, a criação de uma ferramenta algorítmica, com acurárias próximas de 100% com ampla acessibilidade promoveria uma revolução no diagnóstico do Cap que enfrenta como exposito grandes desafios, abre uma janela para novas pesquisas com n robustos e desenhos de estudos multicêntricos.

5. CONCLUSÃO

O emprego da metabolômica exploratória encontrou dados promissores para 2 metabólitos que estavam ausentes pacientes com Cap, inferindo que essa neoplasia próstata pode diminuir a expressão destes metabolitos, também foi possível desenvolver um algoritmo de inteligência artificial com alta sensibilidade, especificidade e acurácia para realizar a classificação de indivíduos em doentes ou saudáveis.

Referências

1. Rebello, R. J. et al. Prostate Cancer. Nature Reviews. Disease Primers, 7, 1, 9 (2021). doi:10.1038/s41572-020-00243-0.

2. Merriel, S.W. D., Funston, G. & Hamilton, W. Prostate Cancer in Primary Care. *Advances in Therapy*, **35**, 9, 1285-1294 (2018). doi:10.1007/s12325-018-0766-1.
3. Schaeffer, E. M. *et al.* Prostate Cancer, Version 4.2023, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network: JNCCN*, **21**, 10, 1067-1096 (2023). doi:10.6004/jnccn.2023.0050.
4. Ong, X. R. S. *et al.* Understanding the Diagnosis of Prostate Cancer. *The Medical Journal of Australia*, **213**, 9, 424-429 (2020). doi:10.5694/mja2.50820.
5. Eggner, S. E. *et al.* Molecular Biomarkers in Localized Prostate Cancer: ASCO Guideline. *Journal of Clinical Oncology*, **38**, 13, 1474-1494 (2020). doi:10.1200/JCO.19.02768.
6. Falagario, U. G. *et al.* Prostate Cancer Biomarkers: A Practical Review Based on Different Clinical Scenarios. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, **59**, 5, 297-308 (2022). doi:10.1080/10408363.2022.2033161.
7. Lima, A. R. *et al.* Comprehensive Metabolomics and Lipidomics Profiling of Prostate Cancer Tissue Reveals Metabolic Dysregulations Associated With Disease Development. *Journal of Proteome Research*, **21**, 3, 727-739 (2022). doi:10.1021/acs.jproteome.1c00754.
8. Mondul A. M. *et al.* Metabolomic Analysis of Prostate Cancer Risk in a Prospective Cohort: The Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention (ATBC) Study. *International Journal of Cancer*, **137**, 9, 2124-32 (2015). doi:10.1002/ijc.29576.
9. Shao Y. *et al.* Metabolomics and Transcriptomics Profiles Reveal the Dysregulation of the Tricarboxylic Acid Cycle and Related Mechanisms in Prostate Cancer. *International Journal of Cancer*, **143**, 2, 396-407 (2018). doi:10.1002/ijc.31313.

10. Khan A. et al Noninvasive Serum Metabolomic Profiling Reveals Elevated Kynurenone Pathway's Metabolites in Humans With Prostate Cancer. *Journal of Proteome Research.* **18**, 4, 1532-1541 (2019). doi:10.1021/acs.jproteome.8b00803.
11. Saha A. et al. Artificial Intelligence and Radiologists in Prostate Cancer Detection on MRI (PI-CAI): An International, Paired, Non-Inferiority, Confirmatory Study. *The Lancet. Oncology.* **25**, 7, 879-887 (2024). doi:10.1016/S1470-2045(24)00220-1.
12. GIERA, M. et al. XCMS-METLIN: data-driven metabolite, lipid, and chemical analysis *Mol Syst Biol.*, **20**, 1153 – 1155 (2024). <https://doi.org/10.1038/s44320-024-00063-4>

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

ARTIGO 2

ATR - FTIR E INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL NO DIAGNÓSTICO DO CÂNCER DE PRÓSTATA- PROVA CONCEITO

ATR - FTIR AND ARTIFICIAL INTELLIGENCE IN THE DIAGNOSIS OF PROSTATE CANCER – PROOF OF CONCEPT

Leandro Alves de Oliveira¹, Sebastião Antônio Borba¹, Aline Gomes de Soua³, Hebreia Oliveira Almeida Souza², Mario Machado Martins³, Robison Sabino-Silva⁴, Abel Dib Rayashi⁵, Emília Rezende Vaz³, Vivian Alonso Goulart¹, Esther Campos Fernandez³, Luiz Ricardo Goulart Filho^{1*}, Thulio Marquez Cunha^{5**}.

*In memoriam

¹Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia, Minas Gerais, Brasil..

²Programa de Pós Graduação em Genética e Bioquímica, Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.

³Laboratório de Nanobiotecnologia, Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.

⁴Centro de Inovação em Diagnóstico Salivar e Nanobiotecnologia, Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.⁵Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.

** Endereço do autor correspondente:

E-mail: thcunha@yahoo.com.br (TMC)

Resumo

Introdução: o diagnóstico do câncer de próstata enfrenta vários desafios, um dos principais problemas é ausência de um marcador câncer específico e as complicações

da biopsia de próstata. Esses desafios destacam a necessidade de ferramentas diagnósticas mais disruptivas e eficazes para melhorar a precisão do diagnóstico. **Objetivo:** desenvolver, caracterizar novos modelos diagnósticos utilizando ATR-FTIR e inteligência. **Metodologia:** Foram analisados 20 participantes divididos em 2 grupos: grupo 1 (pacientes com diagnóstico de câncer de próstata n=11), grupo 2 (controle n=9), dos quais foram coletadas amostras de sangue. Os dados espectrais foram obtidos utilizando o Espectrômetro FTIR Agilent Cary 630 no modo de refletância total microatenuada (ATR), abrangendo uma faixa de números de onda de 4000 a 650 cm⁻¹. Para Análise Preditiva por Algoritmos de Aprendizado de Máquina, utilizou-se o software Orange Data Mining 3.35. Lá, os dados espectrais utilizados foram truncados usando a região lipídica (3050 - 2800 cm⁻¹) associada à região da impressão digital (1800 - 900 cm⁻¹). **Resultados:** foi demonstrado diferenças significativas entre os espectros plasmáticos de pacientes grupo1 e grupo 2. Dois componentes principais, PC1 e PC2, foram responsáveis por 64% da variância cumulativa, com PC1 explicando 50% e PC2 explicando 14%. Empregando ferramentas de inteligência artificial (IA), os resultados demonstraram que o algoritmo de Rede Neural proporcionou a discriminação mais eficaz entre pacientes dos 2 grupos. Essa abordagem de pré-processamento produziu sensibilidade de 100%, especificidade de 100% e precisão de 100% na diferenciação entre os grupos. **Conclusão:** com o emprego da ATR -FTIR foi possível desenvolver um algoritmo de inteligência artificial com alta sensibilidade, especificidade e acurácia para diagnóstico de câncer de próstata.

Palavras-Chave: Câncer de Próstata; ATR-FTIR; Inteligência Artificial

Abstract

Introduction: Prostate cancer diagnosis faces several challenges, one of the main problems being the absence of a specific cancer marker and the complications of prostate biopsy. These challenges highlight the need for more disruptive and effective diagnostic. **Objective:** To develop and characterize new diagnostic models using ATR-FTIR and intelligence. **Methodology:** Twenty participants were analyzed and divided into 2 groups: group 1 (patients diagnosed with prostate cancer n=11), group 2 (control n=9), from which blood samples were collected. Blood spectral data were obtained using the Agilent Cary 630 FTIR Spectrometer in microattenuated total reflectance

(ATR) mode, covering a wavenumber range from 4000 to 650 cm⁻¹. **Results:** The truncated spectra, including the lipid region (3050–2800 cm⁻¹) and the fingerprint region (1800–900 cm⁻¹), revealed significant differences between the plasma spectra of patients in group 1 and group 2. Two principal components, PC1 and PC2, accounted for 64% of the cumulative variance, with PC1 explaining 50% and PC2 explaining 14%. Using artificial intelligence (AI) tools, the results demonstrated that the Neural Network algorithm provided the most effective discrimination between patients in the 2 groups. This preprocessing approach produced 100% sensitivity, 100% specificity, and 100% accuracy in differentiating between the groups. **Conclusion:** with the use of ATR-FTIR it was possible to develop an artificial intelligence algorithm with high sensitivity, specificity and accuracy for the diagnosis of prostate cancer

Keywords: Prostate Cance, ATR-FTIR; Artificial Intelligence

1. INTRODUÇÃO

O câncer de próstata (Cap) é uma das neoplasias malignas mais comuns entre os homens, especialmente em países com alto índice de desenvolvimento humano¹. A detecção global tem aumentado, em parte devido ao uso mais difundido do teste de antígeno prostático específico (PSA) e envelhecimento da população, embora as taxas de mortalidade tenham permanecido relativamente estáveis^{2,3}. Nos Estados Unidos, estima-se que 288.300 novos casos foram diagnosticados em 2023, representando 29% dos novos casos de câncer em homens³.

O diagnóstico geralmente é feito por biópsia da próstata, que é indicada após a detecção de níveis elevados de PSA no sangue e/ou exame digital retal¹. No entanto, o PSA não é um teste perfeito, pois pode resultar em falsos positivos (hiperplasia prostática benigna-HPB, prostatite e infarto prostático) e negativos (tumor de próstata indiferenciado), o que limita sua utilidade clínica como teste isolado², além disso, a biópsia é um procedimento invasivo com riscos de infecção e sepse¹. A ressonância magnética multiparamétrica (mpMRI) tem mostrado alta sensibilidade para detectar câncer clinicamente significativo e pode reduzir a necessidade de biópsias desnecessárias⁴.

A ATR-FTIR em câncer de próstata está centrada principalmente em pesquisa translacional, com foco em diferenciação de tecidos prostáticos normais e neoplásicos, análise de biofluidos (como soro e ar exalado) e identificação de

marcadores espectroscópicos associados à presença e agressividade tumoral. A tecnologia ATR-FTIR permite análise não destrutiva, rápida e sem necessidade de reagentes, características desejáveis para métodos diagnósticos inovadores. O objetivo do estudo foi aplicar ATR-FTIR e desenvolver um algoritmo de IA em pacientes com CaP, para criação de um novo modelo no diagnóstico dessa neoplasia com disponibilidade, rapidez, boa acurácia e baixo custo.

2. Materiais e métodos

2.1. Aspectos Éticos e Biosegurança

Neste estudo todos os métodos foram realizados seguindo as diretrizes éticas relevantes e de acordo com a Declaração de Helsinki²⁰ e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) sob o Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) 71108817.2.0000.5152, e parecer número 3.533.461 aprovado em 19 de agosto de 2019. Todos os participantes deste estudo concordaram em participar e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

Todas as amostras usadas para análises foram gerenciadas de acordo com os protocolos de segurança do laboratório de Nanobiotecnologia Professor Doutor Luiz Ricardo Goulart Filho do Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia.

2.2. Desenho do estudo.

Estudo clínico, epidemiológico, analítico, observacional, transversal, controlado, de pacientes sendo o grupo de 1 com participantes com adenocarcinoma de próstata submetidos (PTR), o grupo 2 (controle) constituído por homens sem diagnóstico clínico de câncer de próstata com idade >18 e ≤50 anos.

2.3. Fonte de dados.

Pacientes foram selecionados no serviço de Urologia da Faculdade de Medicina (FAMED) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) e análises laboratoriais realizadas no Laboratório de Nanobiotecnologia Professor Doutor Luiz Ricardo Goulart Filho do Instituto de Genética e Bioquímica da UFU no período de 2018 a 2024.

2.4. Critérios de inclusão

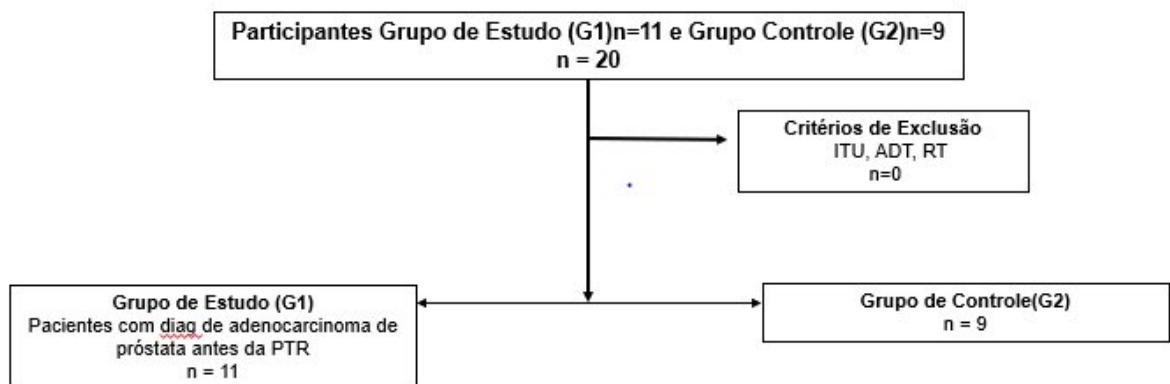
No grupo 1 foram incluídos participantes com diagnóstico de Cap que seriam submetidos a PTR aberta ou videolaparoscópica. O grupo 2 incluiu homens sem diagnóstico clínico de câncer de próstata com, idade >18 e ≤ 50 anos recrutados no período de 2018 a 2024.

2.5. Critérios de Exclusão

Nos grupo 1 deste estudo foram excluídos participantes sem antecedentes de até 30 dias de infecção do trato urinário, antecedente de radioterapia e/ou terapia de剥夺 androgênica (ADT) para tratamento de CaP e antecedente de outra(s) neoplasia(s).

No grupo 2 foram excluidos participantes com antecedente de 30 dias de infecção do trato urinário e antecedente de neoplasia(s).

Figura 1: Desenho do estudo



Fonte: os autores

Legenda: n. = número - % = percentagem - Rt = radioterapia - ADT = terapia de剥夺 androgênica - PTR = prostatectomia radical - min. = mínimo - PSA = antígeno prostático específico - ng = nanograma - ml = mililitro – ITU = infecção do trato urinário.

2.6. Coleta de amostra biológica

Nos grupos de estudo e controle foram coletados cerca de 10 ml sangue periférico de cada participante. No grupo 1, as coletas foram realizadas no dia do procedimento cirúrgico, na sala cirúrgica, antes da anestesia com jejum de no mínimo 8 horas.

As coletas dos participantes do grupo 2 foi realizada com jejum de 8 horas no Laboratório de Nanobiotecnologia do Instituto de Genética e Bioquímica da UFU ou no Hospital de Clínicas (HC) da UFU com início imediato do processamento.

As coletas dos participantes do grupo 2 foram realizadas com jejum de 8 horas no Laboratório de Nanobiotecnologia do Instituto de Genética e Bioquímica da UFU ou no Hospital de Clínicas (HC) da UFU com início imediato do processamento.

As amostras coletadas no HC da UFU foram enviadas ao Laboratório de Nanobiotecnologia da UFU com intervalo de até 3 horas após a coleta, para processamento.

Todos os participantes submetidos a tratamentos cirúrgicos tiveram confirmação diagnóstica de câncer de próstata por exame anatomapatológico das peças cirúrgicas, realizado pelo serviço de patologia do HC FAMED UFU.

2.7. Variáveis

Os dados foram agrupados em: dados demográficos (idade, sexo, raça); dados clínicos: história familiar de Cap avaliação clínica de infecção do trato urinário, antecedentes de neoplasia; toque retal e estadiamento clínico (cT); exames laboratoriais: pré operatório, antígeno prostático específico (PSA) livre e total e densidade do PSA (DPSA), PSA total no seguimento (mínimo de 30 dias) pós prostatectomia radical; exames de imagem: ultrassonografia (US) trans abdominal ou trans retal de próstata; exames anátomo patológico das biópsias de próstata e das peças cirúrgicas e metabolômica exploratória.

2.8. Metodologia

Espectroscopia ATR-FTIR, processamento de dados espectrais

Os dados espectrais foram obtidos utilizando o Espectrômetro FTIR Agilent Cary 630 no modo de refletância total microatenuada (ATR), abrangendo uma faixa de números de onda de 4000 a 650 cm⁻¹. A aquisição espectral foi realizada com uma resolução de 2 cm⁻¹, com cada espectro representando uma média de 32 varreduras coaditivas por amostra. A preparação pré-analítica da amostra envolveu a homogeneização das amostras de sangue em tubos. Posteriormente, alíquotas de 30 µl de cada amostra foram transferidas para um substrato à base de alumínio, que é sustentável e econômico, para permitir análises de alto rendimento. As amostras

foram secas em uma placa quente ajustada a 80 °C por 15 minutos. A aquisição espectral foi conduzida em temperaturas ambientes de 22–23 °C, com espectros de ar servindo como base. Cada amostra foi analisada em duplicata para garantir a reproduibilidade dos dados.

Os espectros foram processados utilizando o software Orange 3.3.5 (Laboratório de Bioinformática da Universidade de Liubliana, Eslovênia). Para a geração da média, os espectros foram normalizados e a linha de base foi corrigida pelo método Rubberband para evitar erros durante a preparação da amostra e a análise dos espectros. Nesse caso, a região de 3700 a 800 cm⁻¹ do espectro original foi utilizada para os espectros médios.

Análise multivariada

Os dados espetrais foram truncados para incluir a região lipídica (3050 - 2800 cm⁻¹) e a região da impressão digital (1800 - 900 cm⁻¹) para entrada na análise de componentes principais (PCA). PCA foi empregada para a análise exploratória inicial dos dados espetrais, com componentes principais construídos usando pontuações (representando desvios na orientação da amostra) e cargas (indicando a variância na direção do número de onda). Essa técnica não supervisionada reduz efetivamente a dimensionalidade e extrai características-chave, projetando cada modo vibracional em um subespaço definido pelos componentes principais, retendo assim a variação significativa dos dados.

Análise Preditiva por Algoritmos de Aprendizado de Máquina

Para a análise por aprendizado de máquina, utilizou-se o software Orange Data Mining 3.35. Lá, os dados espetrais utilizados foram truncados usando a região lipídica (3050 - 2800 cm⁻¹) associada à região da impressão digital (1800 - 900 cm⁻¹). A análise de dados espetrais de infravermelho foi dividida em duas etapas: pré-processamento e classificação. O pré-processamento consistiu em agregação, seleção de atributos e transformação de dados. O pré-processamento considera um método de seleção de atributos como dados brutos, suavização gaussiana + normalização mín-máx, suavização gaussiana + redução de ruído PCA + normalização mín-máx e derivada de filtro Savitzky-Golay + normalização mín-máx + redução de ruído MNF. Para analisar o desempenho preditivo dos modelos de

algoritmo, foram utilizados os algoritmos Redes Neurais Artificiais, AdaBoost, Floresta Aleatória e Máquina de Vetores de Suporte (SVM); foi utilizado o método leave one out.

3.0 Resultados

3.1. Participantes

A análise estatística comparando os grupos de pacientes saudáveis e doentes revelou diferenças significativas tanto na idade quanto nos níveis de PSA. Os pacientes doentes apresentaram idade média significativamente maior em comparação aos saudáveis com uma diferença estatisticamente significativa. Da mesma forma, os níveis de PSA foram consideravelmente mais elevados no grupo 1 (média de 7,95) em relação ao grupo 2 (média de 0,69), também com significância estatística robusta ($p \approx 5,09 \times 10^{-5}$). Esses resultados indicam que tanto a idade quanto os níveis de PSA estão fortemente associados à condição clínica dos pacientes, sugerindo seu potencial valor como indicadores diagnósticos ou preditivos em contextos de triagem e monitoramento de doenças prostáticas.

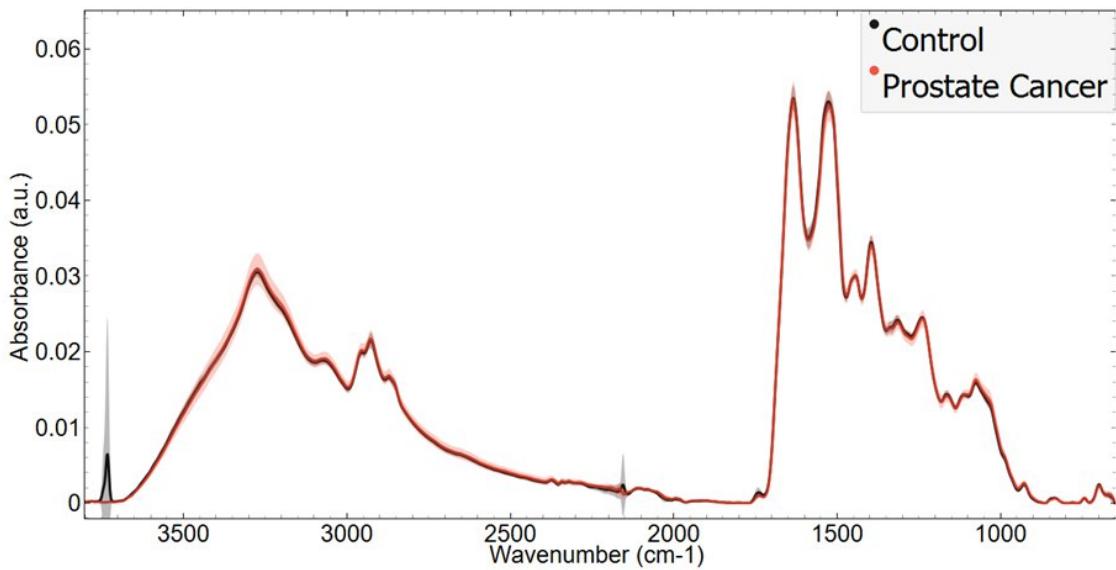
Tabela 1: características clínicas dos pacientes

variáveis	doente	controle	p
n	11	9	
Idade (anos) Média ± DP	62 ± 8	27 ± 5	$p \approx 3,02 \times 10^{-3}$
PSA total (t) ng/mL Média ± DP	7,95 ± 4,9	0,69 ± 0,5	$p \approx 5,09 \times 10^{-5}$

3.2. Dados FTIR

Perfil infravermelho plasmático. O espectro infravermelho original médio do plasma na região da impressão digital ($3700 - 800 \text{ cm}^{-1}$) coletado de pacientes grupo 1 e grupo 2 indica uma superposição de componentes plasmáticos como proteínas, lipídios, DNA/RNA e carboidratos (Fig. 1).

Figura 1: Média representativa com o respectivo desvio padrão dos espectros de ATR-FTIR ($3700-900 \text{ cm}^{-1}$) do plasma de pacientes do grupo 1 e grupo 2.

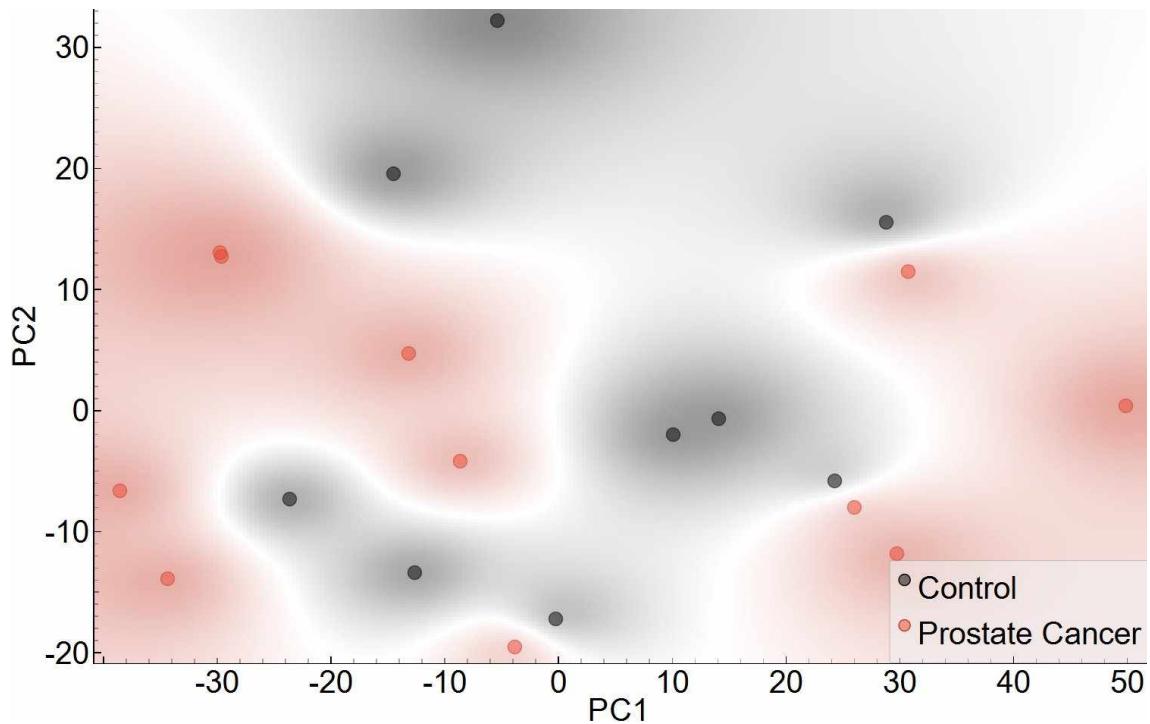


Fonte: O autores

Subsequentemente, a Análise de Componentes Principais (ACP) foi empregada para reduzir a dimensionalidade, comparando as alterações espectrais no infravermelho em pacientes grupo 1 e grupo 2, com foco nos espectros truncados, incluindo a região lipídica ($3050\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$) e a região da impressão digital ($1800\text{--}900\text{ cm}^{-1}$).

Esses espectros revelaram diferenças significativas entre os espectros plasmáticos de pacientes grupo 1 e grupo 2. Dois componentes principais, PC1 e PC2, foram responsáveis por 64% da variância cumulativa, com PC1 explicando 50% e PC2 explicando 14% (Fig. 2).

Figura 2: Gráfico de pontuação da Análise de Componentes Principais para PC1 vs. PC2 (A) e cargas de PCA para PC1 e PC2 (B).



Fonte: O autores

Análise de Discriminação. Para classificar e realizar a análise preditiva de amostras espectrais plasmáticas de pacientes grupo 1 e grupo 2, empregamos ferramentas de inteligência artificial (Tabela 1). Os resultados demonstraram que o algoritmo de Rede Neural proporcionou a discriminação mais eficaz entre pacientes dos 2 grupos. O método de pré-processamento ideal combinou Derivada do Filtro Savitzky-Golay + Normalização Mín-Máx + Redução de Ruído MNF.

O melhor desempenho foi observado usando as faixas espectrais de 3050–2800 cm¹ e 1800–900cm⁻¹. Essa abordagem de pré-processamento produziu sensibilidade de 100%, especificidade de 100% e precisão de 100% na diferenciação entre os grupos.

Tabela 2: Algoritmos de aprendizado de máquina aplicados em espectros para discriminar indivíduos controle e pacientes com câncer de próstata.

Pre-processing	Model	Accuracy (%)	Sensitivity (%)	Specificity (%)
Dados brutos	Neural Network	45.0	45.5	44.4
	AdaBoost	0.45	54.5	33.3
	Random Forest	20.0	27.3	11.1
Suavização gaussiana + normalização min-max	SVM	45.0	81.8	0.00
	Neural Network	60.0	54.5	66.7
	AdaBoost	80.0	72.7	88.9
Suavização gaussiana + redução de ruído PCA + normalização mín-máx	Random Forest	75.0	81.8	66.7
	SVM	45.0	45.5	44.4
	Neural Network	55.0	63.6	44.4
Derivada do filtro Savitzky-Golay + normalização Min-Max + redução de ruído MNF	AdaBoost	50.0	54.5	44.4
	Random Forest	55.0	63.6	44.4
	SVM	65.0	54.5	77.8
Derivada do filtro Savitzky-Golay + normalização Min-Max + redução de ruído MNF	Neural Network	100.0	100.0	100.0
	AdaBoost	90.0	91.0	88.9
	Random Forest	90.0	91.0	88.9
	SVM	95.0	100.0	88.9

Fonte: O autores

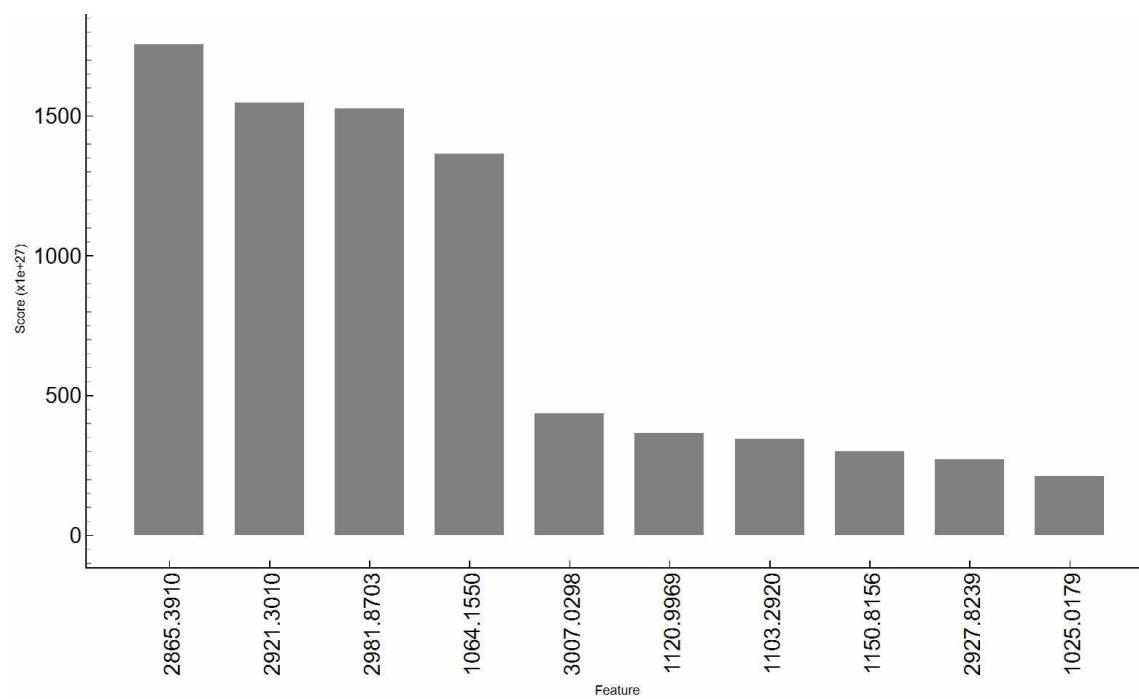
Finalmente, aplicamos as Explicações Aditivas de Shapley (SHAP), uma abordagem de última geração para elucidar os resultados de modelos de aprendizado de máquina. A SHAP utiliza valores de Shapley da teoria dos jogos para fornecer alocação de crédito ideal com explicações locais. Utilizamos a SHAP para obter insights sobre os modos vibracionais que contribuíram significativamente para o desempenho preditivo superior do algoritmo de Rede Neural.

Os valores de pontuação para cada característica, derivados do algoritmo de Rede Neural usando espectros pré-processados obtidos via Derivada do Filtro Savitzky-Golay + normalização Mín-Máx + redução de ruído MNF, destacaram os principais

modos vibracionais responsáveis pela distinção entre pacientes controle e pacientes com câncer de próstata.

Os principais modos vibracionais identificados foram 2865 cm^{-1} , 2921 cm^{-1} , 2981 cm^{-1} , 1064 cm^{-1} , 3007 cm^{-1} , 1120 cm^{-1} , 1103 cm^{-1} , 1150 cm^{-1} , 2927 cm^{-1} e 1025 cm^{-1} (Figura 3). As atribuições moleculares para cada modo vibracional, conforme indicado pela análise de características SHAP para AdaBoost, são detalhadas na Tabela 2.

Figura 3: Gráfico de valor SHAP de importância do recurso do modelo de rede neural para discriminar indivíduos de controle e pacientes com câncer de próstata.



Fonte: O autores

Tabela 3, Atribuição de banda do valor SHAP de cada característica para discriminar indivíduos de controle e pacientes com câncer de próstata e suas atribuições moleculares.

Atribuição de banda de número de onda (cm⁻¹)	
2865 - 2981	Vibrações de alongamento de CH ₂ e CH ₃ de fosfolipídios, colesterol e creatina
1604	Vibração da adenina no DNA
3007	C-H
1120	Manose-6-fosfato
1103	Alongamento simétrico P-O-C
1150	Vibração de alongamento C-O
1025	Frequência vibracional dos grupos -CH ₂ OH dos carboidratos

Fonte: O autores

4. DISCUSSÃO

Na ATR-FTIR, espectro infravermelho original médio do plasma na região da impressão digital (3700 – 800 cm⁻¹) coletado de pacientes grupo 1 e grupo 2 indica uma superposição de componentes plasmáticos como proteínas, lipídios, DNA/RNA e carboidratos.

Na análise do PCA houve uma variância explicada dos individuos grupo 1 e do grupo 2, os espectros PC1 e PC2, explicando 50% e 14% respectivamente, porém sem separação dos grupos com o uso da IA com pré processamento (Derivada do filtro Savitzky-Golay + normalização Min-Max + redução de ruído MNF); o algoritmo de Rede Neural proporcionou a discriminação mais eficaz entre pacientes dos 2 grupos. Essa abordagem de pré-processamento produziu sensibilidade de 100%, especificidade de 100% e precisão de 100% na diferenciação entre os grupos.

A IA foi crucial para o desfecho do estudo, automatizou e agilizou as operações de análise e interpretação de dados com redução expressiva de custo e tempo do estudo.

A espectroscopia com acessibilidade, facilidade e baixo custo, a criação de uma ferramenta algorítmica, com acurácia próximas de 100% com ampla acessibilidade promoveria uma revolução no diagnóstico do Cap que enfrenta como exposto grandes desafios, abre uma janela para novas pesquisas com n robustos e desenhos de estudos multicêntricos.

A aplicação ATR-FTIR tem sido explorada em outros fluidos biológicos, como soro e plasma, para a detecção de marcadores de câncer de próstata. A FTIR é uma técnica promissora devido à sua capacidade de identificar alterações bioquímicas em amostras biológicas, o que pode ser útil para o diagnóstico não invasivo de cânceres, incluindo o de próstata^{21,22}.

5. CONCLUSÃO

O emprego da ATR-FTIR com criação de um algoritmo, encontramos um método diagnóstico de Cap com 100% de acurácia.

Referências

1. Rebello, R. J. *et al.* Prostate Cancer. *Nature Reviews. Disease Primers*, **7**, 1, 9 (2021). doi:10.1038/s41572-020-00243-0.
2. Merriel, S.W. D., Funston, G. & Hamilton, W. Prostate Cancer in Primary Care. *Advances in Therapy*, **35**, 9, 1285-1294 (2018). doi:10.1007/s12325-018-0766-1.
3. Schaeffer, E. M. *et al.* Prostate Cancer, Version 4.2023, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network: JNCCN*, **21**, 10, 1067-1096 (2023). doi:10.6004/jnccn.2023.0050.
4. Ong, X. R. S. *et al.* Understanding the Diagnosis of Prostate Cancer. *The Medical Journal of Australia*, **213**, 9, 424-429 (2020). doi:10.5694/mja2.50820.
5. Caixeta, D. C. *et al.* Salivary ATR-FTIR Spectroscopy Coupled with Support Vector Machine Classification for Screening of Type 2 Diabetes Mellitus. *Diagnostics*, [Basel], **13**, 8, 1396 (2023). DOI: <https://doi.org/10.3390/diagnostics13081396>
6. Bel'skaya, L. V., Sarf, E. A. & Makarova, N. A. Use of fourier transform ir spectroscopy for the study of saliva composition. *J Appl Spectrosc.*, **85**, 445-451 (2018). DOI: 10.1007/s10812-018-0670-0.

7. Elkins, K. M. Rapid presumptive "fingerprinting" of body fluids and materials by ATR FT-IR spectroscopy. *J Forensic Sci*, **56**, 6, 1580-1587 (2011). DOI: 10.1111/j.1556-4029.2011.01870.x.
8. Orphanou, C. M. *et al.* The detection and discrimination of human body fluids using ATR FT-IR spectroscopy. *Forensic Sci Int.*, **252**, e10-6 (2015). DOI: 10.1016/j.forsciint.2015.04.020. Erratum in: *Forensic Sci Int.*, v. 261, p. 82, 2016.
9. Depciuch, J. *et al.* Application of Raman Spectroscopy and Infrared Spectroscopy in the Identification of Breast Cancer. *Appl Spectrosc.*, **70**, 2, 251-63 (2016). doi: 10.1177/0003702815620127.
10. Das, T. *et al.* Analysis of the ex-vivo transformation of semen, saliva and urine as they dry out using ATR-FTIR spectroscopy and chemometric approach. *Sci Rep.*, **11**, 1, 11855 (2021). DOI: 10.1038/s41598-021-91009-5.
11. Bunaciu, A. A., Hoang, V. D. & Aboul-Enein, H. Y. Applications of FT-IR Spectrophotometry in Cancer Diagnostics. *Crit Rev Anal Chem.*, **45**, 2, 156-165 (2015). DOI: 10.1080/10408347.2014.904733.
12. Butler, H. J. *et al.* Development of high-throughput ATR-FTIR technology for rapid triage of brain cancer. *Nature Communications*, [London], **10**, 1, 4501 (2019). DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12527-5>
13. Ferreira, I. C. C. *et al.* Attenuated Total Reflection-Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR) Spectroscopy Analysis of Saliva for Breast Cancer Diagnosis. *Journal of Oncology*, [s.l.], **2020**, 1–11 (2020). DOI: <https://doi.org/10.1155/2020/4343590>
14. Rodrigues, R. P. *et al.* Differential Molecular Signature of Human Saliva Using ATR-FTIR Spectroscopy for Chronic Kidney Disease Diagnosis. *Braz Dent J.*, **30**, 5, 437-445 (2019). DOI: 10.1590/0103-6440201902228.

15. Ellis, D. I. & Goodacre, R. Metabolic fingerprinting in disease diagnosis: biomedical applications of infrared and Raman spectroscopy. *Analyst*, **131**, 8, 875-885 (2006). DOI: 10.1039/b602376m.
16. Lukose, J., Chidangil, S. & George, S. D. Optical technologies for the detection of viruses like COVID-19: Progress and prospects. *Biosensors e Bioelectronics*, **178**, 113004 (2021). DOI: 10.1016/j.bios.2021.113004.
17. Samuel, A. L. Some Studies in Machine Learning Using the Game of Checkers. *IBM Journal of Research and Development*, **3**, 3, 210-229 (1959). DOI: 10.1147/rd.33.0210.
18. Schleder, G. R. & Fazzio, A. Machine Learning na Física, Química, e Ciência de Materiais: Descoberta e Design de Materiais. *Rev Bras Ensino Fís.*, **43**, Suppl 1 (2021). DOI: 10.1590/1806-9126-RBEF-2020-0407.
19. TopoL, E. J. High-performance medicine: the convergence of human and artificial intelligence. *Nat Med.*, **25**, 1, 44-56 (2019). DOI: 10.1038/s41591-018-0300-7.
20. Associação Médica Mundial. Declaração de Helsinque: princípios éticos para as pesquisas médicas em seres humanos adotado pela 18^a Assembléia Médica Mundial. Helsinque, 1964. Disponível em: https://www.fcm.unicamp.br/fcm/sites/default/files/declaracao_de_helsinki.pdf. Acesso em: 17 mar. 2025.
21. Mitura, P. et al. Fourier transform InfraRed spectra analyzed by multivariate and machine learning methods in determination spectroscopy marker of prostate cancer in dried serum. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* **327**, 125305 (2025). DOI: 10.1016/j.saa.2024.125305.
22. Chua, I. S. , et al. Artificial intelligence in oncology: Path to implementation. *Cancer Med.* **10**, 12, 4138-4149 (2021). DOI: 10.1002/cam4.3935.

CONCLUSÃO

Este estudo é uma prova conceito utilizando novas plataformas espectroscópicas encontramos resultados bastante promissores com a metabolômica exploratória (2 metabólitos sem nenhuma expressão verificada no heatmap) no grupo 1 quando comparados ao grupo 2 e grupo 3. Conseguimos 3 algoritmos de IA com sensibilidade e especificidade acima de 90 %, já utilizando a ATR-FTIR chegamos a um algoritmo de IA com 100% de acurácia (Neural Network) com pré-processamento descrito. Respondemos o objetivo do estudo.

Evidenciamos que os fosfolipídeos foi o principal fator para diferenciar os grupos estudados. (1 artigo: Fosfoinositídeo e Esfingosina e artigo 2: espectro de fosfolipídeo detectado pelo SHAP).

Perspectivas de estudos muticêntricos e randomizados.

LIMITAÇÕES

Algumas das limitações do estudo: ausência de randomização, amostras por conveniência e o tamanho amostral.

REFERÊNCIAS

ALBERS P. KINNAIRD A. Advanced Imaging for Localized Prostate Cancer. **Cancers**, v. 16, n. 20, p. 3490, 2024. doi:10.3390/cancers16203490.

AL-SAEED, T. A.; KHALIL, D. A. Dispersion compensation in moving-optical-wedge Fourier transform spectrometer. **Applied Optics**, [Washington], v. 48, n. 20, p. 3979, 10 jul. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1364/AO.48.003979>

BAKER, M. J. *et al.* Developing and understanding biofluid vibrational spectroscopy: a critical review. **Chemical Society Reviews**, [Cambridge], v. 45, n. 7, p. 1803–1818, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1039/C5CS00585J>

BAKER, M. J. *et al.* Using Fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials. **Nature Protocols**, [London], v. 9, n. 8, p. 1771–1791, ago. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.110>

BALK, S. P.; KO, Y. J.; BUBLEY, G. J. Biology of prostate-specific antigen. **J Clin Oncol.**, v. 21, n. 2, p. 383-91, 2003. doi: 10.1200/JCO.2003.02.083.

BASSAN, P. *et al.* Substrate contributions in micro-ATR of thin samples: implications for analysis of cells, tissue and biological fluids. **The Analyst**, [Cambridge], v. 138, n. 14, p. 4139, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1039/c3an00363a>

BOEHM, B. E. *et al.* Biomarkers of Aggressive Prostate Cancer at Diagnosis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 3, p. 2185, 2023. doi:10.3390/ijms24032185.

BUTLER, H. J. *et al.* Development of high-throughput ATR-FTIR technology for rapid triage of brain cancer. **Nature Communications**, [London], v. 10, n. 1, p. 4501, 8 out. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12527-5>

CAIXETA, D. C. *et al.* Salivary ATR-FTIR Spectroscopy Coupled with Support Vector Machine Classification for Screening of Type 2 Diabetes Mellitus. **Diagnostics**, [Basel], v. 13, n. 8, p. 1396, 12 abr. 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/diagnostics13081396>

CHUA, I. S. , *et al.* Artificial intelligence in oncology: Path to implementation. **Cancer Med.**, v. 10, n. 12, p. 4138-4149, 2021. DOI: 10.1002/cam4.3935.

CUI, Y. *et al.* Evaluation of Prostate Cancer Antigen 3 for Detecting Prostate Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Scientific Reports**, v. 6, p. 25776, 2016. doi:10.1038/srep25776.

DELRUE, C.; DE BRUYNE, S.; SPEECKAERT, M. M. Unlocking the Diagnostic Potential of Saliva: A Comprehensive Review of Infrared Spectroscopy and Its Applications in Salivary Analysis. **Journal of Personalized Medicine**, [Basel], v. 13, n. 6, p. 907, 28 maio 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/jpm13060907>

DEPCIUCH, J. *et al.* Application of Raman Spectroscopy and Infrared Spectroscopy in the Identification of Breast Cancer. **Appl Spectrosc.**, v. 70, n. 2, p. 251-63, 2016. doi: 10.1177/0003702815620127.

DIESSEL, E. *et al.* Glucose Quantification in Dried-down Nanoliter Samples Using Mid-Infrared Attenuated Total Reflection Spectroscopy. **Applied Spectroscopy**, [Frederick], v. 58, n. 4, p. 442–450, abr. 2004. DOI: <https://doi.org/10.1366/000370204773580293>

DORLING, K. M.; BAKER, M. J. Highlighting attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy for rapid serum analysis. **Trends in Biotechnology**, [Cambridge], v. 31, n. 6, p. 327–328, jun. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.03.010>

EGGENER, S. E. *et al.* Molecular Biomarkers in Localized Prostate Cancer: ASCO Guideline. **Journal of Clinical Oncology**, v. 38, n. 13, p. 1474-1494, 2020. doi:10.1200/JCO.19.02768.

ELMI, F. *et al.* Application of FT-IR spectroscopy on breast cancer serum analysis. **Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, [Amsterdam], v. 187, p. 87–91, 5 dez. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.06.021>

FALAGARIO, U. G. *et al.* Prostate Cancer Biomarkers: A Practical Review Based on Different Clinical Scenarios. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 59, n. 5, p. 297-308, 2022. doi:10.1080/10408363.2022.2033161.

FAN, Y. H. *et al.* The Prostate Health Index Aids Multi-Parametric MRI in Diagnosing Significant Prostate Cancer. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1286, 2021. doi:10.1038/s41598-020-78428-6.

FERREIRA, I. C. C. *et al.* Attenuated Total Reflection-Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR) Spectroscopy Analysis of Saliva for Breast Cancer Diagnosis. **Journal of Oncology**, [s.l.], v. 2020, p. 1–11, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1155/2020/4343590>

GAJJAR, K. *et al.* Fourier-transform infrared spectroscopy coupled with a classification machine for the analysis of blood plasma or serum: a novel diagnostic approach for ovarian cancer. **The Analyst**, [Cambridge], v. 138, n. 14, p. 3917, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1039/c3an36654e>

GIERA, M. *et al.* XCMS-METLIN: data-driven metabolite, lipid, and chemical analysis. **Mol Syst Biol.**, v. 20, p. 1153-1155, 2024. <https://doi.org/10.1038/s44320-024-00063-4>

GLEASON, D. F. Classification of prostatic carcinomas. **Cancer Chemother Rep.**, v. 50, p. 125-128, 1966. PMID: 5948714.

HANS, K. M.-C.; MÜLLER, S.; SIGRIST, M. W. Infrared attenuated total reflection (IR-ATR) spectroscopy for detecting drugs in human saliva. **Drug Testing and Analysis**, [Hoboken], v. 4, n. 6, p. 420–429, jun. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1002/dta.346>

HU, Y. *et al.* Mass Spectrometry-Based Chemical Mapping and Profiling Toward Molecular Understanding of Diseases in Precision Medicine. **Chemical Science**, v. 12, n. 23, p. 7993-8009, 2021. doi:10.1039/d1sc00271f.

JOSEFSON, A. *et al.* Performance of 4Kscore as a Reflex Test to Prostate-Specific Antigen in the GÖTEBORG-2 Prostate Cancer Screening Trial. **European Urology**, v. 86, n. 3, p. 223-229, 2024. doi:10.1016/j.eururo.2024.04.037.

KHAN, A. et al Noninvasive Serum Metabolomic Profiling Reveals Elevated Kynurenone Pathway's Metabolites in Humans With Prostate Cancer. **Journal of Proteome Research**, v. 18, n. 4, p. 1532-1541, 2019. doi:10.1021/acs.jproteome.8b00803.

KHANMOHAMMADI, M. *et al.* Diagnosis of basal cell carcinoma by infrared spectroscopy of whole blood samples applying soft independent modeling class analogy. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, [Heidelberg], v. 133, n. 12, p. 1023–1023, 9 out. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00432-007-0300-3>

KHANMOHAMMADI, M. et al. Diagnosis of renal failure by infrared spectrometric analysis of human serum samples and soft independent modeling of class analogy. **Microchemical Journal**, [Amsterdam], v. 106, p. 67–72, jan. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2012.05.006>

LIMA, A. R. et al. Comprehensive Metabolomics and Lipidomics Profiling of Prostate Cancer Tissue Reveals Metabolic Dysregulations Associated With Disease Development. **Journal of Proteome Research**, v. 21, n. 3, p. 727-739, 2022. doi:10.1021/acs.jproteome.1c00754.

LUKOSE, J.; CHIDANGIL, S.; GEORGE, S. D. Optical technologies for the detection of viruses like COVID-19: Progress and prospects. **Biosensors e Bioelectronics**, v. 178, p. 113004, 2021. DOI: 10.1016/j.bios.2021.113004.

MAY, L.; BYERS-HEINLEIN, K.; GERVAIN, J.; WERKER, J. F. Language and the newborn brain: does prenatal language experience shape the neonate neural response to speech? **Front Psychol.**, v. 2, n. 222, 2011. doi: 10.3389/fpsyg.2011.00222.

MERRIEL, S. W. D.; FUNSTON, G.; HAMILTON, W. Prostate Cancer in Primary Care. **Advances in Therapy**, v. 35, n. 9, p. 1285-1294, 2018. doi:10.1007/s12325-018-0766-1.

MONDUL A. M. et al. Metabolomic Analysis of Prostate Cancer Risk in a Prospective Cohort: The Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention (ATBC) Study. **International Journal of Cancer**, v. 137, n. 9, p. 2124-32, 2015. doi:10.1002/ijc.29576.

MOTTET, N. et al. EAU-EANM-ESTRO-ESUR-SIOG Guidelines on Prostate Cancer-2020 Update. Part 1: Screening, Diagnosis, and Local Treatment with Curative Intent. **Eur Urol.**, v. 79, n. 2, p. 243-262, 2021. doi: 10.1016/j.eururo.2020.09.042.

NCCN. **NCCN clinical practice guidelines in oncology: prostate cancer**. Version 4, Plymouth Meeting, 2024. Disponível em: <https://www.nccn.org/guidelines/guidelines-detail?category=1&id=1459>. Acesso em: 22 nov. 2024.

NOREEN, R. et al. FTIR spectro-imaging of collagens for characterization and grading of gliomas. **Biotechnol Adv**, v. 30, n. 6, p. 1432-1446, 2012. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2012.03.009.

OERTHER, B. et al. Update on PI-RADS Version 2.1 Diagnostic Performance Benchmarks for Prostate MRI: Systematic Review and Meta-Analysis. **Radiology**, v. 312, n. 2, p. e233337, 2024. doi:10.1148/radiol.233337.

OFFERMAN, A. et al. The New ISUP 2014/WHO 2016 Prostate Cancer Grade Group System: First Résumé 5 years After Introduction and Systemic Review of the Literature. **World Journal of Urology**, v. 38, n. 3, p. 657-662, 2020. doi:10.1007/s00345-019-02744-

PINSK, P. F. *et al.* Screening for Prostate Cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 388, n. 15, p. 1405-1414, 2023. doi:10.1056/NEJMcp2209151

PLAS, S. *et al.* The impact of urine biomarkers for prostate cancer detection-A systematic state of the art review. **Crit Rev Oncol Hematol.**, v. 210, p. 104699, 2025. doi: 10.1016/j.critrevonc.2025.104699.

REBELLO, R. J. *et al.* Prostate Cancer. Nature Reviews. **Disease Primers**, v. 7, n. 1, p. 9, 2021. doi:10.1038/s41572-020-00243-0.

RODRIGUES, R. P. *et al.* Differential Molecular Signature of Human Saliva Using ATR-FTIR Spectroscopy for Chronic Kidney Disease Diagnosis. **Braz Dent J.**, v. 30, n. 5, p. 437-445, 2019. DOI: 10.1590/0103-6440201902228.

SAHA, A. *et al.* Artificial Intelligence and Radiologists in Prostate Cancer Detection on MRI (PI-CAI): An International, Paired, Non-Inferiority, Confirmatory Study. **The Lancet. Oncology**, v. 25, n. 7, p. 879-887, 2024. doi:10.1016/S1470-2045(24)00220-1.

SALMAN, J. W. *et al.* Prostate Specific Antigen as a Tumor Marker in Prostate Cancer: Biochemical and Clinical Aspects. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 867, p. 93-114, 2015. doi:10.1007/978-94-017-7215-0_7.

SAMUEL, A. L. Some Studies in Machine Learning Using the Game of Checkers. **IBM Journal of Research and Development**, v. 3, n. 3, p. 210-229, 1959. DOI: 10.1147/rd.33.0210.

SAVITZKY, A.; GOLAY, M. J. E. Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures. **Analytical Chemistry**. v. 36, n. 8, p. 1627-1639, 1964. DOI: 10.1021/ac60214a047.

SCHAEFFER, E. M. *et al.* Prostate Cancer, Version 4.2023, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. **Journal of the National Comprehensive Cancer Network: JNCCN**, v. 21, n. 10, p. 1067-1096, 2023.

SHAO, Y. *et al.* Metabolomics and Transcriptomics Profiles Reveal the Dysregulation of the Tricarboxylic Acid Cycle and Related Mechanisms in Prostate Cancer. **International Journal of Cancer**, v. 143, n. 2, p. 396-407, 2018. doi:10.1002/ijc.31313.

SHAPLEY, L. S. A value for n-person games. In: KUHN, H. W.; TUCKER, A. W. (ed.). Contributions to the theory of games. **Princeton: Princeton University Press**, 1953. v. 2, cap. 17, p. 307-318. DOI: 10.1515/9781400881970-018.

SON, A. *et al.* Mass Spectrometry Advancements and Applications for Biomarker Discovery, Diagnostic Innovations, and Personalized Medicine. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n.18, p. 9880, 2024. doi:10.3390/ijms25189880

STUART, B. H. **Infrared Spectroscopy**: Fundamentals and Applications. Hoboken: John Wiley & Sons, Ltd., 2005.

TOPOL, E. J. High-performance medicine: the convergence of human and artificial intelligence. **Nature Medicine**, v. 25, n.1, p. 44-56, 2019. DOI <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0300-7>.

WANG, A. *et al.* Machine Learning Prediction of COVID-19 Severity Levels from Salivaomics Data. **ArXiv**, 2022. Preprint. DOI: arXiv:2207.07274v1.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse

ANEXO 1 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado(a) para participar da pesquisa intitulada “Caracterização *in vitro* e *in vivo* do aptâmero A4 de RNA ligante específico de células de câncer de próstata”, sob a responsabilidade dos pesquisadores Dra. Vivian Alonso Goulart, Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho, Aline Gomes de Souza, Esther Campos Fernandez, Letícia Silveira Barcelos, Mariana Alves Pereira Zóia, Dra. Lara Vecchi, Dr. Leandro Alves de Oliveira, Dr Matheus Nister Moreira Reis e Dr. Sebastião Antônio Borba que será realizada na Universidade Federal de Uberlândia.

Nesta pesquisa nós estamos buscando entender como a molécula A4 (RNA) é eficaz para ser utilizada em uma nova metodologia de diagnóstico e triagem do câncer de próstata.

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será obtido pelos pesquisadores Dra. Vivian Alonso Goulart, Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho, Aline Gomes de Souza, Esther Campos Fernandez, Letícia Silveira Barcelos, Mariana Alves Pereira Zóia, Dra. Lara Vecchi, Dr. Leandro Alves de Oliveira, Dr Matheus Nister Moreira Reis e Dr. Sebastião Antônio Borba., antes da cirurgia. Você terá tempo para decidir se quer participar, conforme item IV da Resolução CNS 466/12.

Na sua participação você responderá a uma entrevista no dia da cirurgia sobre sua idade, peso, altura, medicamentos utilizados, doenças prévias, hábitos, se é fumante, se ingeriu bebida alcoólica e qual a frequência e se pratica atividade física; além de dados clínicos como história familiar de câncer e cirurgias prévias. **Além disso você doará 3mL de sangue** (quantidade aproximada de meia colher de chá), **5mL de urina** (quantidade aproximada de uma colher de chá) e tecido da próstata retirado por biópsia no momento da cirurgia. Este material será encaminhado ao Laboratório de Nanobiotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia e examinado para identificar células de câncer das amostras doadas.

Em nenhum momento você será identificado. Os resultados da pesquisa serão publicados e assim sua identidade será preservada.

Você não terá nenhum gasto nem ganho financeiro por participar da pesquisa.

Os riscos são aqueles inerentes ao próprio procedimento cirúrgico ao qual você será submetido, independente da utilização ou não do material coletado por este projeto de pesquisa. Um leve desconforto poderá ocorrer devido a possibilidade de formação de um pequeno hematoma no local de punção venosa necessária para a coleta de sangue, contudo poderá ser amenizado pela realização do mesmo por profissionais habilitados, sendo respeitadas as orientações do Ministério da Saúde do Brasil, Resolução 466/12. O estudo não oferecerá risco considerável, garantirá o sigilo dos dados coletados e os indivíduos envolvidos apenas serão identificados por meio de códigos. **Entretanto, existe risco de**

identificação do participante durante a pesquisa e de se sentir constrangido em algum momento na entrevista para levantamento de dados. Os benefícios serão a possibilidade de desenvolvimento de um diagnóstico mais eficaz, fácil e de baixo custo para o câncer de próstata, desta forma tornando o tratamento mais eficiente.

Você é livre para deixar de participar da pesquisa a qualquer momento sem nenhum prejuízo ou coação. Até o momento da divulgação dos resultados, você também é livre para solicitar a retirada dos seus dados da pesquisa. Uma via original deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ficará com você. A não participação neste estudo não afetará em nada o seu tratamento.

Em caso de qualquer dúvida ou reclamação a respeito da pesquisa, você poderá entrar em contato com: Vivian Alonso Goulart, Luiz Ricardo Goulart Filho, Aline Gomes de Souza, Esther Campos Fernández, Letícia Silveira Barcelos, Mariana Alves Pereira Zóia, Lara Vecchi no telefone 34- 3225 8440 ou no Laboratório de Nanobiotecnologia, sala 248, bloco 2E, Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia. **Você poderá também entrar em contato com o CEP - Comitê de Ética na Pesquisa com Seres Humanos na Universidade Federal de Uberlândia, localizado na Av. João Naves de Ávila, nº 2121, bloco A, sala 224, campus Santa Mônica – Uberlândia/MG, 38408-100; telefone: 34-3239-4131.** O CEP é um colegiado independente criado para defender os interesses dos participantes das pesquisas em sua integridade e dignidade e para contribuir para o desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos conforme resoluções do Conselho Nacional de Saúde.

Überlândia. de de 20

Assinatura dos pesquisadores

Eu aceito participar do projeto citado acima, voluntariamente, após ter sido devidamente esclarecido

Participante da pesquisa

ANEXO 2 – INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS

Universidade Federal de Uberlândia (UFU)

Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde (PGCS)

Laboratório de Nanobiotecnologia do Instituto de Genética e Bioquímica

Instrumento de Coleta de Dados - Participantes: * Grupo de Estudo (GE) - ** Grupo Controle (GC)

CaP PR Aberta ()*	CaP PR VL - Rob. ()*	CaP Pós Op. PR ()*	Biópsia P ()*
HPB PTV ()**	HPB RTU ()**	Masc. >18 <35 a ()**	Fem. >18 a ()**

Nome do Participante:

Data:	Pesquisador:		
N. Registro:	Instituição:	Iniciais do nome:	
Data Nasc.:	Idade (a):	Sexo:	Cor:
História Familiar de Câncer de Próstata: () S () N	Suspeita Clínica ITU: () S () N		

Data: PSA total (t) 1 ng/mL: PSA livre (l) 1 ng/mL: PSA l/t 1 %:

Data: PSA total (t) 2 ng/mL: PSA livre (l) 2 ng/mL: PSA l/t 2 %:

US da Próstata: () Abdominal () Trans retal Volume da Próstata em g:

Toque retal: Estadiamento clínico (cT):

RMmpP: Volume da Próstata em g: PIRADS: Local da lesão:

Obs.:

Data: Biópsia Próstata com US Trans Retal: () 12 Frag. () Com fusão cognitiva

Laboratório de anatomia patológica: () HC - UFU () Outro:

N. do Exame: Diagnóstico AP: () Adenocarcinoma () Outro:

Local Biópsia	N. Fr. Biop.	N. Fr. Acom.	% Fr. Acom.	Gleason	ISUP ²⁰¹⁴ G
Lobo D				+	=
Lobo E				+	=
Lesão RM				+	=
BIÓPSIA				+	=

IMUNOHISTOQUÍMICA DA BIÓPSIA: Gleason: + = ISUP²⁰¹⁴ Grau =

Obs.:

Rx pré trat.:

CT pré trat.:

Cintilografia Óssea com Tc pré trat:

Outro:

Clas. Risco: NCCN () EAU () CAPRA ()

Diagnóstico:

Tratamento:

TCLE assinado: () S () N Data Lançamento na planilha: Resp.:

Coletar: () Saliva (4 mL) () Urina (10 mL) () Sangue: a) Tubo Amarelo - b) Tubo Roxo ^{EDTA}

End. Lab.: UFU Campus Umuarama Bloco 2E Sala 224 - Telefone: 34-32258440

Abreviaturas:

% - Percentual

a - Anos

Acom. - Acometido(s)

AP - Anatomopatológico

CaP - Câncer de próstata

CT - Tomografia computorizada

EDTA - Etileno diamino tetracético

End. - Endereço

Fem. - Feminino

Frag. - Fragmento(s)

g - Gramas

G - Grau

GC - Grupo controle

GE - Grupo de estudo

HC - Hospital de Clínicas

HPB - Hiperplasia prostática benigna

ISUP - International Society Urological Pathology

ITU - Infecção do trato urinário

I - Livre

Lab. - Laboratório

Mas. - Masculino

mL - Mililitro

N - Não

N. - Número

Nasc. - Nascimento

ng - Nanograma

Obs. – Observações

Op - Operatório

P - Próstata

PGCS - Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde

PIRADS - Prostate Imaging Reporting and Data System

PR - Prostatovesiculectomia radical

PSA - Antígeno prostático específico

PTV - Prostatectomia trans vesical

RMmpP - Ressonância magnética multiparamétrica de próstata

RTU - Ressecção trans uretral

S - Sim

t - Total

Tc - Tecnécio

TCLE - Termo de consentimento livre e esclarecido

UFU - Universidade Federal de Uberlândia

US - Ultrassonografia

VL - Vídeo laparoscópica

ANEXO 3 – PARECER CEP



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
UBERLÂNDIA/MG



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Caracterização in vitro e in vivo do aptômero A4 de RNA ligante específico de células de câncer de próstata

Pesquisador: VIVIAN ALONSO GOULART

Área Temática:

Page 4

Versao: 4

Instituto de Pesquisas Ambientais da Serra do Rio do Rastro

Instituição Proponente: Instituto de Geociências e
Exato da UFSCar - São Paulo

ДАВОК ВО ДВАЧЕСЕРД

Número de Recurso: 3.533-461

Assessamento do Projeto

Trata-se recurso a parecer de emenda, parecer consubstanciado número 3.439.753, de 04 de julho de 2019. A referida Emenda, por sua vez, se referia ao Parecer Consubstanciado número 2.451.492, de 20 de dezembro de 2017.

Segundo os pesquisadores:

***Serão selecionados os pacientes com câncer e neoplasias benignas, onde será coletado tecido, sangue e urina. O tecido será submetido ao isolamento de células da próstata e analisado histopatologicamente. As células isoladas de tecidos serão incubadas com o aptâmero A4 de RNA e serão realizados ensaios in vitro de citotoxicidade, proliferação e migração celular. Usando a técnica de PCR em tempo real será analisado o perfil da expressão gênica das células. O sangue dos pacientes serão utilizados para o isolamento das células tumorais circulantes, que serão separadas por citometria de fluxo aquelas células ligantes ao aptâmero A4 de RNA. Em seguida estas células serão caracterizadas e inoculadas em camundongos para avaliação de metástases.**

Os aptâmeros são oligonucleotídeos que podem atuar como ferramentas terapêuticas por se unirem a alvos específicos podendo constituir biomarcadores de doenças. O aptâmero de RNA A4 é um ligante específico de células de câncer de próstata, selecionado pela técnica de Evolução Sistemática de Ligantes por Enriquecimento EXponencial em cultura 3D (3D Cell-SELEX). Este estudo visa caracterizar *in vitro* e *in vivo* o aptâmero A4. Primeiramente, será avaliada a

Enderéscio: Av. João Naves de Ávila 2121 - Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica CEP: 38.400-144
UF: MG Município: UBERLÂNDIA

Continuação do Parecer: 6.533.461

citotoxicidade, a proliferação e migração celular, e a expressão de genes associados ao câncer de próstata em linhagens celulares e em células isoladas dos tecidos dos pacientes (prostáticas normais e tumorais) após incubação com o aptâmero A4. Em seguida, serão isoladas células tumorais circulantes (CTC) do sangue e células da urina de pacientes com câncer de próstata por citometria de fluxo usando o aptâmero A4 como marcador destas células. Posteriormente, será estudado o potencial metastático das CTCs identificadas pelo aptâmero A4 através da inoculação *in vivo* destes células. Uma vez que o aptâmero A4 seja caracterizado, este poderá ser empregado para detecção do câncer de próstata e em sistemas de drug delivery para tratamento desta doença".

Objetivo da Pesquisa:

Segundo os documentos da pesquisa:

"Objetivo Primário: Caracterizar *in vitro* e *in vivo* o aptâmero de RNA A4 ligante de células tumorais da próstata para o desenvolvimento de uma nova metodologia de diagnóstico.

Objetivo Secundário:

- Analisar a citotoxicidade, proliferação e migração das células isoladas da próstata de tecido normal e tumoral de pacientes incubadas com o aptâmero de RNA A4;
- Analisar a expressão gênica das células isoladas da próstata de tecido normal e tumoral de pacientes".

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Conforme os pesquisadores:

"Riscos: O estudo não oferecerá risco considerável, garantirá o sigilo dos dados coletados e os indivíduos envolvidos serão identificados por meio de códigos (números). Entretanto, existe risco de identificação do participante durante a pesquisa. Um leve desconforto poderá ocorrer apenas devido à possibilidade de formação de um pequeno hematoma no local de punção venosa e devido à picada necessária para o procedimento de coleta de sangue dos pacientes, contudo poderá ser amenizado pela realização do mesmo por profissionais habilitados. Serão respeitadas as orientações do Ministério da Saúde do Brasil, resolução 466/12 para a pesquisa de seres humanos.

Benefícios: Possibilidade de seleção de marcadores moleculares que auxiliarão no desenvolvimento de uma nova técnica de diagnóstico diferencial entre os casos de câncer de próstata e tumores.

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121-Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica

Continuação do Parecer: 3533461

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Lista de alterações na emenda após recurso (destacadas em vermelho no documento emenda_apos_recurso):

Dentro do tópico "Lista de alterações no projeto detalhado":

1. Inclusão dos objetivos do estudo junto com os objetivos adicionais requeridos (alterações em negrita):

Objetivo primário

Caracterizar *in vitro* e *in vivo* o aptâmero de RNA A4 ligante de células tumorais da próstata para o desenvolvimento de uma nova metodologia de diagnóstico.

Objetivos secundários

Analisar a citotoxicidade, proliferação e migração das células isoladas da próstata de tecido normal e tumoral de pacientes incubadas com o aptâmero de RNA A4;

Analisar a expressão gênica das células isoladas da próstata de tecido normal e tumoral de pacientes incubadas com o aptâmero de RNA A4;

Isolar células tumorais circulantes do sangue e células da urina dos pacientes e separar por citometria de fluxo aquelas que são ligantes ao aptâmero de RNA A4;

Determinar a especificidade do aptâmero A4 ao câncer de próstata, e sua possível reatividade cruzada com o câncer de bexiga das células isoladas de amostras de urina e saliva de pacientes com câncer de próstata ou câncer de bexiga por espetrometria Raman e FTIR;

Inocular em camundongos as células ligantes ao aptâmero de RNA A4 e analisar a capacidade de formação do tumor e metástase.

INADEQUAÇÃO 1 CORRIGIDA.

2. Número de páginas alterado pela após a adição dos objetivos do estudo.

INADEQUAÇÃO 2 ATENDIDA.

3. Substituição do ano nas datas de fim, de 2022 por "2024" (nos pontos 18 e 19).

INADEQUAÇÃO 3 ATENDIDA.

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica

Continuação do Parecer: 5.533.461

pelo Pesquisador	Recurso.docx	14:51:53	GOULART	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1069957_E1.pdf	25/04/2019 13:24:27		Aceito
Outros	Emenda.docx	25/04/2019 13:23:22	VIVIAN ALONSO GOULART	Aceito
Outros	equipe_executora.pdf	08/03/2019 17:44:16	VIVIAN ALONSO GOULART	Aceito
Folha de Rosto	folharosto.pdf	07/03/2019 10:16:17	VIVIAN ALONSO GOULART	Aceito
Outros	linksCurriculoLattesemendado.doc	27/02/2019 16:10:39	VIVIAN ALONSO GOULART	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEemendado.docx	27/02/2019 16:08:12	VIVIAN ALONSO GOULART	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetodetalhadoemendado.docx	27/02/2019 16:07:57	VIVIAN ALONSO GOULART	Aceito
Cronograma	Cronogramaemendado.docx	27/02/2019 16:07:20	VIVIAN ALONSO GOULART	Aceito
Outros	respostaspendingencias110917.pdf	11/09/2017 14:29:36	VIVIAN ALONSO GOULART	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	stephania.pdf	23/06/2017 15:43:22	VIVIAN ALONSO GOULART	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	coparticipanteHCU.pdf	12/06/2017 13:25:20	VIVIAN ALONSO GOULART	Aceito
Outros	INSTRUMENTOCOLETA.pdf	05/05/2017 10:46:36	VIVIAN ALONSO GOULART	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

UBERLÂNDIA, 26 de Agosto de 2019

Assinado por:
Karine Rezende de Oliveira
 (Coordenador(a))