



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**PLATAFORMAS TECNOLÓGICAS NA VIGILÂNCIA ATIVA NO CÂNCER DE  
PRÓSTATA: ESPECTROSCOPIA ATR-FTIR, ANÁLISE METABOLÔMICA E  
APRENDIZADO DE MÁQUINA**

**Uberlândia, MG**

**2025**

**SEBASTIÃO ANTÔNIO BORBA**

**PLATAFORMAS TECNOLÓGICAS NA VIGILÂNCIA ATIVA NO CÂNCER DE  
PRÓSTATA: ESPECTROSCOPIA ATR-FTIR, ANÁLISE METABOLÔMICA E  
APRENDIZADO DE MÁQUINA**

Tese de Doutorado apresentado ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia.

Área de concentração: Ciências da Saúde

Orientador: Prof. Dr. Thúlio Marquez Cunha

Uberlândia

2025

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU  
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

B726  
2025 Borba, Sebastião Antonio, 1951-  
Plataformas Tecnológicas na Vigilância Ativa no Câncer de  
Próstata: Espectroscopia ATR-FTIR, Análise Metabolômica e  
Aprendizado de Máquina [recurso eletrônico] / Sebastião Antonio  
Borba. - 2025.

Orientador: Thúlio Marquez Cunha.  
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-  
graduação em Ciências da Saúde.  
Modo de acesso: Internet.  
Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.te.2025.393>  
Inclui bibliografia.  
Inclui ilustrações.

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

CDU: 61

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:  
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091  
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074


**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.ppcs.famed.ufu.br - ppcs@famed.ufu.br


**ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO**

Programa de Pós-Graduação em:	Ciências da Saúde				
Defesa de:	Defesa de Tese Doutorado Nº 07/PPGCSAUDE				
Data:	01.07.2025	Hora de início:	13:00h	Hora de encerramento:	15:00h
Matrícula do Discente:	11813CSD029				
Nome do Discente:	Sebastião Antônio Borba				
Título do Trabalho:	PLATAFORMAS TECNOLÓGICAS NA VIGILÂNCIA ATIVA NO CÂNCER DE PRÓSTATA: ESPECTROSCOPIA ATR-FTIR, ANÁLISE METABOLÔMICA E APRENDIZADO DE MÁQUINA.				
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. Arlene Bispo dos Santos Nossol (UFU), Ricardo de Lima Favaretto (Ebserh HC-UFU) e Thúlio Marquez Cunha (UFU), orientador do candidato. Em web conferência, pela plataforma ConferênciaWeb, também membros da banca, os Profs. Drs. Ricardo Garcia de Freitas (Hospital MaterDei) e Larissa Prado Maia (UEMG).

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(às) 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):

Aprovada.

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 01/07/2025, às 14:37, 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 01/07/2025, às 15:30, 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 01/07/2025, às 15:37, 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 01/07/2025, às 15:42, 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 **Arlene Bispo dos Santos Nossol, Usuário Externo**, em 01/07/2025, às 15:49, 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](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **6465712** e o código CRC **4A2285B5**.

Referência: Processo nº 23117.044265/2025-74

SEI nº 6465712

Criado por [karol\\_padua](#), versão 5 por [karol\\_padua](#) em 01/07/2025 13:19:55.

## DEDICATÓRIA

*A minha esposa, filhos e netos  
pelo amor e  
motivação dos meus sonhos*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Thúlio Márquez Cunha, expresso meus sinceros agradecimentos pela orientação, apoio e motivação em todos os momentos. Minha homenagem ao Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho (in memoriam), cujos exemplos e ensinamentos permanecem fontes de inspiração.

Agradeço a todos os colaboradores do Laboratório de Nanobiotecnologia, em especial ao Dr. Robinson Sabino-Silva, à Dra. Bianca Uliana Picolo, ao Dr. Mário Machado Martins, à Dra. Hebreia Oliveira Almeida-Souza, ao Dr. Abel Dib Rayashi, à Dra. Emília Rezende Vaz, à Dra. Vivian Alonso Goulart, à Dra. Esther Campos Fernandez, ao Dr. Leandro Alves de Oliveira e ao meu filho, Dr. Bruno Henrique Carrijo Borba, pela participação neste projeto.

Meus agradecimentos aos pacientes que aceitaram integrar este estudo e aos urologistas, residentes e funcionários do Hospital das Clínicas da UFU pelo empenho e colaboração.

Sou profundamente grato à minha família, sempre pilar de apoio e motivação na concretização dos meus sonhos, e a Deus, por iluminar nossos caminhos. Registro meu especial reconhecimento à minha esposa, Regina, meu suporte mais forte; aos meus filhos Bruno, Pryscila e Rafael; às minhas noras Ana Cândida e Luiza e aos meus netos Geovana, Theo, Olívia e Cecília, cujas vidas me enchem de orgulho e inspiração.

Agradecemos ao Programa de Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia e reconhecemos o apoio financeiro do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Teranóstica e Nanobiotecnologia e da FAPEMIG.

## RESUMO

A vigilância ativa em câncer de próstata clinicamente localizado é uma opção em cerca de 50% dos tumores recém-diagnosticados, mas permanece desafiador definir quais pacientes necessitam de tratamento definitivo. Buscou-se avaliar duas plataformas não invasivas, rápidas e econômicas, metabolômica (CLAE-EM) e ATR-FTIR associadas a algoritmos de inteligência artificial, para indicar vigilância ativa com maior precisão. Os participantes, com diagnóstico de adenocarcinoma de próstata clinicamente localizados, estratificados conforme NCCN v. 4 (2024) e submetidos a prostatectomia radical, foram divididos em: Grupo 1 - Vigilância ativa: 12 pacientes - metabolômica (CLAE-EM) / 8 pacientes (ATR-FTIR) , e Grupo 2 - Tratamento definitivo: 7 pacientes - metabolômica (CLAE-EM) / 3 pacientes (ATR-FTIR). A análise metabolômica (CLAE/MS Q-TOF - ESI) no soro foi realizada com estratégia exploratória: filtro de frequência 100%, teste t não pareado ( $p < 0,05$ ) e fold change  $\geq 2$ . Foi utilizado o software Orange v. 3.38.1 e utilizado os modelos supervisionados Logistic Regression, NaiveBayes e Stochastic Gradient Descent. Os espectros de soro medidos em ATR-FTIR, truncados nas regiões lipídica ( $3050\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$ ) e impressão digital ( $1800\text{--}900\text{ cm}^{-1}$ ) foram processados no software Orange 3.35 e os algoritmos criados com os modelos supervisionado Redes Neurais, AdaBoost, Random Forest e SVM. Na análise metabolômica foram identificados nos dois grupos 514 metabólitos dos quais dois foram diferentemente expressos, estatisticamente significante (fold change  $>2$  e  $p < 0,05$ ), Fosfatidiletanolamina e Lisofosfatidilcolina, ambos mais elevados no grupo com indicação de tratamento definitivo, sugerindo maior atividade neoplásica neste grupo. Os Modelos preditivos Logistic Regression, Naive Bayes e Stochastic Gradient Descent apresentaram alta sensibilidade, especificidade e acurácia na separação dos grupos. Na ATR-FTIR o modelo preditivo supervisionado SVM obteve sensibilidade, especificidade e acurácia de 100% na separação dos grupos e a SHAP identificou os picos espectrais mais contributivos: ( $1423\text{ cm}^{-1}$ ) vibrações de anel mistos e flexão CH e ( $3011\text{ cm}^{-1}$ ) estiramento N-H. A metabolômica exploratória (CLAE-EM) identificou dois marcadores promissores na separação dos grupos vigilância ativa e com indicação de intervenção. Com as duas plataformas (CLAE-EM) e ATR-FTIR aliadas com IA, foi possível criar algoritmos preditivos com bom desempenho na separação dos grupos. A ATR-FTIR sinalizou na direção dos metabólitos identificados pela análise metabolômica (CLAE-EM). Ambos os marcadores e os algoritmos de predição têm potencial para indicar vigilância ativa com maior segurança após validação em estudos maiores.

**Palavras-chave:** Câncer de próstata; vigilância ativa; tratamento definitivo; metabolômica (CLAE-EM); ATR-FTIR; inteligência artificial; aprendizado de máquina.

## ABSTRACT

Active surveillance in clinically localized prostate cancer is an option in approximately 50% of newly diagnosed tumors, but it remains challenging to define which patients require definitive treatment. This study aimed to evaluate two non-invasive, rapid, and cost-effective platforms, metabolomics (LC-MS) and ATR-FTIR, combined with artificial intelligence algorithms to indicate active surveillance with greater precision. Participants diagnosed with clinically localized prostate adenocarcinoma, stratified according to NCCN v. 4 (2024) and submitted to radical prostatectomy, were divided into: Group 1 – Active Surveillance: 12 patients (metabolomics (CLAE/MS Q-TOF ESI) / 8 patients (ATR-FTIR) Group 2 – Definitive Treatment: 7 patients (metabolomics (CLAE/MS Q-TOF ESI) / 3 patients (ATR-FTIR). Serum metabolomic analysis (CL/MS Q-TOF – ESI) was performed using an exploratory strategy: 100% frequency filter, unpaired t-test ( $p < 0.05$ ) and fold change  $\geq 2$ . Orange v. 3.38.1 software was used with supervised Logistic Regression, Naive Bayes and Stochastic Gradient Descent models. Serum spectra measured by ATR-FTIR, truncated to the lipid (3050–2800  $\text{cm}^{-1}$ ) and fingerprint (1800–900  $\text{cm}^{-1}$ ) regions, were processed in Orange 3.3.5 and algorithms were built using supervised Neural Networks, AdaBoost, Random Forest and SVM models. Metabolomic analysis identified 514 metabolites across both groups, of which two were differentially expressed with statistical significance (fold change  $> 2$  and  $p < 0.05$ ): phosphatidylethanolamine and lysophosphatidylcholine, both elevated in the definitive treatment group, suggesting higher neoplastic activity in this group. Predictive models (Logistic Regression, Naive Bayes and Stochastic Gradient Descent) demonstrated high sensitivity, specificity and accuracy in group separation. In ATR-FTIR, the supervised SVM model achieved 100% sensitivity, specificity and accuracy in separating the groups, and SHAP analysis identified the most contributive spectral peaks: 1423  $\text{cm}^{-1}$  (mixed ring vibrations and CH bending) and 3011  $\text{cm}^{-1}$  (N–H stretching). Exploratory metabolomics (CL-MS) identified two promising markers for distinguishing the active surveillance group from the intervention-indicated group. By combining both platforms (CL-MS and ATR-FTIR) with AI, it was possible to develop predictive algorithms that perform well in separating these groups. ATR-FTIR pointed in the direction of the metabolites identified by metabolomic analysis (LC-MS). Both the markers and the prediction algorithms hold potential to guide active surveillance with greater certainty, pending validation in larger studies.

**Keywords:** prostate cancer; active surveillance; definitive treatment; metabolomics (LC-MS); ATR-FTIR; artificial intelligence; machine learning.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### - Tese:

Figura 1. Tipos de vibrações nos grupos funcionais .....	42
Figura 2. Espectro de ondas eletromagnéticas .....	44
Figura 3. Absorções de ligações em moléculas orgânicas nas regiões do MIR (4.000 - 400 cm <sup>-1</sup> ) .....	45
Figura 4. Famílias moleculares e suas localizações na região MIR (4.000 - 400 cm <sup>-1</sup> ) .....	46
Figura 5. Componentes básicos de um espectrômetro .....	47
Figura 6. Reflexão total atenuada (ATR) .....	48
Figura 7. Máquina de vetores de suporte - Ilustração simplificada .....	52
Figura 8. Desenho do estudo: Metabolômica (CLAE-EM) e ATR-FTIR.....	56

### - Artigo 1:..

Figura 1. Desenho do estudo .....	6
Figura 2. Heatmap dos metabólitos diferencialmente expressos nos grupos elegíveis para vigilância ativa (grupo1) x intervenção (grupo 2) pela classificação de risco da NCCN versão 4 de 2024 (NCCN, 2024) .....	71
Figura 3. Matriz de confusão .....	73
Figura 4. Curvas ROC para Logistic Regression, Naive Bayes e Stochastic Gradient Descent .....	73

### - Artigo 2:

Figura 1. Desenho do estudo .....	94
Figura 2. Espectro representativo médio, com respectivo desvio padrão, do ATR-FTIR (3700–900 cm <sup>-1</sup> ) no soro de pacientes elegíveis para vigilância ativa e com indicação de intervenção soro .....	98
Figura 3. Gráfico de escores da PCA para PC1 vs. PC2 (A) e loadings da PCA para PC1 e PC2 (B) .....	99
Figura 4. Gráfico de importância das características (valores SHAP) do modelo SVM para discriminar pacientes em vigilância ativa e intervenção .....	101

## LISTA DE TABELAS

### - Tese:

Tabela 1. Estratificação de risco inicial e investigação de estadiamento para câncer de próstata clinicamente localizado .....	22
Tabela 2. Estudos sobre vigilância ativa no câncer de próstata .....	28
Tabela 3. Marcadores moleculares .....	30

### - Artigo 1:

Tabela 1. Dados dos participantes: demográficos, clínicos, classificação de risco orientações para manejo do CaP da NCCN versão 4 de 2024 e valor de p .....	70
Tabela 2. Resultado sensibilidade, especificidade, razão de verossimilhança. valor preditivo e acurácia .....	73

### - Artigo 2:

Tabela 1. Dados dos participantes: demográficos, clínicos, classificação de risco orientações para manejo do CaP da NCCN versão 4 de 2024 e valor de p .....	97
Tabela 2. Algoritmos de aprendizado de máquina aplicados aos espectros do soro para discriminar pacientes em vigilância ativa e intervenção .....	100
Tabela 3. Atribuição das bandas dos valores SHAP de cada característica para discriminar pacientes em vigilância ativa e intervenção .....	101

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ACO - Enzima m-aconitase  
ADT -Terapia de deprivação androgênica  
AJCC - *American Joint Committee on Cancer*  
APC - *Adenomatous Polyposis Coli*  
ATR - *Attenuated total reflection*  
AUA - *American Urological Association*  
BCAA - Aminoácidos de cadeia ramificada  
CAAE - Certificado de Apresentação para Apreciação Ética  
CaP - Câncer de Próstata  
CAPRA - *Score for Prostate Cancer Risk*  
CE - *Capillary electrophoresis*  
CE-MS - Eletroforese capilar e espectrometria de massa  
CEP - Comitê de Ética em Pesquisa  
CLAE/EM - Cromatografia líquida e espectrometria de massa  
CPK - Proteína quinase C  
CRPC - Câncer de próstata resistente à castração  
CSPC - Câncer de próstata metastático sensível à castração  
cT - Estadiamento clínico  
cT - Estadiamento clínico do tumor primário  
DAGs - Diacilgliceróis  
DIMS - *Direct infusion mass spectrometry*  
DLX1 - *Distal-less homeobox 1*  
DNA - Ácido desoxirribonucleico  
dp - Profundidade da onda evanescente  
DPSA - Densidade do PSA total  
EANM - *European Association of Nuclear Medicine*  
EAU - *European Association of Urology*  
ECIS - *European cancer information system*  
EDRP - Exame digital retal da próstata  
ERG - *ETS-Related Gene*  
ESI - Fonte de ionização por eletrospray  
ESTRO - *European Society for Radiotherapy and Oncology*

ESUR - *European Society of Urogenital Radiology*

FAMED- Faculdade de Medicina

FIR - *Far-infrared*

FAPEMIG - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais

FTIR - *Fourier transform infrared spectroscopy*

GC - Cromatografia a gás

GC - Grupo Controle

GC-MS - Cromatografia gasosa e espectrometria de massa

GE - Grupo de estudo

GPS - Genomic Prostate Score

GSTP1 - Glutathione S-Transferase P1

HC - Hospital de Clínicas

HMDB - *Human Metabolome Database*

HOXC6 - *Homeobox C6*

HPB - Hiperplasia prostática benígna

IA - *Artificial intelligence*

IES - Ionização por electrospray

INCA - Instituto Nacional do Câncer

IR- *Infra red*

ISUP - *International Society of Urological Pathology*

KEGG - *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*

LC - Cromatografia líquida

LC-MS - Cromatografia Líquida e Eséctrpscopia de Massa

LPC - Lisofosfatidilcolina

M - Metástase

MALDI-MS - *Matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry*

MFE - Molecular feature extraction

MG - Minas Gerais

MIR - *Mid-infrared*

ML - *Machine learning*

MNF - Minimum Noise Fraction

MPP - Mass Profiler Professional

MS - *Mass spectrometry*

MSI - *Metabolomics Standards Initiative*

N - Linfonodos

NCCN - *National Comprehensive Cancer Network*

NIH/SEER - National Cancer Institute. Surveillance Epidemiology and results

NIR - *Near-infrared*

NIST - National Institute of Standards and Technology

NMR - Nuclear magnetic resonance

OPLS-DA - *Orthogonal partial least squares discriminant analysis*

p2PSA - Ispforma pré PSA

PASS - *Canary Prostate Active Surveillance Study*

PCA - Análise de componentes principais

PCA3 - *Prostate Cancer Antigen 3*

PCPT-RC - *Prostate Cancer Prevention Trial Risk Calculator*

PHI - *Prostate Health Index*

PIRADS - *Prostate Imaging Reporting and Data System*

PLS-DA - Análise discriminante por mínimos quadrados parciais

PR - Prostatovesiculectomia radical

PRIAS - *Prostate Cancer Research International Active Surveillance Study*

PSA - Antígeno prostático específico

PSMA - Antígeno prostático específico de membrana

PSA L - Antígeno prostático específico livre

PSA T - Antígeno prostático específico total

PTEN - *Phosphatase and Tensin Homolog*

QC - Quality control

Q-TOF - Espectrômetro de massa quadrupolo de tempo de voo

RA - Risco alto

RASSF1 - *Ras-Association Domain Family 1*

RI - Risco intermediário

RM - Ressonância magnética

RMmpP - Ressonância magnética multiparamétrica de próstata

RNA - Ácido ribonucleico

ROC - Receiver Operating Characteristic

Rt - Radioterapia

RTU - Ressecção trans uretral

Rx - Raio x

SBU - Sociedade Brasileira de Urologia

SHAP - Shapley Additive Explanations

SIOG - *International Society of Geriatric Oncology*

SUO - Society of Urologic Oncology

SVM - Máquina de vetores de suporte

TCA - Ácido tricarboxílico

TCLE - Termo de consentimento livre e esclarecido

TMPRSS2 - *Transmembrane Protease, Serine 2*

TMRPRSS2ERG - *Transmembrane Protease, Serine 2 - ETS-Related Gene*

TNM - Tumor linfonodo metástase

Tu - Tumor

UCSF - *University California San Francisco*

UFU – Universidade Federal de Uberlândia

UICC - *Union for International Cancer Control*

US - Ultrassonografia

USA - Estados Unidos da América

VA – Vigilância Ativa

VPP - Valor preditivo positivo

VPSA - Velocidade de crescimento anual do PSA total

WHO - *World Health Organization*

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	15
1.1 Câncer de próstata	15
1.1.1. Epidemiologia	15
1.1.2 Etiologia	15
1.1.3. Rastreamento	16
1.1.4 Diagnóstico	17
1.1.5. Patologia	20
1.1.6 Estratificação de risco	22
1.1.7. Manejo do câncer de próstata	24
<b>2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b>	26
2.1 Vigilância ativa no câncer de próstata	26
2.2 Novas tecnologias no diagnóstico e manejo do câncer de próstata	29
2.2.1 Biomarcadores	29
2.2.2 Metabolômica	35
2.2.3 ATR-FTIR	41
2.2.4 Inteligência artificial e aprendizado de máquina	49
<b>3. OBJETIVOS</b>	54
3.1 Objetivo Geral	54
3.2 Objetivo Específico	54
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b>	54
4.1 Aspectos éticos e biossegurança	54
4.2 Desenho do Estudo	55
4.3 Fonte de Dados	55
4.4 Critérios de Inclusão	55
4.5 Critérios de Exclusão	55
4.6 Coleta de Amostra Biológica	56
4.7 Variáveis	57
4.8 Classificação de risco de progressão do câncer de próstata	57
4.9 Análise Metabolômica	57
4.10 Análise ATR - FTIR	58
4.11 Análise estatística	58

4.11.1 Análise estatística dos participantes .....	58
4.11.2 Análise estatística - Metabolômica .....	59
4.11.3 Análise estatística - ATR - FTIR .....	59
<b>5 RESULTADOS</b> .....	60
5.1 Artigo 1: Metabolômica acoplada à Inteligência artificial na vigilância ativa no câncer de próstata .....	61
5.2 Artigo 2: ATR-FTIR e Inteligência artificial na vigilância ativa no câncer de próstata .....	89
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	112
<b>7. CONFLITOS DE INTERESSE</b> .....	112
<b>8. PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	112
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	112
<b>APÊNDICES</b>	
APÊNDICE A - Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) .....	144
APÊNDICE B - Instrumento de coleta de dados .....	146
<b>ANEXOS</b>	
ANEXO A - Comprovante de aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) .....	148

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1 Câncer de próstata**

#### **1.1.1. Epidemiologia**

O Câncer de Próstata (CaP) pela sua alta incidência e mortalidade é considerado um problema de saúde pública mundial (Orsted; Bojesen, 2013; Frankel *et. al.*, 2003).

Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o (CaP) é a neoplasia mais comum no homem. Sua incidência nos Estados Unidos da América (USA) para 2020 -2022, na Europa em 2022 e no Brasil em 2023 foi estimada em 133, 155 e 68 novos casos/100.000 habitantes/ano, respectivamente (NIH/SEER, 2022; ECIS, 2022; INCA, 2022).

A estimativa para 2022 foi de 268.490 novos casos de CaP e 34.500 mortes por esta neoplasia nos USA e 343.466 novos casos de CaP e 79.376 mortes por este tumor na Europa. No Brasil foi estimado 65.840 novos casos de CaP para cada ano do triênio 2020-2022 com mortalidade em torno de 15.841 mortes por ano (NIH/SEER, 2022; ECIS, 2022; INCA, 2022).

Na Europa o CaP é a terceira causa mais comum de morte por câncer atrás do câncer colo retal e de pulmão e no Brasil a mortalidade do CaP é a segunda causa mais comum de morte por câncer perdendo apenas para o câncer de pulmão (ECIS, 2022; INCA, 2020).

A Comissão *Lancet* sobre câncer de próstata, estimou que o número de novos casos por ano mundialmente, aumentará de 1,4 milhão em 2020 para 2,9 milhões até 2040 e recomenda que os governos preparem estratégias para enfrentar este desafio (WHO, 2022; James *et al.*, 2024).

#### **1.1.2. Etiologia**

Considerado de etiologia desconhecida, três fatores são reconhecidos como fatores de risco de CaP: o aumento da idade, a raça/etnia negra e história familiar positiva desta neoplasia. Dieta rica em gordura (principalmente as lácteas), maus hábitos de vida, aumento dos níveis de testosterona e fatores genéticos, entre outros, têm sido implicados no desenvolvimento deste tumor (Leitzmann; Rohrmann, 2012; Forbat *et al.*, 2013; Fleshner; Lawrentschut, 2009).

### 1.1.3. Rastreamento

O rastreamento do CaP é realizado há mais de 25 anos com a utilização da dosagem sérica do antígeno prostático específico em inglês, *prostatic specific antigen* (PSA) e toque retal, sendo um dos temas mais controversos na literatura urológica, documentados em várias publicações (Lott *et al.*, 2020).

O principal intuito dos estudos sobre o rastreamento do CaP é investigar o seu papel em homens normais na diminuição da mortalidade por CaP e da mortalidade global (Etzioni *et al.*, 2013).

A Sociedade Brasileira de Urologia (SBU) recomenda no rastreamento do CaP que homens a partir de 50 anos devem procurar um profissional especializado, para avaliação individualizada. Pacientes da raça negra ou com parentes de 1º. ou 2º. grau com câncer de próstata devem começar o rastreamento aos 45 anos. O rastreamento deverá ser realizado após ampla discussão dos riscos e potenciais benefícios, em decisão compartilhada com o paciente. Após os 75 anos, poderá ser realizado apenas para aqueles com expectativa de vida acima de 10 anos (SBU, 2020).

O PSA apresenta alta sensibilidade e baixa especificidade no diagnóstico do CaP uma vez que é um marcador órgão-específico mas não câncer-específico, apresentando elevação em outras patologias da próstata diferentes do câncer (hiperplasia prostática benigna e prostatites) além de se alterar com o uso de alguns medicamentos e com a manipulação da glândula (massagem prostática e biópsia) (Ross; Rodriguez, 2016; Bernal-Soriano *et al.*, 2019; Marks *et al.*, 2006).

O valor preditivo positivo (VPP) do PSA total no diagnóstico do CaP, depende do resultado de sua dosagem sendo, neste trabalho, de 10% para PSA total <4,1 ng/mL, de 25% para PSA total ≥4,1 ng/mL a 10,0 ng/mL e de 50% a 60% para PSA total >10,0 ng/mL (Schroder; Wildhagen, 2008).

Em relação aos falso negativos do PSA no diagnóstico de CaP, tumores de próstata muito indiferenciados no seu grau histológico não apresentam elevação do PSA plasmático (Slatkoff *et al.*, 2011).

De acordo com o guideline da *American Urological Association* (AUA) homens com PSA maior que 1,0 ng/mL aos 40 anos e maior que 2,0 ng/mL aos 60 anos também apresentam risco aumentado de metástase ou morte por CaP várias décadas depois. Assim, uma estratégia adaptada ao risco pode ser considerada com base no nível inicial do PSA total. Os testes iniciais de PSA

podem ser de 2 em 2 anos para os pacientes que estão inicialmente em risco ou adiados para 8 a 10 anos nos que não estão em risco ou seja, com um PSA total inicial menor que 1,0ng/mL aos 40 anos e um PSA menor que 2,0ng/mL aos 60 anos de idade e história familiar negativa (Carter *et al.*, 2018).

Os intervalos ideais para a realização da dosagem sérica do PSA e exame digital da próstata são desconhecidos e têm variado entre diversos estudos prospectivos. Ainda não está totalmente elucidado seu impacto em reduzir a mortalidade câncer específica e global e seus verdadeiros benefícios (Lott *et al.*, 2020).

O toque retal faz parte do rastreamento do câncer da próstata. Considerando a anatomia zonal de McNeal (McNEAL, 1981) a maior parte dos tumores de próstata se localizam na zona periférica e podem ser detectados pelo toque retal quando apresentam volume acima de 0,2mL (Gosselaar *et al.*, 2008).

Quando o toque retal é suspeito está indicado biópsia de próstata guiada por ultrasonografia tranretal, mesmo quando a dosagem do PSA total é <4,0 ng/mL (Bangma *et al.*, 1997). Cerca de 18% dos diagnósticos de CaP são realizados apenas pela alteração no exame digital da próstata (Gosselaar *et al.*, 2008).

O VPP do toque retal é considerado baixo variando de 2% a 6,3% para PSA total < 4,0 ng/mL conforme dados do estudo *European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer* de 2014 (Schroder *et al.*, 2014).

O VPP do PSA total >4,0 ng/mL no diagnóstico de câncer de próstata foi de apenas 17% mas, quando associado com toque retal alterado atingiu 65% (Bangma *et al.*, 1997).

O toque retal faz parte do estadiamento clínico do tumor primário (cT) sendo descrito de acordo com a classificação TNM, tumor (T), linfonodo (N), metástase (M) da *Union for International Cancer Control* (UICC) e *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) *Staging 8ª. ed.*, 2016 (Brierley *et al.*, 2017; Amin *et al.*, 2017).

#### **1.1.4. Diagnóstico**

Considerando a acurácia do toque retal e que o PSA plasmático apresenta alta sensibilidade e baixa especificidade no diagnóstico de CaP, a biópsia de próstata guiada por ultrassonografia trans retal tem sido associada a altas taxas

de falsos negativos devido ao alto grau de inter e intra-heterogeneidade do CaP (Schoenfield *et al.*, 20007).

Estudos mostraram taxa de falso negativo em biópsias de próstata variando de 10% a 34% e de 25% para pacientes com PSA inferior a 10 ng/mL (Epstein *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2004), respectivamente. Nesta mesma faixa de PSA, até dois terços (66%) das biópsias foram negativas e até 43% dos pacientes que realizam a primeira biópsia de próstata necessitaram de uma segunda ou até uma terceira biópsia, o que gera custos, ansiedade e riscos ao paciente (2 a 4 % de infecção que requer internação hospitalar) (Reis *et al.*, 2020).

Os parâmetros utilizados para indicação de biópsia de próstata foram questionados em vários estudos em relação à acurácia e aplicabilidade clínica (Lott *et al.*, 2020).

Nos últimos anos, novas plataformas tecnológicas foram incorporados à prática clínica para melhorar a acurácia das biópsias de próstata evitando biópsias desnecessárias (sobresiagnóstico) e também para aprimorar o manejo desta neoplasia evitando tratamentos desnecessários (sobretratamento). Para melhorar a acurácia das biópsias de próstata podemos elencar o refinamento do PSA, exames moleculares, nomograma para indicação de biópsia e a ressonância magnética multiparamétrica de próstata (RMmpP). O refinamento do PSA inclui a relação PSA livre/total (quanto menor do ponto de corte de 18% ou 20% maior a probabilidade de neoplasia) (Catalona *et al.*, 1998; Catalona *et al.*, 2000); a densidade do PSA total (DPSA) (com risco maior de CaP com DPSA >0,12 ng/mL/cm<sup>3</sup> (Wymenga *et al.*, 2000; Hayek *et al.*, 1999; Seaman *et al.*, 1993) e a velocidade de crescimento anual do PSA total (VPSA) em ng/mL/ano considerada de maior risco se >0,75ng/mL/ano (Carter; Peterson, 1997). Os exames moleculares SelectMDx® (MDxHealth®, Irvine, Califórnia, EUA) utilizando amostra de urina pós massagem prostática foi validado para a indicação clínica de biópsia de próstata (nos casos de teste com alto risco) (van Neste *et al.*, 2016) e o TMPRSS2:ERG (tem sido considerado principalmente pela sua alta especificidade) (Perner *et al.*, 2007). Considerado válido o nomograma: *Prostate Cancer Prevention Trial Risk Calculator* (PCPT-RC), no diagnóstico de CaP (Ankerst *et al.*, 2014). Quanto à Ressonância Magnética a padronização na aquisição e interpretação das imagens e dos relatórios de ressonância magnética multiparamétrica de próstata (RMmpP), mais conhecido pela sua abreviatura

PIRADS em inglês *Prostate Imaging Reporting and Data System* (PI-RADS versão 2) foi de grande importância para indicar com maior precisão a biópsia de próstata (ACR, 2019).

A RMmpP, reconhecidamente, foi a que mais contribuiu para melhorar a acurácia das biópsias de próstata uma vez que, identifica a lesão suspeita de neoplasia, permite a sua localização e extensão e, através da classificação PIRADS versão 2 (ACR, 2019) avalia o grau de suspeição de neoplasia prostática clinicamente significativa em: PIRADS 1 muito baixa ou muito improvável; PIRADS 2 baixa ou improvável; PIRADS 3 intermediária ou equívoco; PIRADS 4 alta ou provável e PIRADS 5 muito alta ou muito provável (Mussi, 2018).

O estudo de Hamm e colaboradores mostrou que o risco de CaP clinicamente significativo é de aproximadamente 3%, 7%, de 7 a 40%, 65% e 85% para PIRADS versão 2 (ACR, 2019) 1, 2, 3, 4 e 5, respectivamente (Hamm; Asbach, 2018).

Estudo demonstra valores de positividade para tumores clinicamente significativos usando o PIRADS versão 2 (ACR, 2019) de 15,7%, 33,0%, 70,5% e 90,7% para as categorias PI-RADS 2, 3, 4 e 5 desta versão, respectivamente havendo consenso em se indicar a biópsia de próstata para PIRADS 3, 4 e 5 (Greer *et al.*, 2017).

Existem benefícios da ressonância magnética multiparamétrica de próstata antes da primeira biópsia, antes da segunda biópsia (SBPC/ML - SBU, 2018) e nos casos de CaP é um dos critérios para incluir pacientes no protocolo de vigilância ativa e no seu seguimento (Barrett; Haider, 2017). Entretanto, a definição de progressão de doença e o custo-efetividade do método ainda não estão totalmente estabelecidos (ACR, 2019).

O diagnóstico de CaP é realizado tradicionalmente pela biópsia de próstata guiada por ultrasonografia transretal, com retirada de pelo menos 8 fragmentos sendo o habitual 12 fragmentos, 6 do lobo direito e 6 do lobo esquerdo e fragmentos adicionais de áreas suspeitas, devidamente identificados para a realização do exame anátomopatológico e descrição dos achados de cada região biopsiada (Singh *et al.*, 2004).

A primeira biópsia guiada por ultrasonografia transretal apresentou 37,7% de positividade no diagnóstico de câncer de próstata (Braun *et al.*, 2012).

Como limitação, as punções biópsias de próstata guiadas por

ultrasonografia trans retal apresentam um percentual de falso negativo de 10% a 34% (Epstein *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2004)

A partir do estabelecimento da RMmpP como método com altas taxas de suspeição de lesão neoplásica de próstata, novas tecnologias surgiram com o intuito de utilizar estas informações para aprimorar o diagnóstico de câncer de próstata sendo a biópsia de próstata orientada pelos achados na RMmpP a de maior aplicabilidade (Mussi, 2018)

Existem basicamente três métodos para realizar uma biópsia orientada por ressonância magnética (RM). O primeiro é a biópsia in bore, ou seja, dentro do aparelho da ressonância. O segundo é a fusão cognitiva com ultrassonografia, quando o radiologista avalia as imagens de RMmpP de próstata antes de realizar a ultrassonografia (US) e procura amostrar a topografia provável da lesão durante a biópsia convencional trans retal. O terceiro consiste na fusão verdadeira com RMmpP: um hardware acoplado ao equipamento de US realiza de forma automatizada e em tempo real, a fusão das imagens de US com imagens de RMmpP previamente adquiridas. Tal modalidade apresenta, hoje, a melhor relação de custo/efetividade para tal finalidade (Oberlin *et al.*, 2016).

Complicações da punção biópsia de próstata guiada por ultrasonografia transretal incluem hemospermia em 36% a 50%; hematúria em 24,5% a 22,6%; sangramento retal em 2% a 3,5%; retenção urinária em 0,2% e bacteremia em 0,8% a 3,5%. A realização de punção biópsia de próstata com cobertura antibiótica profilática com quinolonas tem diminuído a incidência de infecção. Com esta prática a incidência de prostatite bacteriana pós-biópsia tem se tornada pequena, em torno de 2% (Berger *et al.*, 2004; Raaijmakers *et al.*, 2002).

#### **1.1.5. Patologia**

No exame anatomopatológico o adenocarcinoma de próstata é a histologia mais frequente (95%), podendo ocorrer também adenocarcinoma ductal (<5%) e carcinoma neuroendócrino de pequenas ou grandes células (<1%). Há evidências de que no CaP com padrão de Gleason 4, presença de adenocarcinoma padrão cribriforme invasivo apresenta risco aumentado de recorrência bioquímica, doença metastática e morte (Kweldam *et al.*, 2016; 2018).

A patologia nos fornece além dos dados histológicos, a arquitetura da neoplasia (relação entre o tecido neoplásico e o estroma) definida originalmente pelo escore de Gleason de 1 a 5 (Gleason, 1966).

Em 2005 (Epstein *et al.*, 2005) e subsequente em 2014 a Sociedade Internacional de Patologia Urológica em inglês *International Society of Urological Pathology* (ISUP) *Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma* - ISUP 2014, aprovaram modificações no escore de Gleason com eliminação dos escores de Gleason 1 e 2 (Epstein *et al.*, 2016). Um novo sistema de classificação histológica do câncer de próstata foi desenvolvido, aprovado por consenso nesta conferência, com várias adequações na classificação original de Gleason, com base na patologia e com ampla validação em estudos posteriores (Gleason, 1966). O novo sistema atribui grupos derivados dos escores de Gleason, em graus histológicos de 1 a 5, ISUP 2014: Grau 1 (Gleason  $\leq 3 + 3$ ,  $3+3=6$ ); Grau 2 (Gleason  $3+4=7$ ); Grau 3 (Gleason  $4+3=7$ ), Grau 4 (Gleason  $4+4=8$ ,  $3+5=8$  e  $5+3=8$ ) e Grau 5 (Gleason 9 ou 10) (Epstein *et al.*, 2016; Loeb *et al.*, 2016).

A *International Society of Urological Pathology* (ISUP) *Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma* de 2019 (van Leenders *et al.*, 2020) para a classificação do CaP recomenda: descrever no laudo do exame anatomopatológico de biópsia ou peça cirúrgica a porcentagem de Gleason 4 para todos os escores de Gleason 7 ( $3+4$ ) e ( $4+3$ ); para prostatectomias radicais descrever a presença de lesões terciárias ou menores, quando apresentarem escore de Gleason 4 ou 5 que constituírem em mais de 5% do volume do tumor; não classificar carcinoma intra ductal sem que haja invasão neoplásica e so incorpora-lo no escore de Gleason se houver invasão; que seja feito comentário sobre a presença e importância do carcinoma intra ductal e cribiforme invasivos em biópsias e espécimes de prostatectomias radicais; relatar em biópsia sistemática um escore de Gleason (Grau ISUP 2014) para cada local biopsiado; relatar em biópsias direcionadas por RMmpP um escore de Gleason global (agregado) (Grau ISUP 2014) para cada lesão suspeita de Ressonância Magnética e descrever os achados histológicos benignos específicos em casos suspeitos (PIRADS 4-5) e acrescentar “biópsias direcionadas por ressonância magnética sem câncer” quando for o caso (van Leenders *et al.*, 2020).

### 1.1.6. Estratificação de risco

Na estratificação de risco de progressão do CaP a *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) (Schaeffer *et al.*, 2022) utiliza a classificação Grau histológico da ISUP 2014 (Catalona *et al.*, 2017) o estadiamento clínico da *Union for International Cancer Control* (UICC) and the *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) *Staging 8ª. ed.* de 2016 (Brierley *et al.*, 2017; Amin *et al.*, 2017), a dosagem bioquímica do antígeno prostático específico (PSA) total, a densidade do PSA (Seaman *et al.*, 1993) com ponto de corte 0,15 ng/mL/g/cm<sup>3</sup> e conforme recomendação da ISUP 2019 (van Leenders *et al.*, 2020), a quantificação dos fragmentos de biópsia quanto ao número e percentual de fragmentos acometidos. Os pacientes com CaP são estratificados com estes parâmetros em grupos de risco muito baixo, baixo, intermediário favorável, intermediário desfavorável, alto e muito alto (NCCN, 2024). Tabela 1.

Tabela 1 : Estratificação de risco inicial e investigação de estadiamento para câncer de próstata clinicamente localizado

Grupo de risco	Características clínicas		Avaliação adicional
Muito baixo	Apresenta todos os seguintes critérios: • cT1c • Grau 1 • PSA <10 ng/mL • <3 fragmentos/núcleos da biópsia prostática positivos • ≤50% de câncer em cada fragmento/núcleo • Densidade do PSA <0,15 ng/mL/g		• Os testes confirmatórios podem ser usados para avaliar a adequação da vigilância ativa
Baixo	Inclui todos os seguintes critérios, mas não se qualifica para risco muito baixo: • cT1 – cT2a • Grau 1 • PSA < 10 ng/mL		• Os testes confirmatórios podem ser usados para avaliar a adequação da vigilância ativa
Intermediário	Inclui todos os seguintes: • Sem características de grupo de alto risco • Sem características de grupo de muito alto risco • Apresenta um ou mais fatores de risco intermediários (FRIs): - cT2b – cT2c - Grau 2 ou 3 - PSA 10 – 20 ng/mL	Intermediário favorável	• Os testes confirmatórios podem ser usados para avaliar a adequação da vigilância ativa
		Intermediário desfavorável	• Imagem de tecidos moles e considere imagem óssea se forem encontradas metástases regionais ou distantes
Alto	Apresenta uma ou mais características de alto risco, mas não atende aos critérios de risco muito alto: • cT3 – cT4 • Grau 4 ou 5 • PSA > 20 ng/mL		Imagem óssea e de tecidos moles
Muito alto	Apresenta pelo menos dois dos seguintes: • cT3 – cT4 • Grau 4 ou 5 • PSA >40 ng/mL		Imagem óssea e de tecidos moles

Fonte: adaptado de *National Comprehensive Cancer Network*, 2024 (NCCN, 2024).

Tradução nossa.

Legenda: cT = estadiamento clínico (Brierley, Gospadarowicz; Wittekind, 2017) - Grau = Grau

da ISUP 2014 - ISUP = *International Society of Urological Pathology* (Epstein *et al.*, 2016) - PSA = antígeno prostático específico - < = menor - ng = nanograma - mL = mililitro - % - percentual - ≤ = menor ou igual - g = grama.

A *European Association of Urology* (EAU) / *European Association of Nuclear Medicine* (EANM) / *European Society for Radiotherapy and Oncology* (ESTRO) / *European Society of Urogenital Radiology* (ESUR) / *International Society of Geriatric Oncology* (SIOG), (EAU/EANM/ESTROESUR/SIOG: *Guidelines on screening, diagnosis, and local treatment of clinically localised prostate cancer 2020*) (Mottet *et al.*, 2021) propôs um modelo de estratificação de risco de progressão bioquímica do CaP com base na classificação original de D'Amico e colaboradores (D'Amico *et al.*, 1998). Neste modelo utiliza como parâmetros a dosagem plasmática do PSA total, o estadiamento clínico da neoplasia conforme classificação TNM (tumor, nódulo, metástase) da *Union for International Cancer Control* (UICC) and the *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) *Staging 8ª. ed.* de 2016 (Brierley *et al.*, 2017; Amin *et al.*, 2017) e o Grau histológico da *International Society of Urological Pathology* (ISUP) 2014 (Epstein *et al.*, 2016). Classifica o risco de recorrência bioquímica após tratamento cirúrgico ou radioterápico em baixo (PSA <10ng/mL e Gleason <7 (ISUP 1) e cT1–2a), intermediário (PSA: 10–20ng/mL ou Gleason 7 (ISUP 2 ou 3) ou cT2b) ou alto (PSA >20ng/mL ou Gleason >7 (ISUP 4 ou 5) ou cT2c) ou (qualquer PSA, qualquer ISUP e (cT3–4 ou cL+, estadiados por Rx ou Tomografia Computadorizada). As neoplasias de risco baixo intermediário e de alto risco com estadiamento clínico cT2c são classificadas como localizadas e as de alto risco cT3-4 ou cL+ (estadiadas com Rx ou Tomografia Computadorizada) são classificadas como localmente avançada (Mottet *et al.*, 2021).

O escore de Avaliação de Risco do Câncer da Próstata (CAPRA) da Universidade da Califórnia (São Francisco) em inglês UCSF-CAPRA *Score for 'Prostate Cancer Risk* (Cooperberg *et al.*, 2006) utiliza dados clínicos, dosagem plasmática do PSA, Graus histológicos da *International Society of Urological Pathology* (ISUP) 2014 (Epstein *et al.*, 2016), as recomendações da ISUP 2019 (van Leenders *et al.*, 2020) e o estadiamento clínico da neoplasia conforme classificação TNM (tumor, nódulo, metástase) da *Union for International Cancer Control* (UICC) and the *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) *Staging*

*Manual*, 8ª. ed. de 2016 (Brierley *et al.*, 2017; Amin *et al.*, 2017). Utiliza como parâmetros a idade do paciente (< 50 e ≥ 50 anos); PSA total no plasma no momento do diagnóstico (<6, ≥6 -10, ≥10-20, ≥20-30 e >30 ng/mL); escore de Gleason primário e secundário (ausência de escore 4 ou 5, padrão secundário 4 ou 5 e padrão primário 4 ou 5); estadió clínico (cT1 ou cT2, cT3a) e percentual dos fragmentos positivos para câncer na biópsia (<34% e >34%). Com estes parâmetros classifica o risco em baixo (0-2 pontos), intermediário (3-5 pontos) e alto (≥6 pontos) e a sobrevida livre de doença de 5 anos (Cooperberg *et al.*, 2006).

No manejo do CaP a estratificação em grupos de risco de progressão pode ser realizada de acordo com as classificações disponíveis: da NCCN (NCCN *Guidelines* versão 4.2024), D'Amico e colaboradores (D'Amico *et al.*, 1998), *European Association of Urology* (EAU) / *European Association of Nuclear Medicine* (EANM) / *European Society for Radiotherapy and Oncology* (ESTRO) / *European Society of Urogenital Radiology* (ESUR) / *International Society of Geriatric Oncology* (SIOG), (EAU/EANM/ESTRO/ESUR/SIOG: *Guidelines on screening, diagnosis, and local treatment of clinically localised prostate cancer* 2020) (Mottet *et al.*, 2021), da *American Urological Association* (AUA) / *American Society for Radiation Oncology* (ASTRO) com aval da *Society of Urologic Oncology* (SUO), (*Clinically localized prostate cancer: AUA/ASTRO Guideline* 2022) (Eastham; Boorjian; Kirkby, 2022) e o *UCSF-CAPRA Score for Prostate Cancer Risk* (Cooperberg *et al.*, 2006).

A estratificação em grupos de risco de progressão do CaP, específica de cada classificação, é a base para iniciar a discussão sobre as opções de tratamento, para orientar exames adicionais e para estabelecer a terapêutica inicial para cada grupo de risco. Reconhecem que exames moleculares, genéticos e nomogramas possam serem usados para fornecer informações adicionais para estabelecer condutas individualizadas no tratamento inicial e orientam as condutas terapêuticas pertinentes durante o seguimento (Mottet *et al.*, 2021; Eastham *et al.*, 2022; Cooperberg *et al.*, 2006).

### **1.1.7 Manejo do câncer de próstata**

O manejo do CaP parte da estratificação de risco de progressão do CaP e uma das classificações utilizadas é a da *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) (Schaeffer *et al.*, 2022). O câncer de próstata localizado pode se

apresentar, por esta classificação, em um espectro de doenças: doença localizada indolente (risco muito baixo, baixo e intermediário favorável) para os quais se pode postergar o tratamento definitivo ou seja, os pacientes são elegíveis para vigilância ativa podendo no seguimento ser indicado terapias definitivas (prostatovesiculectomia com ou sem linfadenectomia pélvica e/ou radioterapia), ainda curativas; doença localizada com indicação de tratamento definitivo (risco intermediário desfavorável e em casos selecionados de alto risco); doença localmente avançada agressiva (risco alto e muito alto) que requer tratamento intensivo (prostatovesiculectomia radical com linfadenectomia e terapia adjuvante (radioterapia com ou sem terapia de deprivação androgênica) (ADT) (Schaeffer *et al.*, 2022).

Alguns pacientes com CaP apresentam doença metastática no diagnóstico inicial ou podem desenvolver metástases após a terapia definitiva inicial com prostatovesiculectomia radical com ou sem linfadenectomia e/ou radioterapia, sem prévia terapia de deprivação androgênica (ADT) de longo prazo. Este tumor é classificado como câncer de próstata sensível à castração (CSPC) metastático. O termo sensível à castração é usado para definir pacientes que não foram tratados com terapia de deprivação androgênica (ADT) ou aqueles que não estavam em ADT no momento da progressão.

A terapia de deprivação androgênica com intensificação do tratamento é a abordagem preferida para a maioria dos pacientes com CSPC metastático. Quando a neoplasia para de responder à ADT é classificada como câncer de próstata resistente à castração (CRPC) e recomenda-se no tratamento deste grupo que a ADT seja mantida enquanto terapias sistêmicas adicionais são aplicadas sequencialmente (Schaeffer *et al.*, 2022).

Pacientes submetidos a tratamento definitivo do CaP com prostateovesiculectomia radical e/ou radioterapia, podem progredirem para recidiva bioquímica, assim considerado por consenso na literatura, PSA total no sangue no seguimento de prostatovesiculectomia radical (PR),  $>0,20$  ng/mL e mais duas medidas acima, e PSA total nadir mais 2 ng/mL no seguimento pós radioterapia. Na recidiva bioquímica se faz necessário o reestadiamento e as terapias complementares pertinentes. Alguns autores consideram recidiva bioquímica PSA  $>0,4$  ng/mL (Stephenson *et al.*, 2006; Antonarakis *et al.*, 2012).

As opções de terapia sistêmica para pacientes com câncer de próstata

sensível à castração (CSPC) metastático e câncer de próstata resistente à castração (CRPC) continuam a evoluir. As Diretrizes da NCCN versão 4.2024 incluem terapia tripla com ADT, docetaxel e 1 de 2 terapias hormonais secundárias (abiraterona ou darolutamida) para o tratamento de doença metastática sensível à castração. O painel incentiva o uso dessas opções de terapia tripla para pacientes com doença de alto volume que estejam clinicamente aptos para quimioterapia.

A doença de alto volume foi definida no estudo CHAARTED (Kyriakopoulos *et al.*, 2018) como presença de metástases viscerais e/ou  $\geq$  quatro metástases ósseas com pelo menos uma fora da coluna vertebral e da pelve.

No cenário de CRPC metastático, as diretrizes incluem o radiofármaco Lu-177-PSMA-617 como uma opção para pacientes com doença positiva para antígeno prostático específico de membrana (PSMA). Ensaios clínicos atuais em andamento são promissores para possíveis avanços futuros no tratamento do câncer de próstata metastático (Schaeffer *et al.*, 2022).

## **2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

### **2.1 Vigilância ativa no câncer de próstata**

Aproximadamente metade de todos os cânceres de próstata recém-diagnosticados são localizados e potencialmente apropriados para vigilância ativa (Cooperberg *et al.*, 2020).

A vigilância ativa é uma opção para pacientes classificados em risco muito baixo, baixo e intermediário favorável pela estratificação de risco da NCCN versão 4 de 2024 e expectativa de vida  $>10$  anos. Se a expectativa de vida for  $<5$  anos a indicação seria por observação vigilante (acompanhamento, tratando os eventos clínicos porém sem a opção de tratamento definitivo). O painel da NCCN versão 4 de 2024 reconhece que pode existir heterogeneidade biológica neoplásica principalmente no grupo de baixo risco com possibilidade de reclassificação de risco a curto prazo (Cooperberg *et al.*, 2020).

A decisão da US Preventive Services Task Force (Força-Tarefa de Serviços Preventivos dos EUA) de 2018 de atualizar o rastreamento do câncer de próstata para uma recomendação com tomada de decisão compartilhada, citou explicitamente o aumento nas taxas de vigilância ativa como um fator chave em sua reconsideração mas, também fez referência aos danos potenciais

relacionados as biópsias de vigilância seja de confirmação do diagnóstico ou de seguimento (Grossmam *et al.*, 2018).

Não existe consenso sobre a frequência ideal de avaliações de vigilância ativa considerando a história natural do CaP e a biologia altamente variável nos pacientes classificados no grupo de baixo risco (Cooperberg *et al.*, 2018).

No segmento de pacientes em vigilância ativa, os dados da literatura sugerem que avaliações clínicas sejam realizadas a cada 3 a 6 meses, dosagem sanguínea do PSA, densidade do PSA total e o toque retal a cada 6 meses, ressonância magnética multiparamétrica de próstata após 12 meses e rebiópsia confirmatória de próstata em até 12 meses do diagnóstico e posteriormente a cada 2 anos. Nos casos de reclassificação do risco deve-se considerar a conduta de tratamento definitivo (prostatovesiculectomia radical com ou sem linfadenectomia e/ou radioterapia) considerada ainda de caráter curativo (NCCN, 2024).

Exames de imagem em particular ressonância magnética multiparamétrica e biomarcadores genômicos do tumor baseados em tecido, foram propostos para ajudar a personalizar a vigilância para pacientes individuais. No entanto, esses testes são limitados pela variação interobservador (Sonn *et al.*, 2019; Greer *et al.*, 2017) e heterogeneidade do tumor (Salami *et al.*, 2018).

O *Canary Prostate Active Surveillance Study* (PASS), é um estudo de coorte multicêntrico, prospectivo de vigilância ativa, iniciado em julho de 2008 com participação de 9 centros médicos acadêmicos norte-americanos com acúmulo contínuo de participantes, com período médio de acompanhamento de 4,1 anos. Neste estudo os procedimentos de acompanhamento utilizados na vigilância ativa foram PSA a cada 3 meses, visitas clínicas a cada 6 meses e biópsias guiadas por ultrassom de 6 a 12 meses e 24 meses após o diagnóstico inicial, depois a cada 2 anos. Outros testes, incluindo ressonância magnética multiparamétrica de próstata e ensaios de biomarcadores em tecidos da biópsia, foram realizados a critério dos médicos assistentes (Newcomb *et al.*, 2016).

O tratamento definitivo para pacientes em vigilância ativa estaria indicado em reclassificações no grupo de risco utilizando a classificação de risco da NCCN Versão 4 2024, considerando-se, aumento da densidade do PSA total, aumento do número de cores biópsia positivos e do grau histológico da ISUP 2014 na biópsia de confirmação e/ou de vigilância, alterações significativas dos achados de RMmpP sugerindo progressão e exames moleculares do tumor baseado em

tecido ( com alta suspeição de progressão) (NCCN, 2024).

Estudos mostraram que entre 50% e 63% dos pacientes em vigilância ativa ficaram com segurança por, respectivamente, 10 e 7 anos de seguimento sem necessidade de tratamento definitivo (Tosoian *et al.*, 2015; Cooley *et al.*, 2021). Entretanto estudos também mostraram, no seguimento de pacientes em vigilância ativa, necessidade de tratamento definitivo, progressão da neoplasia com comprometimento linfonodal e metástases (Schaeffer *et al.*, 2022). Tabela 2.

Tabela 2: Estudos sobre vigilância ativa no câncer de próstata.

	<b>Toronto</b> 5,7,8	<b>Johns Hopkins</b> 4, 9,11	<b>UCSF</b>		<b>Canary PASS</b> <sup>14</sup>	<b>Cooley / Catalona Meta-Dataset</b> <sup>6</sup>	<b>PRIAS</b> <sup>15</sup>
			Coorte inicial <sup>12</sup>	Sem coorte <sup>13</sup>			
n. pacientes	993	1298	321	810	905	6775	5302
Média de idade	68	66	63	62	63	64	66
Fragmento(s) (Fr.)	Coorte	Média	Média	Não	(%) Coorte	(%) Coorte	(%) Coorte
Envolvido(s)	n. Fr. + ≤2	n. Fr. + = 1	% de Fr. + = 20,3%	Avaliado	n. de Fr.+ < 10% 53% 13% RI RA (NCCN)	n. de Fr. + ≤ 2 77,6%	n. de Fr. + ≤ 2 99%
	25% RI (D'Amico) <sup>18</sup>						
Média follow-up (m)	77	60	43	28	28	80	120
Conversão p/ Tratamento	36,5% (10a)	50% (10a)	24% (3a)	40% (5a)	19% (28m)	33% (6,7a)	52% (5a) 73% (10a)
Doença. Avançada	3,1% M + 1,8%	M + 0% - 15%	M + 0%	M + 0%		M + 0,4%	M + 0,2%
Linfonodos +	N + 1,3%	N + 0,08%	N + 0,02%		N + 0,02%		
Sobrevida Câncer Específica	98% (10 a)	99,9% (10 a)	100% (5 a)	100% (5 a)	100% (28 m)	99,8% (6,7 a)	>99% (10 a)
Sobrevida Global	80% (10 a)	93% (10 a)	98% (10 a)	98% (5 a)	-	-	-
<b>* Indicação de conversão para tratamento definitivo (% total da coorte)</b>							
Mudança no Grau do Tu (ISUP 2014)	9,5%	15%	38%	-	-	49	34% (5 a)/ 41% (20 a) <sup>8</sup>
Aumento do PSA	11,7%	-	26%	-	-	8,5%	-
Aumento do volume do Tu	-	-	-	-	-	7,2%	-
Preferência Pessoal	1,6%	8%	8%	-	-	5% (Ansiedade)	5%

Fonte: adaptado de Schaeffer *et al.*, 2022.

Tradução nossa.

Legenda:\* Protocolo baseado na reclassificação de risco pela(s) mudança(s) no Grau histológico da ISUP 2014 <sup>16</sup>, no número de fragmentos positivos, no estadiamento clínico do

tumor (cT)<sup>17</sup> e para alguns pesquisadores o aumento da densidade do PSA <sup>4 6</sup>.

UCSF = University of California San Francisco; PASS = Prostate Active Surveillance Study; PRIAS = Prostate Cancer Research International Active Surveillance Study; n. = número; + = positivo; RI = risco intermediário; RA = risco alto; M = metástase; N = linfonodos; a = anos; m = meses; Tu = tumor; 4 = (Tosoian *et al.*, 2015); 5 = (Klotz *et al.*, 2015); 6 = (Cooley *et al.*, 2021); 7 = (Klotz *et al.*, 2010); 8 = (Yamamoto *et al.*, 2016); 9 = (Carter *et al.*, 2007); 11 = (Tosoian *et al.*, 2011); 12 = (Dall'Era *et al.*, 2008); 13 = (Welty *et al.*, 2015); 14 = (Newcomb *et al.*, 2016); 15 = (Bokhros *et al.*, 2016); 16 = (Epstein *et al.*, 2016); 17 = (Amin *et al.*, 2017); 18 = (D'Amico *et al.*, 1998). (NCCN, 2024).

O rastreamento e manejo do câncer de próstata são complexos considerando a acurácia de cada um dos parâmetros utilizados isoladamente ou associados, na indicação de biópsia e ao fato desta neoplasia apresentar progressão heterogênea e haver nos grupos de risco de progressão, subgrupos com diferentes prognósticos e, portanto, com comportamento biológico diferente (Mcgrath *et al.*, 2016).

Os estudos mostram evidências da necessidade de se identificar novas plataformas e biomarcadores que possam acrescentar especificidade e sensibilidade às biópsias, evitando biópsias desnecessárias (sobre diagnóstico) e no manejo do CaP contribuir para indicar observação vigilante com maior segurança, evitando tratamentos radicais inadequados (sobre tratamento), com riscos inerentes de morbidades principalmente incontinência urinária, e disfunção erétil, documentadas em 15% e 40%, respectivamente, após 2 anos da prostatectomia radical (Tricoli; Schoenfeldt; Conley, 2004; Schroder *et al.*, 2009).

## **2.2 Novas tecnologias no diagnóstico e manejo do câncer de próstata**

### **2.2.1 Biomarcadores**

Marcadores moleculares ou biomarcadores têm sido publicados nos últimos anos para refinar as indicações de biópsias, evitando biópsias desnecessárias e também aprimorar o manejo do CaP evitando o sobre tratamento. Temos plataformas para indicar a biópsia inicial e/ou para repetir a biópsia; para definir entre vigilância ativa ou tratamento definitivo (prostatectomia radical ou radioterapia) após o diagnóstico e, nos casos submetidos à prostatectomia radical, para indicar terapia adjuvante. Questionamentos foram publicados, quanto às

suas acurácias, disponibilidade e acessibilidade na prática clínica. Tabela 3.

Tabela 3 - Marcadores moleculares

	Amostra	Biomarcadores	Avaliação do Teste	Pacientes Alvo	Diretrizes do teste	Autor(es)
<b>Indicar Biópsia Inicial</b>						
<b>PHI</b> Prostate Health Index (Beckman Coulter, Brea, CA)	Sangue	Níveis de PSA T, PSA L, p2PSA  PHI = (p2PSA/PSA L) x PSA T <sup>1/2</sup>	Risco de CaP de alto grau na biópsia Pontuação: 1 – 100	Idade ≥ 50 anos PSA T 4 -10 ng/mL EDRP negativo Avaliar indicação biópsia inicial	Pontuação: % de Risco CaP de alto grau 0 - 26,9: 9,8% 27 - 35,9: 16,8% 36 - 54,9: 33,3% ≥ 55,0: 50,1%	(Catalona <i>et al.</i> , 2011)
<b>Apifyn (Armune Bioscience, Kalamazoo, MI)</b>	Sangue	Níveis circulantes de 8 auto anticorpos específicos para CaP	Risco de CaP de alto grau na biópsia Pontuação: 1 - 100	PSA > 2,5 ng/mL Considerando biópsia inicial	Pontuação: Risco de CaP de alto grau 1 - 58: baixo risco ≥ 59: alto risco	(Schipper <i>et al.</i> , 2015)
<b>SelectMDx (MDx Health, Irvine, CA)</b>	Urina Pós EDRP	Expressão de DLX1 e HOXC6 Associa o resultado com: PSA sérico, DPSA, EDRP, idade e história familiar CaP	Risco percentual de doença de Gleason > 6 na biópsia Risco percentual de CaP de alto grau na biópsia	PSA elevado avaliar indicação biópsia inicial	Baixo risco: Não expressa DLX1 E HOXC6 Acompanhamento e triagem de rotina Alto risco: Expressa DLX1 e HOXC6 Realizar biópsia	(van Nest <i>et al.</i> , 2016)
<b>Repetir Biópsia PCA3 ou DD3 (Hologic, Marlborough, MA)</b>	Urina Pós EDRP	Razão de expressão de PCA3 e PSA	Risco de Gleason > 6 na biópsia Pontuação: 1 - 100	Idade ≥ 50 anos Avaliar indicação repetir a biópsia após	Pontuação: 1 - 25: baixo risco de câncer, seguro adiar a biópsia ≥ 26: alto risco de	(Gittelman <i>et al.</i> , 2013)

<b>Confirm MDx (MDxHealth)</b>	Biópsia	Intensidade de hipermetilação dos genes supressores de tumor GSTP1, RASSF1 e APC	Risco de CaP na repetição da biópsia	biópsia inicial negativa Avaliar indicação de repetir a biópsia após biópsia inicial negativa	câncer, repetir biópsia Negativo: seguro adiar a biópsia Positivo: repetir a biópsia	(Stewart <i>et al.</i> , 2013; Partin <i>et al.</i> , 2014; van Nest <i>et al.</i> , 2016)
<b>Indicar biópsia inicial ou repetir biópsia 4Kscore (OPKO Saúde, Miami, FL)</b>	Sangue	Níveis de PSA T, PSA L, PSA intacto e peptidase 2 relacionada à calicreína humana	Risco percentual de câncer de CaP de alto risco na biópsia	PSA elevado ou Toque retal alterado Avaliar indicação biópsia inicial ou repetir a biópsia após biópsia inicial negativa	Baixo risco (1% - 7,5%): Seguro adiar a biópsia com acompanhamento do PSA Alto risco (> 20%): Realizar biópsia	(Vickers <i>et al.</i> , 2008, 2010, 2010, 2010; Parekh <i>et al.</i> , 2015)
<b>MiPS Michigan Prostate Score</b>	Urina Pós EDRP	Expressão de PCA3 e TMPRSS2: ERG combinado com PSA sérico	Risco percentual de Gleason $\geq 7$ na biópsia Risco percentual de CaP de alto grau na biópsia	PSA elevado Avaliar indicação biópsia inicial ou repetir a biópsia após biópsia inicial negativa	Não fornece pontos de corte de baixo e alto risco	(Salami <i>et al.</i> , 2013; Leyten <i>et al.</i> , 2014; Tomlins <i>et al.</i> , 2016)
<b>Após a biópsia: vigilância ativa X Intervenção Oncotype DX (Saúde Genômica, Redwood City, CA)</b>	Biópsia	Expressão de 12 genes relacionados ao CaP	Probabilidade de Gleason 3 + 3 ou 3+4 e de CaP localizado em PR Risco de	CaP de muito baixo e baixo riscos (grupo de risco NCCN v2 2022)	Não fornece pontos de corte de baixo e alto risco Fornece informações patológicas (GPS) para os grupos de risco da NCCN	(Cullen <i>et al.</i> , 2015; Klein <i>et al.</i> , 2014)

			desenvolver doença agressiva	Gleason 3 + 3 ou 3 + 4 na biópsia	v2 2022	
<b>ProMark (Metamark, Waltham, MA)</b>	Biópsia	Níveis quantitativos de 8 proteínas relacionadas ao CaP	Gleason > 4 + 3, (doença não confinada ao órgão) com base apenas na pontuação do ProMark e quando combinada com a categoria de risco da NCCN v 2 2022	Gleason 3+3 ou 3+4 na biópsia	Não fornece pontos de corte de baixo e alto risco	(Shipitsin <i>et al.</i> , 2014; Blume-Jensen <i>et al.</i> , 2015)
<b>PTEN/ TMPRSS2ERG (Metamark)</b>	Biópsia	Presença ou ausência de PTEN (deleção) Presença ou ausência de TMPRSS2ERG (fusão)	Agressividade do CaP	Gleason 3+3 ou 3+ 4 na biópsia	Negativo (PTEN intacto, não rearranjo do ERG): Vigilância ativa Positivo (PTEN deleção e/ou ERG rearranjo): Tratamento definitivo	(Yoshimoto <i>et al.</i> , 2007)
<b>Prolaris</b>	Biópsia	Níveis de expressão de 31 genes associados à progressão do ciclo celular	Agressividade do CaP Score: 1-10 Mortalidade câncer específico em 10 anos	CaP na biópsia	Não fornece pontos de corte de baixo e alto risco Fornece informações patológicas (GPS) para os grupos de risco da AUA	(Cuzick <i>et al.</i> , 2015)
<b>Decipher</b>	Biópsia	Níveis de expressão de 22 genes associados ao CaP de alto risco	Risco de metástase em 5 anos Probabilidade de doença de alto grau em RP Risco de mortalidade câncer específico de 10 anos	CaP localizado	Não fornece pontos de corte de baixo e alto risco Baixo risco: vigilância ativa Alto risco: considerar tratamento adicional	(Cooperberg <i>et al.</i> , 2013; Klein <i>et al.</i> , 2017; Ross <i>et al.</i> , 2016)
<b>Após RP: Tratamento</b>						

---

**adjuvante**

<b>Prolaris (Myriad Genetics, Salt Lake City, UT)</b>	Próstata	Níveis de expressão de 31 genes associados à progressão do ciclo celular	Risco de recidiva bioquímica em 10 anos Score: 1 -10	Pacientes com CaP submetidos a PR	Não fornece pontos de corte de baixo e alto risco Fornece informações patológicas (GPS) para os grupos de risco da AUA	(Cuzick <i>et al.</i> , 2011; Cooperberg <i>Et al.</i> , 2013)
<b>Decipher (GenomeDx, San Diego, CA)</b>	Próstata	Níveis de expressão de 22 genes associados ao CaP de alto risco	Risco de metástases em 5 anos Mortalidade câncer específico de 10 anos	CaP de alto risco no exame AP ou com critérios clínicos de alto risco pós PR	Baixo risco: seguimento com PSA; Rt se PSA subir Alto risco: Rt adjuvante ou de resgate precoce com futura intensificação do tratamento se necessário	(Karnes <i>et al.</i> , 2013; Den <i>et al.</i> 2015)

---

Fonte: Adaptado de Alford *et al.*, 2017.

Tradução nossa).

Legenda: PHI = *Prostate Health Index* - índice de saúde prostática; PSA = antígeno prostático específico; PSA T = antígeno prostático específico total; PSA L = antígeno prostático específico livre; p2PSA = [-2] proPSA; EDRP = exame digital retal da próstata; CaP = câncer de próstata; alto grau = (Gleason  $\geq 7$ ); DPSA = densidade do PSA; NCCN = *National Comprehensive Cancer Network*; v4 = quarta versão; PR = prostatectomia radical; GPS = *Genomic Prostate Score* - escore do genoma prostático; AUA - *American Urological Association* - Associação Americana de Urologia.

### 2.2.2 Metabolômica

A biologia de sistemas aplicada à pesquisa do câncer engloba as ferramentas “ômicas”, que se complementam e são capazes de medir mudanças em várias entidades incluindo genes (genômica), transcritos (transcriptômica), proteínas (proteômica) e metabólitos (metabolômica). Estas plataformas fornecem uma visão geral de várias condições fisiológicas ou patológicas (Halama, 2014; He *et al*, 2012; Trock, 2011). Metabolômica é a busca global por metabólitos, que são pequenas moléculas resultantes do metabolismo de diversas substâncias. O perfil metabólico reflete diretamente o estado metabólico dos órgãos e tecidos. A metabolômica pode fornecer uma ideia do estado fisiológico de um sistema biológico e, portanto, alterações no metaboloma “normal” podem ser indicativas de doença. Essas alterações no metaboloma “normal” têm o potencial de fornecer novos marcadores diagnósticos e prognóstico de doenças, podendo orientar estratégias de tratamento individualizadas e monitorar respostas a intervenções terapêuticas (Ramautar *et al.*, 2013).

Com o aumento dos estudos utilizando abordagens metabolômicas, a Sociedade de Metabolômica (do inglês, *Metabolomics Society*) criou em 2005 o *Metabolomics Standards Initiative*, padronizou os procedimentos adotados nos estudos e publicações de trabalhos em metabolômica, com o objetivo de fornecer uma descrição clara do sistema biológico estudado e todos os componentes do estudo, bem como permitir que os dados sejam efetivamente aplicados, compartilhados e reutilizados (Canuto *et al.*, 2018).

O planejamento experimental no fluxograma de trabalho, envolve a escolha do tipo de amostra (tipo de fluido biológico, células, tecido, etc.), a definição do número de amostras que serão avaliadas em cada grupo estudado, e como essas amostras serão coletadas e armazenadas, antes de nova manipulação (Canuto *et al.*, 2018)

Um passo importante, geralmente realizado durante a coleta das amostras, é chamado de *quenching* metabólico, que se refere à interrupção imediata da atividade enzimática, através da adição de solventes orgânicos resfriados, ou do congelamento imediato das amostras com uso de gelo seco ou nitrogênio líquido. As amostras coletadas devem ser devidamente armazenadas,

para evitar degradação ou ativação de enzimas; isso pode ser alcançado estocando-se as amostras a baixas temperaturas (-80° C) é usualmente preferida. (Álvares-Sanches; Luque de Castro; Priego-Capote, 2010).

O preparo de amostra para análise metabolômica, no fluxograma de trabalho, é uma das etapas mais importantes e que demanda maior tempo de trabalho. Isso se deve a complexidade das amostras biológicas, sua heterogeneidade e a grande concentração de metabólitos presentes. Sua execução depende da abordagem metabolômica escolhida, tipo de amostra e técnicas de análise que serão de interesse no estudo (Álvares-Sanches; Luque de Castro; Priego-Capote, 2010).

Para metabolômica global, um preparo de amostras mínimo e não-seletivo é, em geral, preferido. Para amostras líquidas, precipitação de proteínas e remoção de sais através da adição de solventes orgânicos são comumente empregadas. Adicionalmente, uma filtração ou diluição também são executadas (Canuto *et al.*, 2018).

O preparo de amostra deve ser compatível com a técnica de análise empregada (Canuto *et al.*, 2018).

Quando a eletroforese capilar é aplicada, as amostras preferencialmente devem estar em fase aquosa, sendo necessária a evaporação completa dos solventes orgânicos e posterior ressuspensão do resíduo em água (Kuehnbaum *et al.*, 2015).

Para análises por cromatografia gasosa as reações de derivatização, que convertem os analitos em espécies voláteis nas temperaturas de trabalho, são frequentemente empregadas (Garcia; Barbas, 2011).

Experimentos conduzidos por ressonância magnética necessitam de diluição dos extratos em solventes deuterados (Canuto *et al.*, 2018).

Sequencialmente ao preparo de amostras, amostras controle de qualidade em inglês, *quality control* (QC), que são a mistura de volumes iguais de todas as amostras envolvidas no estudo (todos os grupos avaliados), devem ser preparadas. O objetivo dos QCs é avaliar o desempenho e a estabilidade instrumental durante a aquisição de dados, uma vez que a amostra QC é avaliada em intervalos pré-estabelecidos, sendo sua leitura intercalada à das amostras, durante toda a sequência analítica (Dunn *et al.*, 2012; Theodoridis *et*

*al.*, 2012).

Cobrir todo o metaboloma de um organismo biológico não é uma tarefa fácil, uma vez que existe uma grande diversidade química de metabólitos, com concentrações variadas. Não é possível, portanto, encontrar uma única técnica analítica capaz de fazê-lo (Kuehnbaum; Britz-McKibbin, 2013; Villas-Boas; Bruheim, 2007).

Assim, a aquisição dos dados dos estudos metabolômicos, vem sendo realizada com o uso de multiplataformas de análise, que proporcionam maior cobertura em termos de substâncias químicas detectadas e, conseqüentemente, proporcionam um maior entendimento biológico do metabolismo estudado (Villas- Boas; Bruheim, 2007).

Ferramentas poderosas de análise como a ressonância nuclear magnética (NMR, do inglês, *nuclear magnetic resonance*) (Beckonert *et al.*, 2007; Ludwig; Viant, 2010) e a espectrometria de massas (MS, do inglês, *mass spectrometry*) (De Raad; Fischer; Northen, 2016), que fornecem informações estruturais de diversas classes químicas, são as técnicas analíticas mais empregadas nos estudos metabolômicos. Menos frequentemente, podem ser encontradas aplicações utilizando infravermelho por transformada de Fourier (FTIR, do inglês, *Fourier transform infrared spectroscopy*), que demonstra grande potencial por ser uma técnica de elucidação estrutural de baixo custo, simples e não destrutiva (Dias *et al.*, 2016).

A espectrometria de massa é a técnica de análise mais usada na metabolômica, uma vez que proporciona análises rápidas, com alta sensibilidade e seletividade (Kuehnbaum; Britz-McKibbin, 2013). Pode ser usada através da infusão direta dos extratos (DIMS, do inglês, *direct infusion mass spectrometry*), que muitas vezes dificulta a análise por problemas de supressão de ionização, ou ainda pode ser utilizada através da ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-MS, do inglês, *matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry*), esta última bastante aplicada especialmente na análise de compartimentos celulares (Han *et al.*, 2008; Mirnezami *et al.*, 2014).

Neste contexto, a espectrometria de massas (MS) é utilizada para detectar, quantificar e caracterizar um grande número de compostos simultaneamente, medindo sua massa e identificando sua estrutura química. A técnica consiste em

ionizar moléculas simples ou estruturas complexas, e separar íons de forma eficiente com base em diferentes razões massa/carga ( $m/z$ ). A determinação do peso molecular exato dos componentes da amostra é usada para identificar compostos desconhecidos e determinar a estrutura e propriedades químicas de moléculas (Silverstein; Webster; Kiemle, 2005).

Os constantes problemas de supressão de ionização dos sinais obtidos nas análises por DIMS, decorrente de matrizes complexas, são contornados através do acoplamento desta com técnicas analíticas de separação, como a cromatografia gasosa (GC) em inglês, *gás chromatography*), a cromatografia líquida (LC) em inglês *liquid chromatography* de alta eficiência e a eletroforese capilar (CE) em inglês, *capillary electrophoresis* (Kuehnbaum; Britz-McKibbin, 2013). Além disso, a informação de tempo de retenção, ou migração do metabólito previamente separado, auxilia na comprovação de identificação do metabólito, com uso de padrões analíticos autênticos (Álvares-Sanches; Luque de Castro; Priego-capote, 2010).

Atualmente, a cromatografia líquida e espectrometria de massa (CLAE-EM) vem sendo cada vez mais aplicada nos estudos envolvendo análises metabolômicas (Forcisi *et al.*, 2013; Kloos *et al.*, 2013; Theodoridis *et al.*, 2012). É uma técnica analítica que apresenta alta robustez, sensibilidade e seletividade, além de ser de fácil operação. (Xiayan; Legido-Quigley, 2008). A LC-MS é considerada uma técnica abrangente no que se refere à classe de compostos a serem analisadas, devido à grande variedade de fases estacionárias disponíveis, além dos diferentes modos de separação, como a eluição em fase reversa (fundamentalmente partição), com ou sem pareamento iônico, interação hidrofílica, e troca iônica (Canuto *et al.*, 2018).

A eletroforese capilar e espectrometria de massa vem sendo usada como técnica complementar a cromatografia líquida e espectrometria de massa (CLAE-EM) e cromatografia gasosa e espectrometria de massa (CG-EM), (Hirayama; Wakayama; Soga, 2014; Ramautar *et al.*, 2015) pois promove a separação de compostos iônicos polares. Possui alta resolução e curtos tempos de análise. Além disso, utiliza volumes de injeção da ordem de nL, sendo vantajoso quando se trabalha com fluidos biológicos coletados em pequenas quantidades, como urina de rato e salivade animais, por exemplo. Contudo, apresenta problemas de

repetibilidade e sensibilidade, este último devido à diluição das amostras pelo uso de líquido auxiliar no acoplamento com MS. Novas tecnologias de interfaceamento CE-MS, desenvolvidas sem uso de líquido auxiliar (do inglês, *sheathless*), estão sendo desenvolvidas, promovendo melhora de até duas ordens de grandeza nos limites de detecção de algumas análises (Ramautar *et al.*, 2012).

Em resumo, os principais componentes de um espectrômetro de massas são: 1) Inserção da amostra: direta (seringa acoplada a uma bomba de infusão) a equipamentos de cromatografia a gás (GC) ou líquida (CLAE); 2) Fonte de ionização: transforma amostras não carregadas em espécies carregadas (íons). Existem várias técnicas de ionização, dependendo da fase (sólida, líquida, gasosa) da amostra. 3) Analisadores de massa: contém campos elétricos e magnéticos, que exercem forças sobre os íons que viajam por esses campos, aumentando ou diminuindo a velocidade de uma partícula carregada e mudando a direção da trajetória do íon. A magnitude da deflexão da trajetória do íon em movimento depende de sua relação  $m/z$ ; 4) Detectores: registra a abundância de cada tipo de íon para determinar a composição do elemento químico, e transforma o sinal químico em sinal elétrico; 5) Controladores: softwares que gerenciam e processam a aquisição de dados transformando o sinal elétrico em gráficos como espectros de massa (Gates *et al.*, 2007).

Neste estudo, as análises foram realizadas usando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) hifenizada para um espectrômetro de massa quadrupolo de tempo de voo (Q-TOF) de alta resolução com fonte de ionização por eletro spray (ESI). A cromatografia líquida permite automação total para análise em grande escala e fornece maior sensibilidade, seletividade e maior capacidade de determinação estrutural. O espectrômetro de massa Q-TOF oferece alta eficiência de transmissão de íons, velocidade de varredura mais rápida e alta sensibilidade (Schneider *et al.*, 2016; Lehmann, 2017). O ESI permite a análise de amostras dissolvidas em solventes em um fluxo contínuo, onde a solução do analito é pulverizada de um bico de agulha e colocada em alta tensão. Os íons são formados quando as gotas do spray esfriam pela rápida evaporação do solvente em uma região de alto vácuo do espectrômetro de massa. É um método que permite a ionização de moléculas lábeis e termicamente instáveis, e funciona bem tanto para biomoléculas pequenas quanto para as grandes (Gates *et al.*, 2007;

Lehmann, 2017)

O CaP é uma doença de grande interesse do ponto de vista metabólico. Desregulações metabólicas no ciclo do ácido tri carboxílico (TCA), ácido graxo, aminoácido, purina, histidina, creatina, glicina e serina, e no metabolismo da treonina foram descritas em vários estudos ao analisar o perfil metabólico sérico de pacientes com CaP (Gómez-Cebrián *et al.*, 2019).

Vários estudos mostraram que as células prostáticas saudáveis são caracterizadas por uma diminuição da oxidação do citrato e do metabolismo dentro do ciclo do ácido tri carboxílico (TCA), resultando no acúmulo de citrato (Eidelman *et al.*, 2017) e pela dependência da oxidação da glicose para produção de energia (Lima *et al.*, 2018). As células benignas da próstata acumulam zinco, resultando na inibição da m-aconitase (ACO), enzima que catalisa a isomerização do citrato no ciclo do (TCA) (Eidelman *et al.*, 2017). No entanto, quando as células da próstata sofrem transformação maligna, sua capacidade característica de acumular zinco é perdida, levando à ativação do TCA. Além disso, foi demonstrado que o CaP precoce não exibe o efeito Warburg (Giunchi *et al.*, 2019), contando com lipídios e outras moléculas energéticas para produção de energia, mas não com a respiração aeróbica (Sadeghi; Karami-Tehrani; Salami, 2015; Twum-Ampofo *et al.*, 2016). Neste contexto, deve-se notar que várias alterações metabólicas também foram identificadas no tecido do CaP em comparação com o tecido normal, incluindo aumento de colina (Awwad *et al.*, 2012) e sarcosina (Sreekumar *et al.*, 2009) e diminuição dos níveis de poliamina e citrato (Giskeødegård *et al.*, 2013; Zabala-Letona *et al.*, 2017). No entanto, a relevância clínica de algumas dessas alterações permanece controversa (como as alterações nos níveis de sarcosina no CaP). *devido aos* resultados contraditórios relatados em diferentes estudos (Gómez-Cebrián *et al.*, 2019)

O estudo de Huang e colaboradores (2017), analisou em amostras de soro de controles (n = 200) e de pacientes com CaP classificados de acordo com o estágio do tumor (T2: n. = 71, T3: n. = 51, T4: n. = 15), os metabólitos associados ao risco de serem diagnosticados em cada estágio. Histidina e metabólitos relacionados à uridina foram associados ao risco de estágio T2. Glicerofosfolípidos e lipídios primários de ácidos biliares mostraram correlações inversas com o estágio T3, enquanto as esfingomielinas foram positivamente

associadas ao risco de T3. Ácido biliar secundário, esteroides sexuais, histamina e aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA) foram associados ao risco de T4, enquanto citrato e fumarato foram inversamente correlacionados (Huang *et al.*, 2017).

Lin e colaboradores (2017), investigaram a correlação entre o lipidoma plasmático e pacientes com CaP resistente à castração (CRPC). Uma assinatura de três lipídios compreendendo ceramida d18:1/24:1, esfingomiéline d18:2/16:0 e fosfatidilcolina 16:0/16:0, foi associada a mau prognóstico neste estudo e posteriormente validada em um coorte independente de 63 pacientes com CRPC. Os resultados também revelaram uma associação entre a assinatura destes lipídios no soro dos pacientes e o tempo de sobrevida global. Onze dos 63 pacientes da coorte de validação que exibiram a assinatura destes lipídios, tiveram tempo médio de sobrevida global significativamente menor do que aqueles que não exibiram essa assinatura (11,3 vs. 21,4 meses) (Lin *et al.*, 2017).

### **2.2.3 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier-*Fourier transform infrared spectroscopy* (FTIR).**

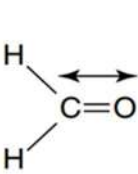
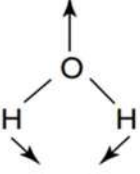
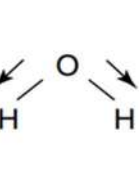
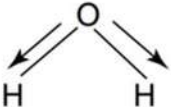
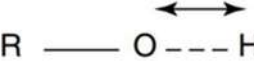
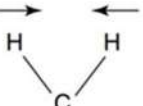
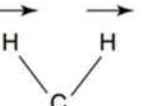
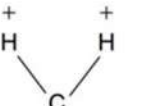
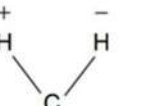
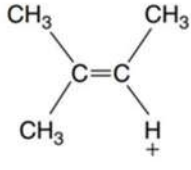
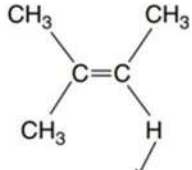
A reflexão total atenuada do inglês *attenuated total reflection* (ATR) tornou-se a técnica padrão para a espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier em inglês *Fourier transform infrared* (FTIR) *espectroscopy*. A luz infravermelha passa por um cristal de um determinado material com índice de refração maior que o da amostra (diamante, selenito de Zn ou Germânio) e interage com a amostra, que é pressionada sobre o cristal. As moléculas da amostra absorverem luz na região infravermelho do espectro eletromagnético, convertendo-a em vibrações moleculares. Portanto Esta técnica é um método de espectroscopia vibracional usado para análise qualitativa e estrutural que identifica moléculas com base em sua absorção no infravermelho (Caixeta *et al.*, 2020; Bel'Skaya; Sarf; Makarova, 2018).

Na amostra o comprimento de onda da radiação infravermelho incidente absorvida depende dos átomos envolvidos e da força de quaisquer interações intermoleculares. Alterações no momento de dipolo elétrico de uma molécula durante a vibração resultam em uma molécula ativada por infravermelho, enquanto a espectroscopia de infravermelho é quantificada e diretamente

correlacionada com a sua composição bioquímica. Quanto maior a mudança no momento de dipolo elétrico, mais intensa será a banda de absorção de infravermelho. Os compostos químicos absorvem a radiação infravermelho e as frequências e intensidades das bandas infravermelho absorvidas caracterizam o material e seu espectro infravermelho pode ser usado para identificar e quantificar uma substância específica em uma amostra desconhecida. O espectro final de absorção infravermelho de uma molécula específica é chamado de "impressão digital" (*fingerprint*) da amostra) (Clemens *et al.*, 2014; Ellis; Goodacre, 2006; Movasaghi; Rehman; Ur Rehman, 2008; Putzig *et al.*, 1994; Stuart, 2004).

A radiação infravermelha absorvida causa vibração nos grupos funcionais de diferentes maneiras, como estiramento, flexão, deformação ou vibrações combinadas, envolvendo mudanças principalmente no comprimento de ligação (alongamento) ou no ângulo de ligação (flexão). Se uma molécula tiver átomos terminais semelhantes, as ligações podem se alongar em fase (alongamento simétrico) ou fora de fase (alongamento assimétrico). As vibrações de flexão incluem tesoura (ou deformação), balanço, abano e torção (Figura 1). No caso de átomos terminais diferentes, as vibrações terão proporções variáveis de movimento de alongamento de acordo com a força das ligações entre os átomos e mudanças no momento de dipolo elétrico durante a vibração (Ellis; Goodacre, 2006; Stuart, 2004).

Figura 1: Tipos de vibrações nos grupos funcionais

Tipos de vibrações: Alongamento e Flexão			
			
Alongamento	Flexão	Alongamento	
Vibrações: Alongamento Simétrico e Assimétrico			
			
Alongamento Simétrico	Alongamento Assimétrico		
Vibrações: Diferentes tipos de Flexão			
			
Tesoura	Balanço	Abano	Torção
Vibrações: Flexão fora do plano e no plano			
			
Flexão fora do plano	Flexão no plano		

Fonte: adaptado de Stuart, 2004.

Tradução nossa.

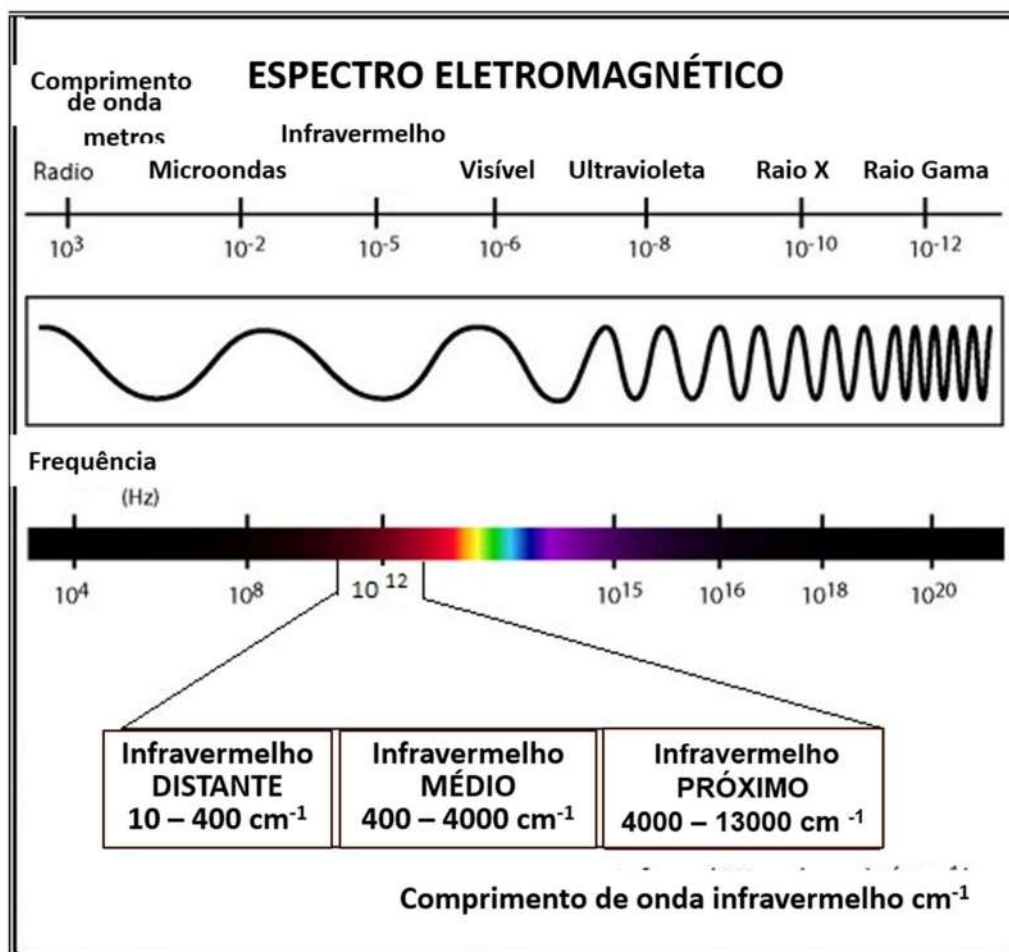
A região do infravermelho do espectro eletromagnético corresponde à faixa de número de onda entre  $13\,000\text{ cm}^{-1}$  (limite superior, junto ao visível) e  $10\text{ cm}^{-1}$  (limite inferior, início das micro-ondas) (Figura 2) e é convencionalmente dividida em infravermelho próximo em inglês *near-infrared* (NIR) ( $13.000$  a  $4.000\text{ cm}^{-1}$ ), infravermelho médio em inglês *mid-infrared* (MIR) ( $4.000$  a  $400\text{ cm}^{-1}$ ) e infravermelho distante em inglês *far-infrared* (FIR) ( $400$  a  $10\text{ cm}^{-1}$ ) (Barth, 2007; Huck, 2016).

A espectroscopia NIR basicamente está associada a uma impressão digital ou espectro específico como resultado da absorção de partes da radiação

infravermelho recebida por amostras sólidas, líquidas ou gasosas. Os grupos funcionais (C-H, C-O, C=O, N-H e O-H) quando excitados apresentam estiramento, flexão, deformação e vibração em tesoura dando tanto parâmetros qualitativos e quantitativos, como parâmetros físico-químicos. No entanto, os harmônicos ou combinações das bandas de alongamento fundamentais resultam em fraca intensidade e bandas sobrepostas.

Em contraste, a região *MIR* (4.000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ ) contém apenas vibrações fundamentais (“assinaturas”) de amostras biológicas com um espectro mais claro, picos nítidos e informações muito ricas que permitem a identificação de detectores ou biomarcadores altamente sensíveis. As regiões FIR são menos utilizadas, mas também fornecem informações relevantes sobre átomos pesados, vibrações do esqueleto molecular, torções moleculares e vibrações da rede cristalina (Barth, 2007; Ellis; Goodacre, 2006; Huck, 2016; Stuart, 2004).

Figura 2: Espectro de ondas eletromagnéticas

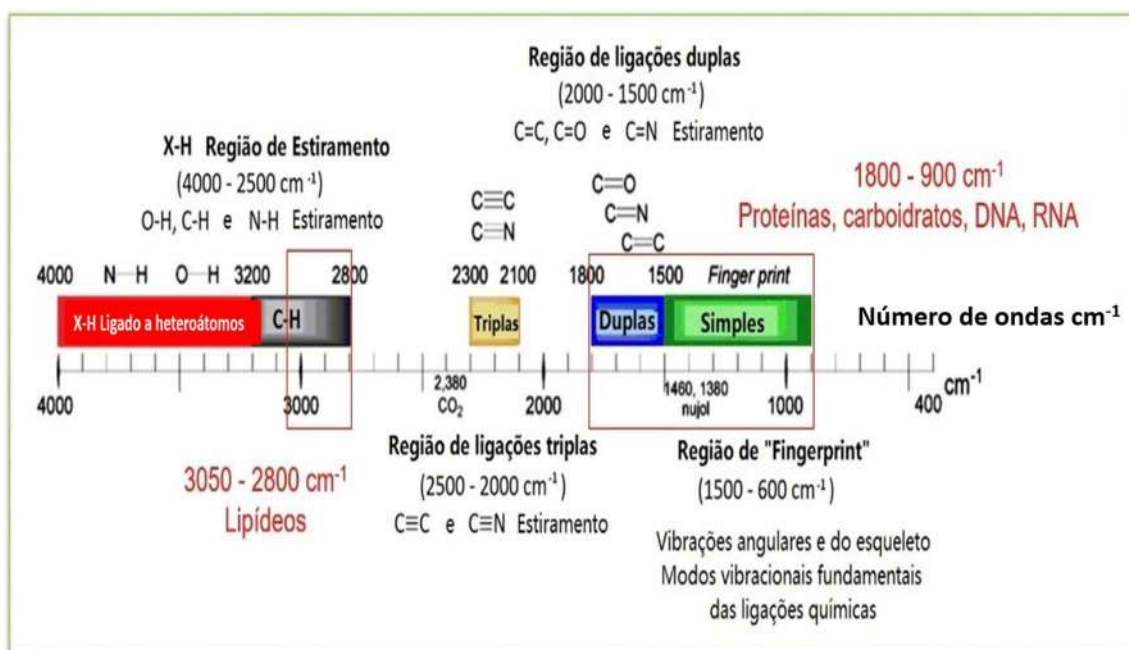


Fonte: adaptado de Noreen *et al.*, 2012.

Tradução nossa.

Didaticamente, o espectro *MIR* ( $400 - 4.000\text{ cm}^{-1}$ ) pode ser organizado em quatro regiões principais (Figura 3): a região da impressão digital ( $600 - 1.500\text{ cm}^{-1}$ ), a região de ligação dupla ( $1.500 - 2.000\text{ cm}^{-1}$ ), a região de ligação tripla ( $2.000 - 2.500\text{ cm}^{-1}$ ) e a região de alongamento X-H ( $2.500 - 4.000\text{ cm}^{-1}$ ).

Figura 3: Absorções de ligações em moléculas orgânicas nas regiões do MIR ( $4.000 - 400\text{ cm}^{-1}$ ).



Fonte: adaptado de Noreen *et al.*, 2012.

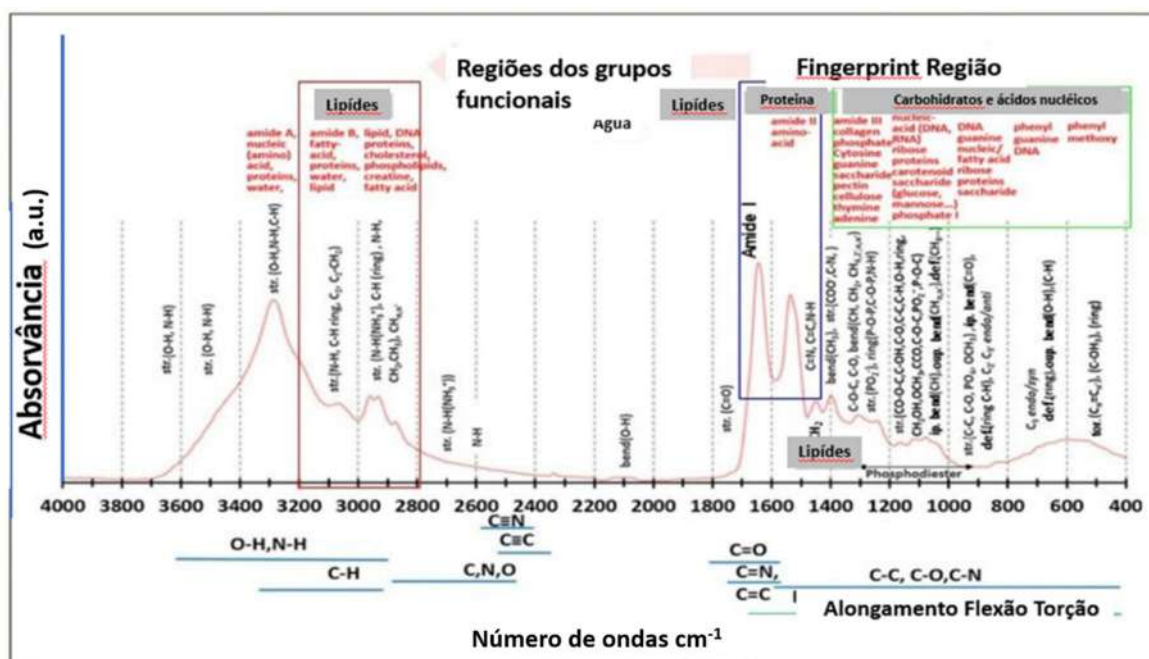
Tradução nossa.

O espectro de uma molécula pode ser formado por movimentos vibracionais complexos que podem resultar em cem ou mais bandas de absorção, sem a necessidade de identificar a grande maioria dessas bandas. O espectro final pode ser considerado uma "impressão digital" (*fingerprint*) da molécula e, portanto, esta região é chamada de região de impressão digital ( $650 - 1.500\text{ cm}^{-1}$ ), importante para amostras biológicas, e contém as principais ligações químicas como flexão e vibrações esqueléticas. A região de ligação dupla ( $1.500 - 2.000\text{ cm}^{-1}$ ) é devida ao alongamento  $\text{C}=\text{C}$ ,  $\text{C}=\text{O}$  e  $\text{C}=\text{N}$ , e contém regiões importantes como amida I / amida II região de ( $1.500 - 1.750\text{ cm}^{-1}$ ).

As absorções de alongamento de ligação tripla ( $2.000 - 2.500 \text{ cm}^{-1}$ ) resulta em uma força forte e constante das ligações. As ligações  $\text{C}\equiv\text{C}$  absorvem radiação infra red (IR) entre ( $2.050$  e  $2.300 \text{ cm}^{-1}$ ), enquanto as ligações  $\text{C}\equiv\text{N}$  ocorrem em ( $2.200 - 2.300 \text{ cm}^{-1}$ ). Além disso, as vibrações fundamentais na região de ( $2500 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ ) são geralmente devidas ao alongamento  $\text{O}-\text{H}$ ,  $\text{C}-\text{H}$  e  $\text{N}-\text{H}$ . Os grupos funcionais de uma amostra podem ser identificados devido à sua localização no espectro (Baker *et al.*, 2014; Ellis; Goodacre, 2006; Movasaghi; Rehman; Ur Rehman, 2008; Stuart, 2004).

As informações espectrais mais relevantes podem ser atribuídas às famílias moleculares, representadas na Figura 4. Os lipídios e cadeias de ácidos graxos estão localizados em ( $2.800 - 3.050 \text{ cm}^{-1}$ ), as proteínas são encontradas em ( $900 - 1.750 \text{ cm}^{-1}$ ) e os sacarídeos estão nas regiões ( $900 - 1.200 \text{ cm}^{-1}$ ) (Noreen *et al.*, 2012).

Figura 4: Famílias moleculares e suas localizações na região MIR ( $4.000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ ).



Fonte: adaptado de Senevirathna *et al.*, 2021.

Tradução nossa.

A espectroscopia FTIR é um método vibracional e o estudo da absorção de ondas eletromagnéticas na região MIR ( $4.000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ ) é amplamente utilizado

para analisar amostras biológicas (Andrew Chan; Kazarian, 2016). O processo se inicia com o uma fonte emitindo radiação eletromagnética no infravermelho 'que passa por um interferômetro. O interferômetro de Michelson usado na espectrometria FTIR consiste em dois espelhos planos perpendiculares, um dos quais pode se mover perpendicularmente ao plano.

A radiação passa pelo interferômetro para a amostra e chega a um detector. O sinal é então amplificado e a interferência de alta frequência é eliminada por um filtro. Os dados são convertidos para a versão digital por um conversor analógico-digital, sendo transferidos para o computador para transformação de Fourier. Figura 5. (Stuart, 2004).

Figura 5: Componentes básicos de um espectrômetro



Fonte: adaptado de Stuart, 2004.

Tradução nossa.

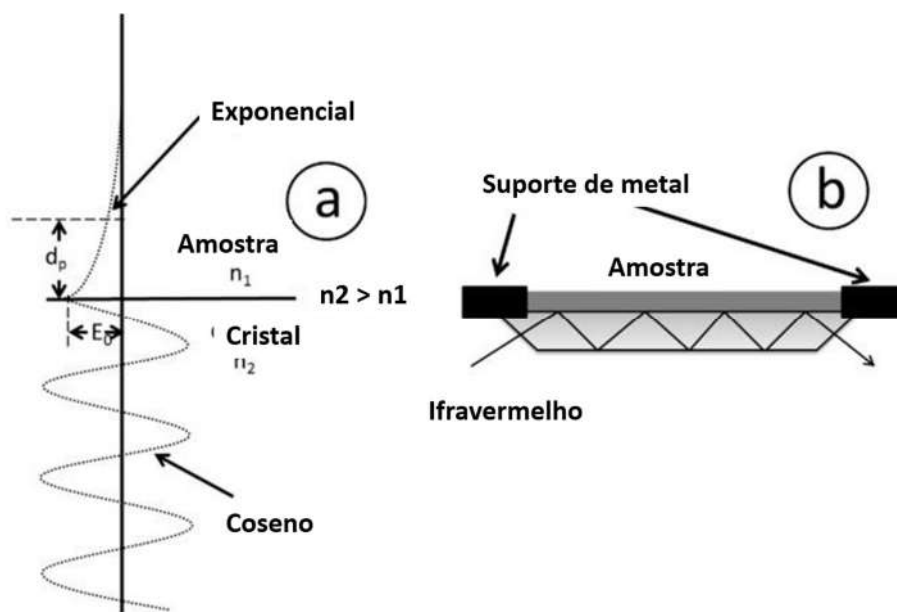
A intensidade da luz medida pelo interferômetro de Michelson é relativa à posição do espelho em movimento e resulta no interferograma, que é a primeira transformada de Fourier do espectro. Uma segunda transformada de Fourier, feita a transformada de Fourier inicial, extrai por métodos matemáticos as frequências individuais do interferograma para representação final em um espectro de infravermelho (Beekes; Lasch; Naumann, 2007).

A configuração do dispositivo para aquisição de espectros FTIR pode ser feita de diversas formas e as mais utilizadas são: transmissão, trans flexão ou reflexão total atenuada (ATR). A análise espectral por reflexão geralmente é mais utilizada em relação às de transmissão, pois os espectros obtidos por transmissão devem ser corrigidos computacionalmente devido à ocorrência de interferências físicas uma vez que a radiação infravermelha passa pela amostra antes de chegar ao detector (Kazarian; Chan, 2013). No modo de trans flexão, a detecção da radiação infravermelha absorvida ocorre após ela ter sido transmitida através da amostra, refletida e retransmitida de volta ao material. Como resultado, há a formação de ondas estacionárias perpendiculares à superfície da amostra, que causam alterações espectrais não relacionadas à bioquímica do material (Bunaciu

*et al.*, 2015; Lima *et al.*, 2018).

A técnica reflexão atenuada total em inglês *attenuated total reflection (ATR)* opera sobre o fenômeno da reflexão interna total. A amostra é colocada em contato direto com um cristal (diamante, germânio, selenito de zinco ou iodeto de tálio) com índice de refração maior do que a amostra, induzindo múltiplas reflexões internas da radiação incidente, que é atenuada e penetra na amostra como uma onda evanescente (Figura 6a). A onda evanescente passa pelo detector e fornece um único espectro, que representa o sinal médio da área de amostra pela qual a luz passou (Figura 6b). A profundidade de penetração da radiação na amostra pode ser controlada alterando o ângulo de incidência da radiação e permite a medição do estado líquido, sólido ou gasoso (Barth, 2007; Bunaciu *et al.*, 2015; Clemens *et al.*, 2014; Huck, 2016; Lima *et al.*, 2018).

Figura 6: Reflexão atenuada total (ATR)



Fonte: adaptado de Huck, 2016.

Tradução nossa.

Legenda: (a) Ilustração da onda evanescente; (b) princípio da reflexão total atenuada (ATR).  $d_p$  = profundidade da onda evanescente;  $n$  = índice de refração.

O espectro obtido pela análise ATR-FTIR pode ser diferenciado, através da primeira e segunda derivadas, ou suavizado com utilização de filtros de ruídos

para reduzir interferências e aumentar a precisão da análise (Stuart, 2004).

Um dos fluxos de pré-processamento seria sequencialmente: suavização inicial (filtro Savitzky–Golay, Suavização Gaussiana etc.); correção de baseline, se necessário (p. ex. remoção de linha de base por ajuste polinomial); aplicação de derivadas (1ª. destaca as mudanças de inclinação no espectro) (2ª. destaca ainda mais a curvatura, separando picos muito próximos) e normalização (s Min–Max, Standard Score, etc.) para comparar intensidades entre espectros. A sequência (Suavização inicial → 2. Correção de baseline → 3. Cálculo de derivadas (1ª/2ª) → 4. (Opcional) suavização leve → 5. Normalização.) maximiza a clareza dos picos, corrige distorções e prepara seus dados para análises quantitativas e qualitativas mais precisas (Huck, 2016).

ATR-FTIR não requer substrato especial ou preparação de amostra, é simples, rápido, de baixo custo, livre de reagentes, permite a detecção rápida e não invasiva de alterações bioquímicas no nível molecular e pode ser usado em uma variedade de amostras biológicas como tecidos, células, micro-organismos, unhas, cabelos, sangue e secreções humanas (saliva, urina, fezes, lágrimas, cera de ouvido, muco nasal, muco vaginal, leite materno e sêmen) (Bel'Skaya *et al.*, 2018; Das *et al.*, 2021; Depciuch *et al.*, 2016; Elkins, 2011; Orphanou *et al.*, 2015).

Considerando que uma molécula é caracterizada por sua estrutura única, cada biomolécula exibirá seu próprio espectro ATR-FTIR ("fingerprint"), que representa o modo vibracional dessa ligação estrutural (Ellis; Goodacre, 2006; Movasaghi *et al.*, 2008; Stuart, 2004). A sensibilidade do método a pequenas mudanças na composição bioquímica da amostra torna o ATR-FTIR a tecnologia ideal como ferramenta diagnóstica e promissora, bem como método prognóstico (Bel'Skaya *et al.*, 2018; Kazmer *et al.*, 2022).

Na área médica, a espectroscopia ATR-FTIR tem sido amplamente utilizada para fins de monitoramento, diagnóstico e prognóstico em diferentes condições patológicas, como o câncer (Bunaciu *et al.*, 2015; Butler *et al.*, 2019; Ferreira *et al.*, 2020), diabetes (Caixeta *et al.*, 2020), doença renal crônica (Rodrigues *et al.*, 2019), artrite (Ellis; Goodacre, 2006), transtornos depressivos (Depciuch *et al.*, 2016), hepatite, vírus da imunodeficiência humana infecção (Lukose; Chidangil; George, 2021), entre muitos outros.

#### 2.2.4 Inteligência artificial e aprendizado de máquina

Os dados gerados pelas análises metabolômicas são abundantes e complexos e, por isso, ferramentas adequadas de tratamento de dados devem ser empregadas no processamento destes, para evitar erros e manter a integridade das variações biológicas inspecionadas (Sugimoto *et al.*, 2012).

Para análise metabolômica global, aplicam-se etapas de alinhamento, agrupamento, correção do tempo de retenção e de linha de base, deconvolução espectral, e normalização. Existem atualmente, diversos softwares livres e licenciados para tratamento de dados metabolômicos (Ludwig; Günther, 2011; AMDIS, 2022). Em seu estudo, Misra e van der Hooft (2016) descrevem uma série desses softwares de tratamento de dados, e bases de dados para correlações de massas e rotas metabólicas (Misra; van der Hooft, 2016). Um trabalho interessante de Sugimoto e colaboradores (2012) compara diversos softwares para análise metabolômica de dados obtidos por MS.

A inteligência artificial em inglês *artificial intelligence* (IA) consiste em mecanismos computacionais que dependem do comportamento humano para resolver problemas. Os sistemas de IA usam dados disponíveis publicamente ou plataformas privadas que servem como treinamento para algoritmos de IA. O aprendizado de máquina em inglês *machine learning* (ML) é um ramo da IA em que os sistemas de computador 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 (Samuel, 1959; Schleder; Fazzio, 2021). Algoritmos de ML têm mostrado potencial para contribuir na integração de dados, extração de informações e identificação de relações complexas e não lineares, aprimorando modelos de desempenho preditivo desenvolvidos para auxiliar a tomada de decisão em saúde (Topol, 2019).

Em geral, ML pode ser dividido em três categorias: supervisionado, não supervisionado e reforçado (Wang *et al.*, 2022)

A análise estatística é usada para extrair a informação relevante dos dados, através de métodos de análise multivariada e univariada. Nas análises multivariadas, a classificação e discriminação de entidades ou metabólitos

responsáveis por diferenciar os grupos de amostras são realizadas através da avaliação do conjunto da matriz de dados extraídos na etapa de trabalho anterior. São aplicados métodos não supervisionados, como análise de componentes principais em inglês, *principal component analysis (PCA)*, e métodos supervisionados, como análise discriminante por mínimos quadrados parciais em inglês, *partial least squares discriminant analysis (PLS-DA)*, e projeções ortogonais para estruturas latentes em inglês, *orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA)*. Já nas análises univariadas, as variáveis de estudo (entidades ou metabólitos) são avaliadas separadamente e, ao contrário dos métodos multivariados, são desprezadas as relações entre elas. Testes estatísticos como ANOVA, teste *t* de Student, ou de Mann-Whitney são frequentemente utilizados (Sugimoto *et al.*, 2012).

O aprendizado supervisionado usa um conjunto de dados rotulado para treinar o algoritmo, estabelecendo a relação entre as amostras e seus rótulos. Esse modelo permite que os algoritmos aprendam com dados históricos ou de treinamento e os apliquem a entradas desconhecidas para derivar a saída correta. O aprendizado não supervisionado é usado para identificar novos padrões e é executado em dados não rotulados. O modelo encontra feições e padrões de forma independente, utilizando clusters pela similaridade em suas características, ou outra organização sem classificação prévia. O aprendizado por reforço é um aprendizado baseado em comportamento, no qual um agente autônomo aprende sobre seu ambiente interativo por meio de um sistema de recompensas programadas (Wang *et al.*, 2022).

O aprendizado supervisionado pode ser dividido em classificação e regressão. A classificação abrange dados de saída definidos como um conjunto finito categórico ou nominal, enquanto na regressão, os modelos preveem uma saída numérica contínua com base nos preditores (Schleder; Fazzio, 2021).

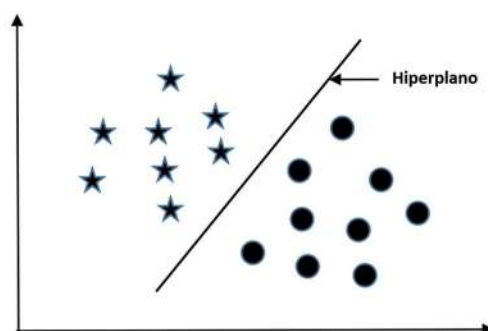
O processo de aprendizado supervisionado passa pela etapa de treinamento e posterior validação do modelo preditivo. No processo de treinamento, um algoritmo de aprendizado é aplicado a uma parte do conjunto de dados para criar uma função que mapeia as características das variáveis preditoras em relação ao resultado desejado. A fase de validação consiste em aplicar a função para verificar o desempenho do algoritmo na porção do conjunto

de dados que não foi utilizada no treinamento. Este processo é repetido várias vezes para se obter o comportamento médio do modelo, sendo a função considerada adequada se tiver um percentual de acerto ou métricas estatísticas aceitáveis na etapa de validação (Mitchell, 1997).

A comparação de algoritmos com diferentes características permite avaliar diferentes desempenhos na busca pelo melhor modelo preditivo. Além disso, a escolha de um classificador deve considerar custo computacional, interpretabilidade do modelo e plausibilidade clínica. Vários algoritmos de aprendizado de máquina supervisionado podem ser usados para previsão de doenças, como regressão logística, árvore de decisão, *random forest*, máquina de vetores de suporte (SVM), entre outros (Uddin *et al.*, 2019).

O modelo SVM tem se mostrado superior a outras técnicas de regressão, pois encontra soluções globais lineares e não lineares e vetores de suporte de entrada de alta dimensão, que são representativos do problema, além de predição de alta precisão e menos ruído espectral (Thissen *et al.*, 2004). Em uma primeira etapa, o algoritmo mapeia cada item de dados em um espaço de recursos  $n$ -dimensional, de acordo com o número de recursos. Em seguida, identifica a linha, denominada hiperplano, utilizada para separar os itens de dados em duas classes com distância máxima para ambas as classes para minimizar os erros de classificação. Cada ponto de dados é plotado como um ponto no espaço de dimensão  $n$  (onde  $n$  é o número de recursos) e o valor de cada recurso é uma coordenada específica. A Figura 7 apresenta uma ilustração simples de um classificador SVM (Uddin *et al.*, 2019).

Figura 7: Máquina de vetores de suporte - Ilustração simplificada



Fonte: Adaptado de UDDIN, *Et al.*, 2019.

Tradução nossa.

O SVM identificou um hiperplano (na verdade, uma linha) que maximiza a separação entre as classes ‘estrela’ e ‘círculo’.

A identificação dos metabólitos, apenas para estudos globais, é realizada utilizando-se bibliotecas de espectros construídas no próprio laboratório de análise, ou pelo uso de bibliotecas comerciais, como a NIST (do inglês, *National Institute of Standards and Technology*). Para determinação putativa dos metabólitos, buscas em bases de dados públicas *online*, como HMDB (do inglês, *Human Metabolome Database*) (Wishart *et al.*, 2007), Metlin (Tautenhahn *et al.*, 2012), MassBank (Horai *et al.*, 2010) etc. são frequentemente realizadas. A confirmação da identificação desses metabólitos putativos pode ser posteriormente realizada através de análise metabolômica em fluxo, utilizando compostos marcados isotopicamente, ou ainda análise NMR-2D ou MS/MS para elucidação estrutural, além de adição por *spiking* de padrões analíticos às amostras (Canuto *et al.*, 2018).

A interpretação biológica visa buscar as respostas para as questões levantadas no início do fluxograma de trabalho, ou possibilita gerar uma nova hipótese. Essa interpretação é realizada através da correlação dos metabólitos alterados com rotas metabólicas (Karp; Caspi, 2011), utilizando-se bibliotecas com KEGG (do inglês, *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) (Kanehisa *et al.*, 2006), MetaCyc, (Caspi *et al.*, 2012), MetaboLights, (Haug *et al.*, 2013) entre outras. Para confirmar a interpretação dos efeitos bioquímicos, uma validação biológica é recomendada, na qual novos experimentos são elaborados com novas amostras e estas são submetidas à análise metabolômica (Madsen *et al.*, 2010; Liesenfeld *et al.*, 2013). Adicionalmente, metabolômica alvo, com a quantificação dos metabólitos discriminantes avaliados pela abordagem global, também pode ser realizada (Canuto *et al.*, 2018).

O uso da IA cria um cenário de medicina de alto desempenho, onde o impacto pode ser visto para as equipes de saúde por meio da interpretação precisa das imagens, para os sistemas de saúde, melhorando o fluxo de trabalho e o potencial de redução de erros médicos, e para os pacientes usarem seus próprios dados para promover saúde (Topol, 2019; Barberis *et al.*, 2020).

Vários metabólitos são considerados potenciais biomarcadores para o CaP, mas ainda precisam de validação clínica. Apesar da falta de biomarcadores

metabolômicos validados disponíveis para a prática clínica, a metabolômica provou ser uma ferramenta poderosa na descoberta de novos biomarcadores para detecção e prognóstico do câncer de próstata (Lima *et al.*, 2016).

Neste trabalho hipotetizamos que a integração das plataformas tecnológicas espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier por reflexão total atenuada (ATR-FTIR) e análise metabolômica por cromatografia líquida e espectroscopia de massa (CL-MS) plasmáticas com aprendizado de máquina, em pacientes com câncer de próstata clinicamente localizado, possam ser utilizadas para indicar vigilância ativa com maior precisão.

### **3. OBJETIVOS:**

#### **3.1 Geral:**

Utilizar as plataformas tecnológicas: espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier por reflexão total atenuada (ATR-FTIR), análise metabolômica por cromatografia líquida e espectroscopia de massa (CLAE-EM) e aprendizado de máquina em pacientes com câncer de próstata clinicamente localizado, para indicar vigilância ativa com maior precisão.

#### **3.2 Específico:**

Correlacionar as plataformas tecnológicas: análise metabolômica por cromatografia líquida e espectroscopia de massa (CLAE-EM), espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier por reflexão total atenuada (ATR-FTIR), e aprendizado de máquina . em pacientes com câncer de próstata clinicamente localizado, separados em dois grupos vigilância ativa e com indicação de intervenção.

Utilizar as classificações de risco da *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) versão 4 2024, para estratificação de risco e separar os dois grupos para a correlação.

Produzir dois artigos científicos:

Artigo 1:

- Metabolômica acoplada à inteligência artificial na vigilância ativa no câncer de próstata.

Artigo 2:

- ATR-FTIR e inteligência artificial na vigilância ativa no câncer de próstata.

Segue normas de submissão da revista *International Journal of Urology*.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Aspectos éticos e biossegurança**

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) sob Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) 71108817.2.0000.5152 e os pacientes que concordaram em participar, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Os métodos utilizados neste trabalho foram realizados seguindo as diretrizes éticas relevantes da declaração de Helsinki (Associação Médica Mundial, 1964) e os protocolos de segurança do laboratório de Nanobiotecnologia Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho, do Instituto de Biotecnologia da UFU.

### **4.2 Desenho do estudo**

Estudo clínico, epidemiológico, analítico, observacional, transversal, com participantes com CaP clinicamente localizados submetidos à prostatectomia radical.

### **4.3 Fonte de dados**

Os pacientes foram selecionados no Hospital de Clínicas (HC) da UFU e as análises metabólicas realizadas no Laboratório de Nanobiotecnologia Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho do Instituto de Biotecnologia da UFU no período de 2018 a 2024.

### **4.4 Critérios de inclusão**

Participaram deste estudo pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma de próstata por biópsia, clinicamente localizado, submetidos a tratamento cirúrgico, prostatovesiculectomia radical (PR) aberta ou videolaparoscópica recrutados no período de 2018 a 2024.

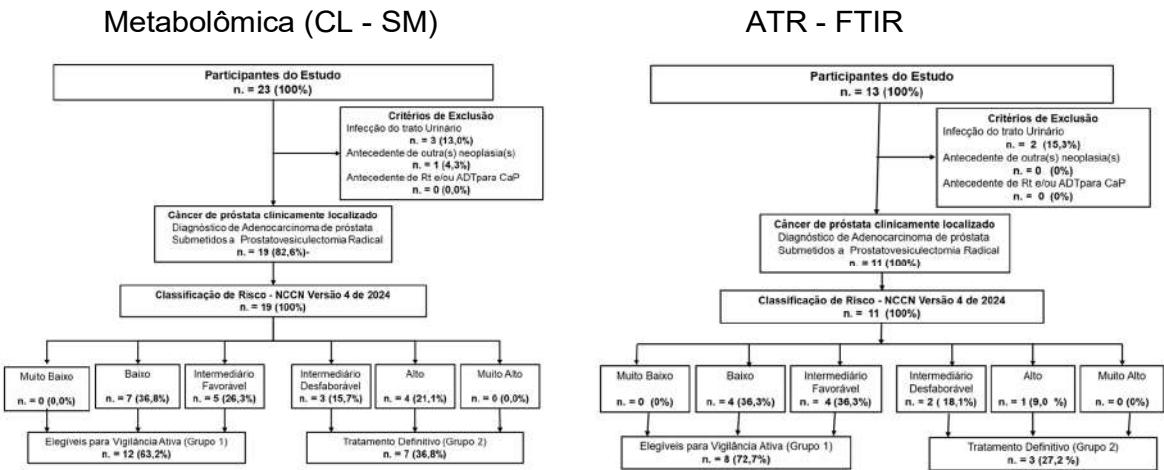
Os participantes foram separados em dois grupos elegíveis para vigilância ativa (grupo1) e com indicação de intervenção (grupo 2) de acordo com a classificação de risco da NCCN versão 4 de 2024 (NCCN, 2024). Figura 1.

### **4.5 Critérios de Exclusão**

Foram excluídos pacientes com infecção do trato urinário até 7 dias antes

a coleta de amostra de sangue, com antecedentes de outra(s) neoplasia(s) e de radioterapia e/ou terapia de derivação androgênica (ADT) para tratamento de CaP. Figura 8.

Figura 8. Desenho do estudo: metabolômica e ATR-FTIR



Fonte: os autores.

Legenda: n. = número - % = percentagem - Rt = radioterapia - ADT = terapia de derivação androgênica - CaP = câncer de próstata - NCCN = National Comprehensive Câncer Network (NCCN, 2024).

#### 4.6 Coleta de amostra biológica

Foi coletada amostra com cerca de 5mL a 10mL de sangue periférico de cada participante, utilizando-se agulha descartável e sistema a vácuo, em tubo com gel separador de plasma. As coletas ocorreram nos dias dos procedimentos cirúrgicos, na sala cirúrgica, antes da anestesia, com jejum de no mínimo 8 horas e entregues ao Laboratório de Nanobiotecnologia Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho em até 3 horas para início do processamento. As amostras foram imediatamente centrifugadas e o soro separado e congelado a -80° C e armazenado em freezer para posterior realização das análises ATR-FTIR e metabolômica.

As peças cirúrgicas de todos os participantes foram enviadas ao serviço de patologia do Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina - UFU para exames anatomopatológicos.

#### 4.7 Variáveis

As variáveis foram agrupadas em dados demográficos: idade, sexo, raça; dados clínicos: história familiar de câncer de próstata, avaliação clínica de infecção do trato urinário, antecedentes de neoplasia(s) e de ADT e/ou Rt para tratamento de CaP; toque retal e estadiamento clínico (cT); exames laboratoriais: antígeno prostático específico (PSA) livre e total; exame de imagem: ultrassonografia (US) trans abdominal e/ou trans retal de próstata; densidade do PSA (DPSA); exames anatomopatológicos das biópsias de próstata e das peças cirúrgicas.

#### **4.8 Classificação de risco de progressão do câncer de próstata**

Foi utilizado para estratificar o risco de progressão do câncer de próstata a classificação da *National Comprehensive Cancer Network versão 4 de 2024* (NCCN, 2024). Tabela 1.

#### **4.9 Análise Metabolômica**

Para extração de metabólitos, foram aliqüotados 100 µL de soro de cada amostra e adicionou-se 1000 µL de metanol grau espectroscópico (grau HPLC) e o material foi homogeneizado 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 ressuspendido 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) hifenado ao espectrômetro de massas (EM) de alta resolução do tipo Q-TOF da marca Agilent® modelo 6520 B com fonte de ionização por electrospray (IES) (CLAE-EM 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% 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.

#### **4.10 Análise ATR – FTIR**

Os dados espectrais do soro foram obtidos utilizando o Espectrômetro FTIR Agilent<sup>TM-USA</sup> Cary 630, operando no modo de micro reflexão total atenuada (ATR), abrangendo a faixa de número de onda de (4000 a 650  $\text{cm}^{-1}$ ). A aquisição espectral foi realizada com resolução de 2  $\text{cm}^{-1}$ , 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  $\mu\text{l}$  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 duplicata para garantir a reprodutibilidade 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  $\text{cm}^{-1}$  do espectro original.

#### **4.11 Análise estatística**

##### **4.11.1 Análise estatística dos participantes**

As características dos participantes foram analisadas usando cálculos estatísticos descritivos: valor de média e desvio padrão para variáveis contínuas e valores absolutos e percentual para variáveis categóricas. Foi verificado 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 e, para aqueles com distribuição não normal, utilizou-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Para variáveis qualitativas foi utilizado o teste exato de Fisher generalizado. Foi considerado nível de significância de 0,05.

#### **4.11.2 Análise estatística - Metabolômica**

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 metabolômica foram realizadas com os valores transformados  $\log_2$ . 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.

Os dados tratados no Mass Hunter Qualitative v.10, seguido de alinhamento pelo Mass Hunter Profiler Profissional v.13 foram exportados para extensão .CSV e utilizados para a construção de algoritmos preditivos. A 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.

#### **4.11.3 Análise estatística - FTIR**

Os dados espectrais foram truncados para abranger a região lipídica (3050–2800  $\text{cm}^{-1}$ ) e a região de impressão digital (1800–900  $\text{cm}^{-1}$ ), 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.

Para a análise com aprendizado de máquina, foi empregado o software Orange Data Mining 3.35. Os dados espectrais utilizados foram truncados utilizando a região lipídica ( $3050\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$ ) associada à região de impressão digital ( $1800\text{--}900\text{ cm}^{-1}$ ). 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.

## 5. RESULTADOS

Apresentados no formato dos arquivos:

### 5.1 Artigo 1:

Metabolômica acoplada à inteligência artificial na vigilância ativa no câncer de próstata

### 5.2 Artigo 2:

Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (ATR-FTIR) plasmática e inteligência artificial na vigilância ativa no câncer de próstata.

Artigo 1:

**METABOLÔMICA ACOPLADA À INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL NA VIGILÂNCIA  
ATIVA NO CÂNCER DE PRÓSTATA**

**METABOLOMICS COUPLED WITH ARTIFICIAL INTELLIGENCE IN ACTIVE  
SURVEILLANCE IN PROSTATE CANCER**

Sebastião Antônio Borba<sup>1</sup>, Leandro Alves de Oliveira<sup>1</sup>, Aline Gomes de Souza<sup>3</sup>,  
Hebreia Oliveira Almeida Souza<sup>2</sup>, Mario Machado Martins<sup>3</sup>, Robinson Sabino Silva<sup>4</sup>,  
Abel Dib Rayashi<sup>5</sup>, Emília Rezende Vaz<sup>3</sup>, Vivian Alonso Goulart<sup>1</sup>, Esther Campos  
Fernandez<sup>3</sup>, Bruno Henrique Carrijo Borba<sup>5</sup>, Luiz Ricardo Goulart Filho<sup>1\*</sup>, Thulio  
Marquez Cunha<sup>5\*\*</sup>

\*In memorian

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

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

<sup>3</sup> Laboratório de Nanobiotecnologia Prof. Dr, Luiz Ricardo Goulart Filho, Instituto de Biotecnologia, Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.

<sup>4</sup> Centro de Inovação em Diagnóstico Salivar e Nanobiotecnologia, Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.

<sup>5</sup> Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.

\*\* Endereço do autor:

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

## RESUMO

Aproximadamente metade dos tumores de próstata recém-diagnosticados são localizados e potencialmente elegíveis para vigilância ativa. A definição de qual paciente deve receber tratamento definitivo ainda é alvo de controvérsias. Avaliamos a acurácia de uma plataforma diagnóstica utilizando metabolômica exploratória e inteligência artificial para definição de vigilância ativa ou tratamento definitivo, em pacientes com no câncer de próstata clinicamente localizado. Os 19 pacientes com adenocarcinoma de próstata clinicamente localizados, conforme estratificação de risco de progressão e orientações de manejo da NCCN versão 4 2024, foram divididos em dois grupos com 12 (63,2%) participante elegíveis para vigilância ativa (grupo 1) e 7 (38,8%) com indicação de tratamento definitivo (grupo 2). Foi realizado análise metabolômica no soro utilizando cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de alta resolução do tipo Q-TOF com fonte de ionização por electrospray (CLAE-EM Q-TOF - EIE). Os dados obtidos foram analisados com uma estratégia de metabolômica exploratória e criação de algoritmos de inteligência artificial no software Orange v. 3.38.1. Foram utilizados modelos supervisionados (Logistic Regression, Naive Bayes, Stochastic Gradient Descent) para separação dos grupos. Foram identificados um total de 514 metabólitos. Utilizou-se o filtro de frequência de 100%. teste T não pareado com  $p < 0,05$  e fold change  $\geq 2$  e obteve-se 2 metabólitos diferencialmente expressos nos dois grupos: fosfatidiletanolamina e lisofosfatidilcolina, ambos com maior expressão no grupo de tratamento definitivo. Os metabólitos fosfatidiletanolamina e lisofosfatidilcolina foram mais expressos no grupo de tratamento definitivo possivelmente relacionado com a maior atividade neoplásica neste grupo em relação aos elegíveis para vigilância ativa. Os modelos Logistic Regression, Naive Bayes e Stochastic Gradient Descent apresentaram alta sensibilidade, especificidade e acurácia na diferenciação dos grupos. O emprego da metabolômica exploratória identificou dois metabólitos promissores mais expressos no grupo intervenção inferindo possível relação com a maior atividade metabólica neoplásica neste grupo, sendo indicados para estudos futuros como possíveis biomarcadores. Foi possível também criar um algoritmo de inteligência artificial com alta sensibilidade, especificidade e acurácia na separação dos dois grupos.

Palavras-chave: câncer de próstata; vigilância ativa; tratamento definitivo; metabolômica; inteligência artificial, aprendizagem de máquina.

## **ABSTRACT**

Approximately half of newly diagnosed prostate tumors are localized and potentially eligible for active surveillance. However, the criteria for determining which patients should receive definitive treatment remain controversial. We evaluated the accuracy of a diagnostic platform using exploratory metabolomics and artificial intelligence to determine whether active surveillance or definitive treatment is appropriate for patients with clinically localized prostate cancer. Nineteen patients with clinically localized prostate adenocarcinoma, classified according to progression risk stratification and management guidelines from the NCCN version 4, 2024, were divided into two groups: 12 patients (63.2%) eligible for active surveillance (group 1), and 7 patients (38.8%) indicated for definitive treatment (group 2). Sero metabolomic analysis was performed using high-performance liquid chromatography coupled with high-resolution Q-TOF mass spectrometry with electrospray ionization (LC-MS Q-TOF - ESI). The data obtained were analyzed using an exploratory metabolomics strategy and the creation of artificial intelligence algorithms in Orange v. 3.38.1. Supervised models (Logistic Regression, Naive Bayes, Stochastic Gradient Descent) were used to separate the groups. A total of 514 metabolites were identified. Using a frequency filter of 100%, unpaired T-test with  $p < 0.05$ , and fold change  $\geq 2$ , two metabolites were found to be differentially expressed between the groups: phosphatidylethanolamine and lysophosphatidylcholine, both with higher expression in the definitive treatment group. These metabolites were more highly expressed in the definitive treatment group, possibly related to higher neoplastic activity compared to those eligible for active surveillance. The Logistic Regression, Naive Bayes, and Stochastic Gradient Descent models showed high sensitivity, specificity, and accuracy in group differentiation. The use of exploratory metabolomics identified two promising metabolites that were more highly expressed in the intervention group, suggesting a possible relationship with increased neoplastic metabolic activity, and indicating their potential as biomarkers for future studies. It was also possible to create an artificial intelligence algorithm with high

sensitivity, specificity, and accuracy for distinguishing between the two groups.

Keywords: prostate cancer; active surveillance; definitive treatment; metabolomics; artificial intelligence, learning machine.

## INTRODUÇÃO

Em 112 países incluindo o Brasil, o câncer de próstata (CaP), exceto o câncer de próstata não melanoma, é a neoplasia mais comum nos homens correspondendo, mundialmente, a 15% dos cânceres e a segunda causa de mortes por câncer após o câncer de pulmão<sup>1,2</sup>. Estima-se que o número de novos casos por ano mundialmente, aumentará de 1,4 milhão em 2020 para 2,9 milhões até 2040 e recomenda que os governos preparem estratégias para enfrentar este desafio<sup>2,3</sup>.

A conduta de vigilância ativa (VA) tem sido considerada uma estratégia viável para pacientes com câncer de próstata (CaP) clinicamente localizado de risco muito baixo, baixo e intermediário favorável, com expectativa de vida superior a 10 anos, conforme diretrizes da National Comprehensive Cancer Network (NCCN)<sup>4</sup>. Aproximadamente metade dos casos recém-diagnosticados se enquadram nesses critérios e são potencialmente elegíveis para essa abordagem, que busca postergar o tratamento definitivo, como prostatectomia radical e/ou radioterapia,<sup>4</sup> mantendo a possibilidade de cura futura e reduzindo os riscos de efeitos adversos associados, como incontinência urinária e disfunção erétil<sup>4, 5</sup>.

Estudos indicam que uma proporção significativa desses pacientes pode permanecer em VA com segurança por até 10 anos, embora também haja relatos de progressão da doença com envolvimento linfonodal e metástases. Essa dualidade evidencia uma controvérsia clínica: embora a VA evite tratamentos desnecessários em muitos casos, há risco de subtratamento em outros. Diante disso, destaca-se a necessidade de desenvolver novas plataformas tecnológicas capazes de refinar a estratificação de risco, melhorando a seleção de pacientes para conduta expectante e reduzindo tanto o sobretratamento quanto a progressão não identificada do CaP<sup>6, 7, 8, 9, 10</sup>.

A metabolômica é a ciência que estuda, de forma abrangente, os metabólitos presentes em uma amostra biológica, refletindo diretamente as alterações bioquímicas e fisiológicas do organismo em resposta a processos patológicos, como

o câncer. Por meio de técnicas analíticas como cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM), é possível detectar e quantificar centenas de metabólitos simultaneamente, permitindo a identificação de assinaturas metabólicas específicas da doença <sup>14, 15, 16, 17</sup>.

Diante da grande complexidade e volume dos dados gerados, a aplicação de algoritmos de aprendizado de máquina (machine learning, ML), especialmente os modelos supervisionados, tem se mostrado essencial para analisar esses dados de forma eficiente, extraíndo padrões relevantes e identificando potenciais biomarcadores. Esses algoritmos são capazes de aprender a partir de conjuntos de dados rotulados, reconhecendo relações complexas e não lineares entre os perfis metabólicos e os desfechos clínicos. Assim, a integração entre metabolômica e ML representa uma promissora abordagem para o aprimoramento da estratificação de risco e a tomada de decisão clínica no câncer de próstata, contribuindo para uma conduta mais precisa e personalizada <sup>18, 19, 20, 21, 22</sup>.

O objetivo do estudo foi identificar novos biomarcadores por meio da metabolômica exploratória no soro de pacientes com CaP clinicamente localizado e desenvolver algoritmo de inteligência artificial para contribuir na indicação de observação vigilante com maior precisão.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Aspectos éticos e biossegurança**

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) sob Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) 71108817.2.0000.5152 e os pacientes que concordaram em participar, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Os métodos utilizados neste trabalho foram realizados seguindo as diretrizes éticas relevantes da declaração de Helsink<sup>23</sup> e os protocolos de segurança do laboratório de Nanobiotecnologia Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho, do Instituto de Biotecnologia da UFU.

### **Desenho do estudo**

Estudo clínico, epidemiológico, analítico, observacional, transversal com participantes com CaP clinicamente localizados submetidos à prostatectomia radical.

**Fonte de dados**

Os pacientes foram selecionados no Hospital de Clínicas (HC) da UFU e as análises metabolômicas realizadas no Laboratório de Nanobiotecnologia Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho do Instituto de Biotecnologia da UFU no período de 2018 a 2024.

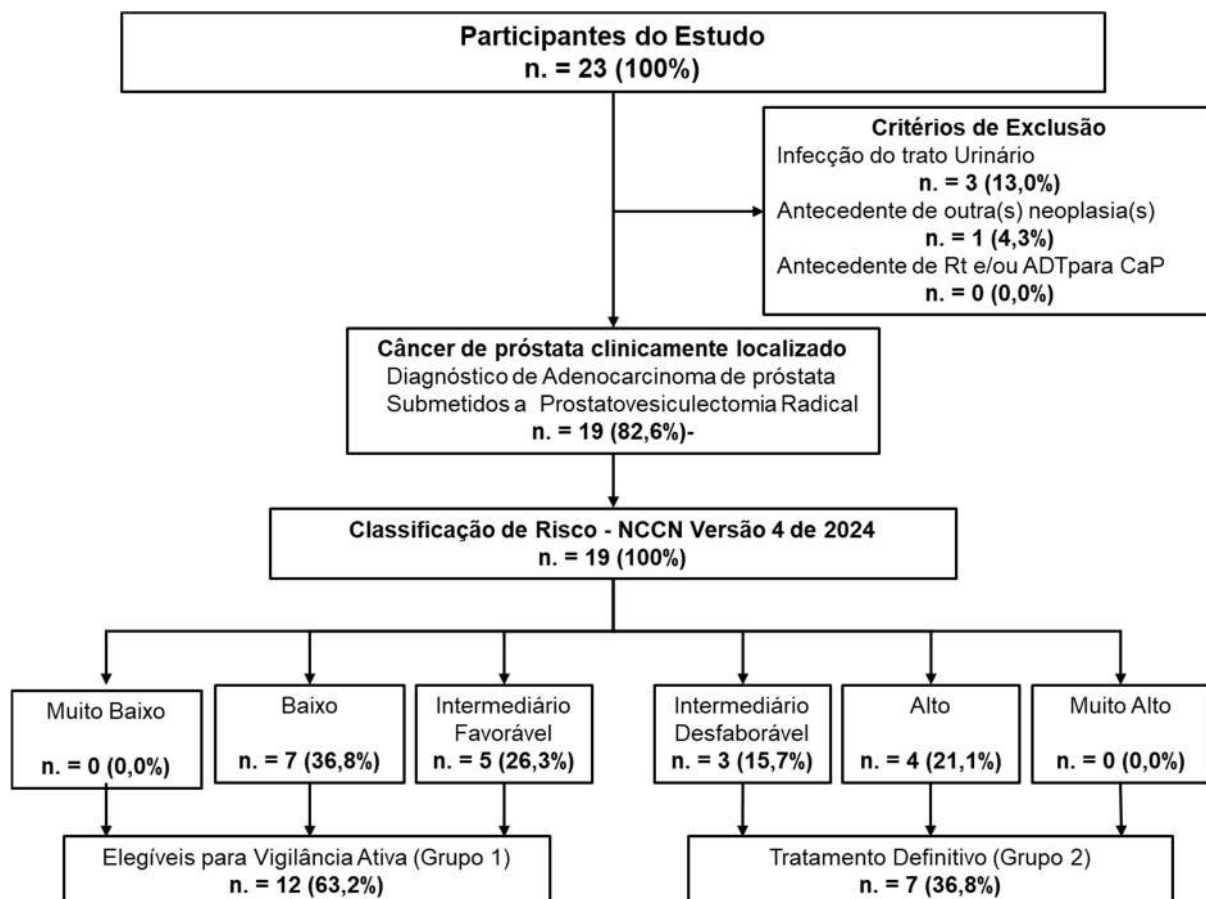
**Critérios de inclusão**

Participaram deste estudo pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma de próstata por biópsia, clinicamente localizado, submetidos a tratamento cirúrgico, prostatectomia radical (PR) aberta ou videolaparoscópica recrutados no período de 2018 a 2024. Os participantes foram separados em dois grupos elegíveis para vigilância ativa (grupo 1) e com indicação de intervenção (grupo 2) de acordo com a classificação de risco da NCCN versão 4 de 2024<sup>4</sup>.

**Critérios de exclusão**

Foram excluídos pacientes com infecção do trato urinário até 7 dias antes da coleta de amostra de sangue, com antecedentes de outra(s) neoplasia(s) e de radioterapia e/ou terapia de derivação androgênica (ADT) para tratamento de CaP.

Figura 1 - Desenho do estudo



Fonte: os autores.

Legenda: n. = número - % = percentagem - Rt = radioterapia - ADT = terapia de derivação androgênica - CaP = câncer de próstata - NCCN = National Comprehensive Câncer Network<sup>4</sup>.

### Coleta de amostra biológica

Foi coletada amostra com cerca de 5mL a 10mL de sangue periférico de cada participante, utilizando-se agulha descartável e sistema a vácuo, em tubo com gel separador de plasma. As coletas ocorreram nos dias dos procedimentos cirúrgicos, na sala cirúrgica, antes da anestesia, com jejum de no mínimo 8 horas e entregues ao Laboratório de Nanobiotecnologia Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho em até 3 horas para início do processamento. As amostras foram imediatamente centrifugadas e o soro separado e congelado a -80° C e armazenado em freezer para posterior realização das análises metabolômicas.

Foram realizados exames anatomopatológicos das peças cirúrgicas de todos os participantes pelo serviço de patologia do Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina - UFU.

## **Variáveis**

As variáveis foram agrupadas em dados demográficos: idade, sexo, raça; dados clínicos: história familiar de câncer de próstata, avaliação clínica de infecção do trato urinário, antecedente de neoplasia(s), toque retal e estadiamento clínico (cT); exames laboratoriais: antígeno prostático específico (PSA) livre e total; exame de imagem: ultrassonografia (US) trans abdominal e/ou trans retal de próstata; densidade do PSA (DPSA); exames anatomopatológicos das biópsias de próstata e das peças cirúrgicas.

## **Classificação de risco de progressão do câncer de próstata**

Foi utilizado para estratificar o risco de progressão do câncer de próstata a classificação da *National Comprehensive Cancer Network versão 4 de 2024*<sup>4</sup>.

## **Análise Metabolômica**

Para extração de metabólitos, foram aliqüotados 100 µL de soro de cada amostra e adicionou-se 1000 µL de metanol grau espectroscópico (grau HPLC) e o material foi homogeneizado 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 ressuspendido 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) hifenado 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% 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.

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.

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

### **Análise estatística**

As características dos participantes foram analisadas usando cálculos estatísticos descritivos: valor de média e desvio padrão para variáveis contínuas e valores absolutos e percentual para variáveis categóricas.

Foi verificado 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 e, para aqueles com distribuição não normal, utilizou-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Para variáveis qualitativas foi utilizado o teste exato de Fisher generalizado. Foi considerado nível de significância de 0,05.

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.

Foi aplicado o filtro de frequência de 100% e, em seguida, foi utilizado o teste T não pareado com  $p < 0,05$  e fold change maior ou igual a 2.

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 dados foram tratados no Mass Hunter Qualitative v.10, seguido de alinhamento pelo Mass Hunter Profiler Professional 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.

## **RESULTADOS**

### **Participantes**

Foram comparados os grupos de pacientes: elegíveis para vigilância ativa (Grupo 1 n. = 12) e com indicação de tratamento definitivo ou intervenção (Grupo 2 n. = 7) de acordo com a estratificação de risco e manejo do CaP da NCCN versão 4 de 2024. (NCCN, 2024). Os dados dos pacientes: estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Dados dos participantes: demográficos, clínicos, classificação de risco, orientações para manejo do CaP da NCCN versão 4 de 2024 e valor de p.

Dados		Classificação de Risco e Manejo do Câncer de Próstata - NCCN versão 4 2024						
		Participantes 19 (100)	Elegíveis para Vigilância Ativa (Grupo1)			Indicado Intervenção (Grupo2)		
Total n (%)			Muito Baixo	Baixo	Intermediário Favorável	Intermediário Desfavorável	Alto	Muito Alto
Classificação de risco da NCCN versão 4 2024			0 (0)	7 (36,8)	5 (26,3)	3 (15,7)	4 (21,0)	0 (0)
n (%) / Valor de p								Valor de p
Idade em anos	Média ± DP	62 ± 8,0		62 ± 8,0	66 ± 6,0	64 ± 8,0	58 ± 10,0	0,85
Classificação da Cor da Pele	n. (%)							0,77
Branco		7 (36,8%)		3 (42,8%)	2 (40%)		2 (50%)	
Pardo		11 (57,8%)		3 (42,8%)	3 (60%)	3 (100%)	2 (50%)	
Negro		1 (5,2%)		1 (14,2%)				
História familiar de Câncer de Próstata	n. (%)							> 0,99
Sim		3 (15,7%)		2 (28,5%)		1 (33,3%)		
Não		16 (84,2%)		5 (71,4%)	5 (100%)	2 (66,6%)	4 (100%)	
PSA Total (T) Pré Biópsia ng/mL	Média ± DP	8,7 ± 4,9		7,6 ± 4,9	4,9 ± 4,0	7,7 ± 5,0	16,0 ± 6,0	0,04
SA Livre (L) Pré Biópsia ng/mL	Média ± DP	0,7 ± 0,4		0,6 ± 0,4	0,6 ± 0,4	0,5 ± 1,	1,3 ± 1,0	0,6
Relação % PSA L/T Pré Biópsia	Média ± DP	9,6 ± 3,3		13,3 ± 3,4	13,3 ± 3,4	7,5 ± 2,0	8,2 ± 3,0	0,07
(cT) Estadiamento Clínico Toque Retal	n. (%)							> 0,99
cT1c		8 (42,1%)		4 (57,1%)	3 (60%)	2 (66,6%)		
cT2a		9 (47,3%)		3 (42,8%)	2 (40%)	1 (33,3%)	3 (75%)	
cT2b								
cT2c		2 (10,5%)					1 (25%)	
US Volume da Próstata em (g)	Média ± DP	35 ± 10,3		32 ± 8,7	40 ± 10,4	28 ± 9,5	40 ± 9,9	0,76
Densidade PSA Total ng/mL/cm <sup>3</sup>	Média ± DP	0,27 ± 0,15		0,27 ± 0,16	0,13 ± 0,11	0,27 ± 0,16	0,45 ± 0,21	0,04
Grau ISUP (G) 2014 da bióp. de próstata	n. (%0							0,03
G 1 (Gleason 3+3)		8 (42,1%)		7 (100%)		1 (33,3%)		
G 2 (Gleason 3+4)		7 (36,8%)			5 (100%)	1 (33,3%)	1 (25%)	
G 3 (Gleason 4+3)		1 (5,2%)				1 (33,3%)		
G 4 (Gleason 8)		1 (5,2%)					1 (25%)	
G 5 (Gleason 9 ou 10)		2 (10,5%)					2 (50%)	

Fonte: os autores.

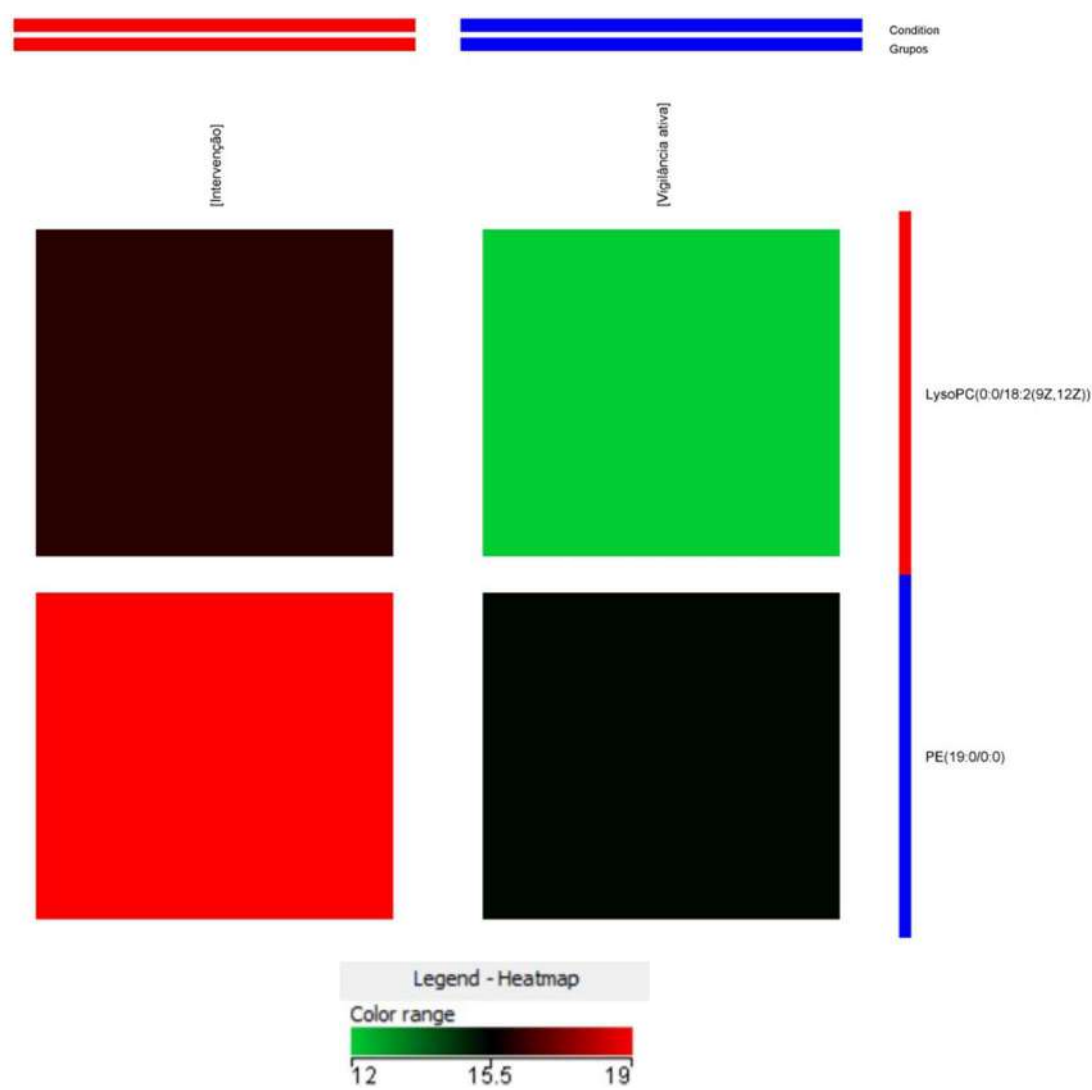
Legenda: NCCN = *National Comprehensive Cancer Network*<sup>4</sup> - . = número - % = percentual - PSA = antígeno prostático específico - ng = nanograma - mL = mililitro - DP = desvio padrão - (cT) = estadiamento clínico pelo toque retal<sup>24</sup> - cm<sup>3</sup> = centímetro(s) cúbico - US = ultrassonografia - g = grama(s) - ISUP = *International Society of Urological Pathology*<sup>25</sup> – Bióp. = biópsia - Gleason = escores de Gleason<sup>26</sup>.

Entre os grupos não se observou diferença estatística em relação à idade, cor, histórico familiar, dosagem de PSA livre, relação PSA livre/total, estadiamento clínico e volume prostático. As variáveis com diferença significativa entre os dois grupos foram a dosagem do PSA total, a densidade do PSA total e o Grau da ISUP2014 das biópsias.

Os exames anatomopatológicos das peças cirúrgicas de todos os participantes confirmaram câncer de próstata localizado (pT2) pela classificação TNM<sup>24</sup>.

Nos dois grupos foram identificados no total 514 metabólitos. Foi utilizado filtro de frequência de 100% e obteve-se 7 metabólitos. Pela análise estatística usando Teste T não pareado com p<0,05 e fold change ≥ 2 obteve-se dos quais 2 metabólitos foram diferencialmente expressos com maior expressão no grupo de pacientes com indicação de intervenção: fosfatidiletanolamina [PE(19:0/0:0)] e lisofosfatidilcolina [LysoPC(0:0/18:2(9Z,12Z))]. Estes metabólitos estão apresentados no heatmap (Figura 2).

Figura 2 - Heatmap dos metabólitos diferencialmente expressos nos grupos elegíveis para vigilância ativa (grupo1) x intervenção (grupo 2) pela classificação de risco da NCCN versão 4 de 2024<sup>4</sup>.



Fonte: os autores.

Material suplementar apresentando a intensidade individualmente dos integrantes do estudo.

### Algoritmo

Foram construídos modelos de predição supervisionados utilizando para treinamento a estratégia de cross validation (com fold de 10) e os resultados dos três melhores modelos estão apresentados na matriz de confusão (Figura 3), em seguida os valores de sensibilidade, especificidade, razão de verossimilhança, valor preditivo e acurácia (Tabela 2) e as curvas ROC (Figura 4) de cada modelo.

Figura 3 – Matriz de confusão

<b>Logistic Regression</b>	Predicted			
	Intervenção Vigilância Ativa		$\Sigma$	
	Actual	Intervenção	Vigilância Ativa	
		24	4	28
		5	31	36
	$\Sigma$	29	35	64

<b>Naive Bayes</b>	Predicted			
	Intervenção Vigilância Ativa		$\Sigma$	
	Actual	Intervenção	Vigilância Ativa	
		28	0	28
		8	28	36
	$\Sigma$	36	28	64

<b>Stochastic Gradient Descent</b>	Predicted			
	Intervenção Vigilância Ativa		$\Sigma$	
	Actual	Intervenção	Vigilância Ativa	
		26	2	28
		4	32	36
	$\Sigma$	30	34	64

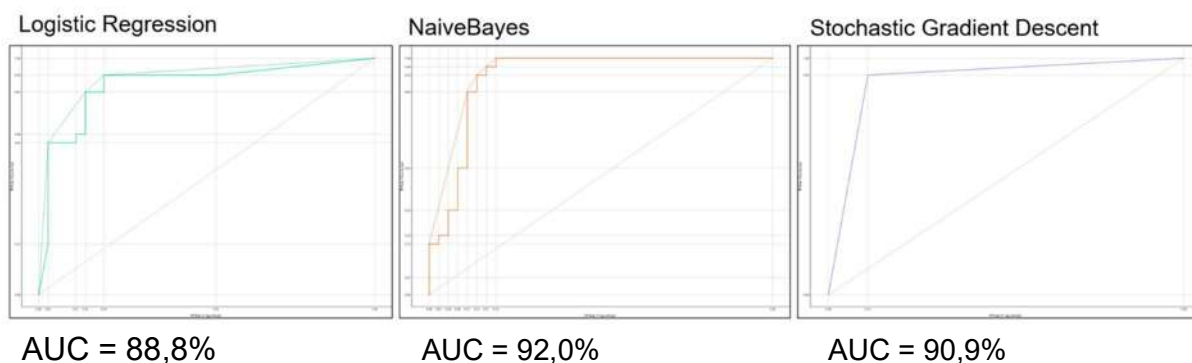
Fonte: os autores.

Tabela 2 - Resultado sensibilidade, especificidade, razão de verossimilhança. valor preditivo e acurácia.

Estatística	Logistic Regression	Naive Bayes	Stochastic Gradient Descent
Sensibilidade % (IC 95%)	85,7% (67,3% - 95,9%)	100% (87,6% - 100%)	92,8% (76,5% - 99,1%)
Especificidade % (IC 95%)	86,1% (70,5% - 95,3%)	77,7% (60,8% - 89,8%)	88,8% (73,9% - 96,8%)
Razão de Verossimilhança positiva	6,17 (2,70 - 14,1)	4,50 (2,44 - 8,29)	8,36 (9,30 - 21,17)
Razão de Verossimilhança negativa	0,17 (0,07 - 0,41)	0,00	0,09 (0,02 - 0,31)
Valor preditivo positivo	82,7% (67,7% - 91,6%)	77,7% (85,5% - 86,5%)	86,6% (71,9% - 94,2%)
Valor preditivo negativo	88,5% (75,6% - 95,0%)	100,0% (87,6% - 100,0%)	94,1% (80,7% - 98,3%)
Acurácia % (IC 95%)	85,9% (74,9% - 93,3%)	87,5% (76,8% - 94,4%)	90,6% (80,7% - 96,4%)

Fonte: os autores

Figura 4 - Curvas ROC para Logistic Regression, NaiveBayes e Stochastic Gradient Descent



Fonte: os autores.

## DISCUSSÃO

A análise metabolômica identificou dois metabólitos fosfatidiletanolamina e lisofosfatidilcolina diferencialmente expressos, estatisticamente significantes, com maior expressão no grupo de tratamento definitivo e o Stochastic Gradient Descent foi o modelo supervisionado estatisticamente mais equilibrado para classificar vigilância ativa e intervenção.

Analisando as variáveis utilizadas e a estratificação de risco e orientações de manejo do CaP da NCCN versão 4 de 2024<sup>4</sup> nos dois grupos, as características sociodemográficas não apresentaram diferença estatística. As variáveis dosagem do PSA total, densidade do PSA total e o Grau da ISUP2014 das biópsias foram as que se mostraram com frequências diferentes entre os dois grupos e estes achados estão de acordo com os dados de literatura.

Todos participantes tiveram confirmação de câncer localizado (pT2) pelos exames anatomopatológicos das peças cirúrgicas.

Este estudo é pioneiro em avaliar o perfil metabólico no soro de pacientes com câncer de próstata clinicamente localizado, separados em dois grupos, elegíveis para vigilância ativa e com indicação de tratamento definitivo ou intervenção.

Estes metabólitos já foram identificados associados ao câncer de próstata por Buszewska-Forajta e colaboradores, usando dois métodos de imagem: ionização por dessorção a laser assistida por matriz com espectrômetro de massa de tempo de voo (MALDI-TOF/MS) e ionização por eletrospray com espectrômetro de massa triplo quadrupolo (ESI-QqQ/MS) em tecido prostático normal e neoplásico<sup>27</sup>.

Nesse sentido, a incorporação de análise metabolômica e de novos biomarcadores aos modelos multivariáveis de estratificação de risco de progressão do CaP existentes, representa realidade que pode aprimorar a abordagem desta

neoplasia.

A PE(19:0/0:0) é uma fosfatidiletanolamina (PE) identificada na Human Metabolome Database (HMDB) com registro número HMDB060501<sup>28</sup>.

As fosfatidiletanolaminas pertencem à classe das glicerofosfoetanolaminas sendo um dos tipos comuns de fosfolipídios encontrados em membranas biológicas. A estrutura básica de um glicerofosfolipídio é formada por uma molécula de glicerol, que serve como espinha dorsal. dois grupos hidroxila do glicerol estão esterificados com dois ácidos graxos, formando a porção hidrofóbica da molécula. Especificamente, (PE 19:0) indica um ácido graxo saturado com 19 átomos de carbono (ácido nonadecanoico) e nenhuma dupla ligação<sup>28</sup>.

A via Kenned é a principal via metabólica de produção de fosfatidiletanolamina assim como de fosfatidilcolina<sup>29</sup>.

A (PE) e a fosfatidilcolina (PC) respondem por 25% e 15%, respectivamente, do total de fosfolipídios em membranas de células eucarióticas estando envolvidos em vários processos biológicos<sup>30,31</sup>.

Os fosfolipídios são fundamentais para as funções celulares participando de eventos de fusão e fissão de membrana e na sua integração com proteínas no processo de sinalização celular<sup>32,33,34</sup>. PE não é simplesmente um constituinte passivo da membrana, mas está funcionalmente associada à biogênese e atividade de proteínas<sup>35,36,37</sup>, fosforilação oxidativa<sup>38,39</sup>, autofagia<sup>40</sup>, formação de organelas (vesículas e mitocôndrias)<sup>41</sup> e com a estabilidade mitocondrial<sup>42,43,44</sup>.

A fosfatidiletanolamina também, se relaciona com vias de sinalização intracelular como a via fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) / proteína quinase B (Akt) (PI3K/Akt) e a via proteína quinase B (Akt) / *mammalian target of rapamicina* (mTOR) (Akt/mTOR). A ativação destas vias ocorre pela ativação inicial da proteína quinase B (Akt) pela enzima fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K)<sup>45,46,47,48</sup>.

As vias PI3K/Akt e Akt/mTOR são importantes vias de sinalização intracelular desempenhando papéis cruciais na regulação de várias funções celulares, incluindo crescimento, sobrevivência, metabolismo e motilidade celular atuando, portanto, na proliferação neoplásica e progressão tumoral. A PI3K/Akt é uma das mais importantes vias de sinalização celular e a mais frequentemente desregulada em cânceres humanos entre os quais o CaP<sup>48,49</sup>. A via Akt/mTOR além de ter reconhecida importância na gênese de neoplasias tem sido também um alvo da terapia

oncológica<sup>47,49</sup>.

LysoPC(0:0/18:2(9Z,12Z)) é uma lisofosfatidilcolina (LPC) específica identificada na Human Metabolome Database com registro número HMDB0061700<sup>28</sup>.

AS lisofosfatidilcolinas pertencente à classe dos glicerofosfolípídios presentes em membranas celulares. O prefixo "liso" refere-se ao fato dos lisofosfolípídios terem sido inicialmente classificados como hemolíticos, porém, atualmente, este termo é usado para se referir a qualquer fosfolípídio com apenas uma cadeia de ácido graxo ligado ao glicerol<sup>28</sup>.

LPCs são produzidos por hidrólise de fosfolípídios regulares, como a fosfatidilcolina ou o ácido fosfatídico, pela enzima fosfolipase A. Também podem ser produzidos pela acilação de glicerofosfolípídios ou pela fosforilação de monoacilgliceróis. As LPCs podem ter diferentes combinações de ácidos graxos de vários comprimentos e saturações, ligadas na posição C-1 (sn-1) ou C-2 (sn-2). A LysoPC(0:0/18:2(9Z,12Z)), especificamente, contém uma cadeia de ácido linoleico (ácido graxo com 18 átomos de carbono, poli-insaturado, essencial, pertencente à família dos ômega-6) na posição C-2<sup>28,50</sup>.

Lisofosfatidilcolina desempenham papel importante no metabolismo lipídico, na biologia celular e em processos inflamatórios e infecciosos. Recentemente, descobriu-se que tem algumas funções na sinalização celular. Ela ativa fosfolipase C específica que libera diacilgliceróis (DAGs) e trifosfato de inositol promovendo aumento do cálcio intracelular e ativação da *protein kinase C* (proteína quinase C) (CPK). Uma vez ativada, dentre suas funções, a CPK atua na transdução de sinais celulares, que afetam o crescimento e a divisão celular e na regulação da expressão gênica, podendo ativar ou desativar fatores de transcrições, que regulam a expressão de genes específicos, contribuindo para alterações fenotípicas nas células. Alterações na atividade da CPK estão associadas a várias condições patológicas, incluindo câncer, doenças cardiovasculares e doenças neurodegenerativas<sup>28,50</sup>

A concentração de LPC varia em diferentes neoplasias e tem papel importante na invasão neoplásica e desenvolvimento de metástase<sup>51</sup>.

A maior expressão dos metabólitos fosfatidiletanolamina e lisofosfatidilcolina no grupo submetido a intervenção, pode estar relacionada ao fato deste grupo ser de neoplasia considerada mais agressiva que do grupo elegíveis para vigilância ativa, considerando-se que fosfolípídios são essenciais às atividades celulares, funções,

proporcionalmente mais exacerbadas quanto mais agressivo for o tumor. Também há de se considerar em relação à fosfatidiletanolamina a sua participação indireta em vias de sinalização como a PI3K/Akt e Akt/mTOR e a ativação da CPK pela lisofosfatidilcolina, e suas conseqüentes ações nas atividades *celulares*.

Na criação de algoritmos de inteligência artificial, dentre os modelos supervisionados de predição criados para separação dos grupos, os três melhores foram: Logistic Regression, Naive Bayes e Stochastic Gradient Descent. Considerando-se que uma sensibilidade alta se relaciona com a indicação de intervenção com maior precisão e a especificidade alta com a indicação mais precisa de vigilância ativa, o modelo Naive Bayes foi o que apresentou maior sensibilidade (100%), sendo excelente em identificar a classe positiva ou intervenção; o Logistic Regression também se mostrou sólido, mas apresentou desempenho levemente inferior em todos os índices e o Stochastic Gradient Descent foi o modelo estatisticamente mais equilibrado para classificar vigilância ativa e intervenção por apresentar sensibilidade de 92%, especificidade de 88%, acurácia de 90% e AUC de 90,9%.

Além do diagnóstico, os algoritmos de IA têm o potencial de revelar novos insights sobre a compreensão da biologia do câncer de próstata e permitir uma melhor estratificação de risco e prognóstico<sup>52</sup>.

Algoritmos de aprendizado de máquina estão sendo cada vez mais desenvolvidos como ferramentas para auxiliar e melhorar a precisão diagnóstica em patologia anatômica<sup>53</sup>.

Em oncologia a IA se mostrou capaz de auxiliar e melhorar a precisão do diagnóstico anatomopatológico em CaP, demonstrado desempenho técnico preciso em análise de imagens, análise preditiva e entrega de oncologia de precisão. No entanto, a adoção de ferramentas de IA não é generalizada, e o impacto da IA nos resultados dos pacientes ainda está em construção. Ações concretas para superar as barreiras à implementação da IA em oncologia incluem treinar e educar a força de trabalho oncológica em IA; padronizar dados, métodos de validação de modelos e regulamentações legais e de segurança; financiar e conduzir pesquisas futuras; e desenvolver, estudar e implantar ferramentas de IA por meio de colaboração multidisciplinar<sup>54</sup>.

Os modelos multivariáveis, como as categorias de risco de progressão do CaP

da NCCN<sup>4</sup>, o escore de Avaliação de Risco do CaP da Universidade da Califórnia (CAPRA)<sup>55</sup> e o nomogramas do Memorial Sloan Kettering Cancer Center<sup>56</sup>, reconhecidamente melhoram de maneira substancial a precisão prognóstica em comparação com variáveis clínicas isoladas como PSA total, estadiamento clínico (cT) e Grau ISUP 2014 da biópsia. Além disto, classificadores de risco genômicos, como Oncotype DX Prostate, Prolares, ProMark, e Decipher têm mostrado melhorar a precisão prognóstica em casos selecionados, quando utilizados com estes modelos<sup>57,58</sup>.

Estudos recentes explorando a integração de parâmetros de ressonância magnética multiparamétrica de próstata com variáveis clínicas<sup>59</sup> e modelos multivariáveis que incorporam tanto dados clínicos quanto genômicos<sup>60</sup> mostraram aprimoramento na estratificação de risco desta neoplasia. Entretanto, a evidência de longo prazo sobre o impacto dessas abordagens no CaP ainda está em desenvolvimento<sup>59</sup>.

Os dados deste estudo sugerem que a análise metabolômica tem potencial para, em associação com as classificações de risco de progressão do CaP disponíveis, contribuir na indicação mais precisa de vigilância ativa e evitar tratamentos radicais inadequados e os riscos de seus efeitos adversos.

## **CONCLUSÃO**

A metabolômica exploratória identificou dois metabólitos promissores mais expressos no grupo intervenção inferindo possível relação com a maior atividade metabólica neoplásica neste grupo. Algoritmo de inteligência artificial mostrou alta sensibilidade, especificidade e acurácia na separação dos grupos.

## **Conflitos de interesse**

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

## **AGRADECIMENTOS**

A todos os colegas e participantes que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão deste trabalho. Ao Programa de Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. Os autores

também agradecem o financiamento da pesquisa ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Teranóstica e Nanobiotecnologia e à FAPEMIG.

## REFERÊNCIAS

1. Instituto Nacional do Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Divisão de Vigilância e Análise de Situação. Estimativa de Câncer no Brasil. *Instituto Nacional do Câncer*. Rio de Janeiro, **2022**. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/numeros/estimativa/sintese-de-resultados-e-comentarios>. Acesso em: 22 nov. 2024
2. World Health Organization. International Agency for Research on Cancer. Prostate. *In: Cancer Today*. Lyon, **2022**. Disponível em: [https://gco.iarc.fr/today/en/dataviz/pie?mode=population&group\\_populations=0&cancers=27](https://gco.iarc.fr/today/en/dataviz/pie?mode=population&group_populations=0&cancers=27). Acesso em: 17 mar. 2025.
3. James ND, Tannock I, N'Dow J, Feng F, Gillessen S, Ali SA, et al. The Lancet Commission on prostate cancer: planning for the surge in cases. *Lancet*. 2024;**403**(10437):1683-1722.
4. National Comprehensive Cancer Network. NCCN clinical practice guidelines in oncology: prostate cancer. *National Comprehensive Cancer Network*, Plymouth Meeting, 2024;**4**. Disponível em: <https://www.nccn.org/guidelines/guidelines-detail?category=1&id=1459>. Acesso em: 22 nov. 2024.
5. Vernooij RWM, Cremers RGHM, Jansen H, Somford DM, Kiemeny LA, van Andel G, et al. Corrigendum to "Urinary incontinence and erectile dysfunction in patients with localized or locally advanced prostate cancer: a nationwide observational study". *Urol Oncol*. 2022;**40**(7):353. DOI: 10.1016/j.urolonc.2022.05.007.
6. Tosoian JJ, Mamawala M, Epstein JI, Landis P, Wolf S, Trock BJ, Carter HB. Intermediate and Longer-Term Outcomes from a Prospective Active-Surveillance Program for Favorable-Risk Prostate Cancer. *J Clin Oncol*. 2015;**33**(30):3379-3385.

DOI: 10.1200/JCO.2015.62.5764.7.

7. Cooley LF, Emeka AA, Meyers TJ, Cooper PR, Lin DW, Finelli A, et al. Factors Associated with Time to Conversion from Active Surveillance to Treatment for Prostate Cancer in a Multi-Institutional Cohort. *J. Urol.* 2021;**206**(5):1147-1156. DOI: 10.1097/JU.0000000000001937.

8. Schaeffer EM, Srinivas S, Adra N, An Y, Barocas D, Bitting R, et al. NCCN Guidelines® Insights: Prostate Cancer, Version 1.2023. *J Natl Compr Canc Netw.* 2022;**20**(12):1288-1298. DOI: 10.6004/jnccn.2022.0063.

9. Tricoli JV, Schoenfeldt M, Conley BA. Detection of prostate cancer and predicting progression: current and future diagnostic markers. *Clin. Cancer Res.* 2004;**10**(12 Pt 1):3943-3953. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-03-0200.

10. Schröder FH, Hugosson J, Roobol MJ, Tammela TL, Ciatto S, Nelen V, et al. Screening and prostate-cancer mortality in a randomized European study. *N. Engl. J. Med.* 2009;**360**(13):1320-1328. DOI: 10.1056/NEJMoa0810084.

11. Theodoridis GA, Gika HG, Want EJ, Wilson ID. Liquid chromatography-mass spectrometry based global metabolite profiling: a review. *Anal Chim Acta.* 2012;**711**:7-16. doi: 10.1016/j.aca.2011.09.042.

12. Forcisi S, Moritz F, Kanawati B, Tziotis D, Lehmann R, Schmitt-Kopplin P. Liquid chromatography-mass spectrometry in metabolomics research: mass analyzers in ultra high pressure liquid chromatography coupling. *J Chromatogr A.* 2013;**1292**:51-65. doi: 10.1016/j.chroma.2013.04.017.

13. Kloos DP, Lingeman H, Niessen WM, Deelder AM, Giera M, Mayboroda OA. Evaluation of different column chemistries for fast urinary metabolic profiling. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2013;**927**:90-6. doi: 10.1016/j.jchromb.2013.02.017.

14. Xiayan L, Legido-Quigley C. Advances in separation science applied to metabonomics. *Electrophoresis*. 2008;**29**(18):3724-36. doi: 10.1002/elps.200700851.
15. Silverstein RM, Webster FX, Kiemle DJ. Spectrometric identification of Organic Compounds. *Danvers: John Wiley & Sons*. 2005;**7. ed.**
16. Nitusca D, Socaciu C, Socaciu AI, Sirbu IO, Bardan R, Cumpănaș AA, Seclaman E, Marian C. Potential Diagnostic Biomarker Detection for Prostate Cancer Using Untargeted and Targeted Metabolomic Profiling. *Curr Issues Mol Biol*. 2023;**45**(6):5036-5051. doi: 10.3390/cimb45060320.
17. Sugimoto M, Kawakami M, Robert M, Soga T, Tomita M. Bioinformatics Tools for Mass Spectroscopy-Based Metabolomic Data Processing and Analysis. *Curr Bioinform*. 2012;**7**(1):96-108. doi: 10.2174/157489312799304431.
18. Samuel AL. Some Studies in Machine Learning Using the Game of Checkers. *IBM Journal of Research and Development*. 1959;**3**(3):210-229. DOI: 10.1147/rd.33.0210.
19. Schleder GR, Fazzio A. Machine Learning na Física, Química, e Ciência de Materiais: Descoberta e Design de Materiais. *Rev Bras Ensino Fís*. 2021;**43**: e20200407. DOI: 10.1590/1806-9126-RBEF-2020-0407.
20. Topol EJ. High-performance medicine: the convergence of human and artificial intelligence. *Nat Med*. 2019;**25**(1):44-56. DOI: 10.1038/s41591-018-0300-7.
21. Wang A, Li F, Chiang S, Fulcher J, Yang O, Wong D, Wei F. Machine Learning Prediction of COVID-19 Severity Levels from Salivaomics Data. *ArXiv*. **2022**. Preprint. DOI: arXiv:2207.07274v1.
22. Uddin S, Khan A, Hossain ME, Moni MA. Comparing different supervised machine learning algorithms for disease prediction. *BMC Med Inform Decis Mak*. 2019;**19**(1):281. doi: 10.1186/s12911-019-1004-8.

23. Associação Médica Mundial. Declaração de Helsinque: princípios éticos para as pesquisas médicas em seres humanos adotado pela 18ª Assembléia Médica Mundial. Helsinque, *Associação Médica Mundial*. **1964**. Disponível em: [https://www.fcm.unicamp.br/fcm/sites/default/files/declaracao\\_de\\_helsinque.pdf](https://www.fcm.unicamp.br/fcm/sites/default/files/declaracao_de_helsinque.pdf). Acesso em: 17 mar. 2025.

24. Brierley JD, Gospadarowicz MK, Wittekind C (ed.). TNM Classification of Malignant Tumors (UICC). *Oxford: Wiley-Blackwell*. 2017;**8th ed**. Disponível em: <https://www.uicc.org/resources/tnm-classification-malignant-tumours-8th-edition>. Acesso em: 10 out. 2022.

25. Epstein JI, Egevad L, Amin MB, Delahunt B, Srigley JR, Humphrey PA; Grading Committee. The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma: Definition of Grading Patterns and Proposal for a New Grading System. *Am J Surg Pathol*. 2016;**40**(2):244-52. doi: 10.1097/PAS.0000000000000530.

26. Gleason DF. Classification of prostatic carcinomas. *Cancer Chemother Rep.*, 1966;**50**:125-128. PMID: 5948714.

27. Buszewska-Forajta M, Pomastowski P, Monedeiro F, Walczak-Skierska J, Markuszewski M, Matuszewski M, Markuszewski MJ, Buszewski B. Lipidomics as a Diagnostic Tool for Prostate Cancer. *Cancers (Basel)*. 2021;**13**(9):2000. doi: 10.3390/cancers13092000.

28. The Human Metabolome Database. *Searching metabolites for phosphatidyletanolamine*. Canadian Institutes of Health Research, Canada Foundation for Innovation, and by The Metabolomics Innovation Centre. Canada, **2022**. Disponível em: <https://hmdb.ca/unearth/q?utf8=%E2%9C%93&query=phosphatidyletanolamine&searcher=metabolites&button=>. Acesso em: 6 dez. 2024.

29. Kennedy EP, Weiss SB. The function of cytidine coenzymes in the biosynthesis of phospholipides. *J Biol Chem*. 1956;**222**(1):193-214. PMID: 13366993.
30. Vance JE. Phospholipid synthesis and transport in mammalian cells. *Traffic*. 2015;**16**(1):1-18. doi: 10.1111/tra.12230.
31. Gibellini F, Smith TK. The Kennedy pathway--De novo synthesis of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine. *IUBMB Life*. 2010;**62**(6):414-28. doi: 10.1002/iub.337.
32. Dowhan W, Bogdanov M. Lipid-dependent membrane protein topogenesis. *Annu Rev Biochem*. 2009;**78**:515-40. doi: 10.1146/annurev.biochem.77.060806.091251.
33. Brink-van der Laan, E. van den; Killian, J. A. Kruijff, B. Nonbilayer lipids affect peripheral and integral membrane proteins via changes in the lateral pressure profile. *Biochim. Biophys. Acta*, 2004;**1666**(1-2):275-288. DOI: 10.1016/j.bbamem.2004.06.010.
34. Vance JE. Phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in mammalian cells: two metabolically related aminophospholipids. *J Lipid Res*. 2008;**49**(7):1377-87. doi: 10.1194/jlr.R700020-JLR200.
35. Becker T, Horvath SE, Böttinger L, Gebert N, Daum G, Pfanner N. Role of phosphatidylethanolamine in the biogenesis of mitochondrial outer membrane proteins. *J Biol Chem*. 2013;**288**(23):16451-16459. doi: 10.1074/jbc.M112.442392
36. Bogdanov M, Dowhan W. Lipid-assisted protein folding. *J Biol Chem*. 1999;**274**(52):36827-30. doi: 10.1074/jbc.274.52.36827.
36. Bogdanov M, Dowhan W. Phospholipid-assisted protein folding: phosphatidylethanolamine is required at a late step of the conformational maturation of the polytopic membrane protein lactose permease. *EMBO J*. 1998;**17**(18):5255-64. doi: 10.1093/emboj/17.18.5255.

37. Bogdanov M, Dowhan W. Phosphatidylethanolamine is required for in vivo function of the membrane-associated lactose permease of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*. 1995;**270**(2):732-9. doi: 10.1074/jbc.270.2.732.
38. Böttinger L, Horvath SE, Kleinschroth T, Hunte C, Daum G, Pfanner N, Becker T. Phosphatidylethanolamine and cardiolipin differentially affect the stability of mitochondrial respiratory chain supercomplexes. *J Mol Biol*. 2012;**423**(5):677-86. doi: 10.1016/j.jmb.2012.09.001.
39. Tasseva G, Bai HD, Davidescu M, Haromy A, Michelakis E, Vance JE. Phosphatidylethanolamine deficiency in Mammalian mitochondria impairs oxidative phosphorylation and alters mitochondrial morphology. *J Biol Chem*. 2013;**288**(6):4158-73. doi: 10.1074/jbc.M112.434183.
40. Ichimura Y, Kirisako T, Takao T, Satomi Y, Shimonishi Y, Ishihara N, et al. A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature*. 2000;**408**(6811):488-92. doi: 10.1038/35044114.
41. Verkleij AJ, Leunissen-Bijvelt J, de Kruijff B, Hope M, Cullis PR. Non-bilayer structures in membrane fusion. *Ciba Found Symp*. 1984;**103**:45-59. doi: 10.1002/9780470720844.ch4.
42. Birner R, Bürgermeister M, Schneider R, Daum G. Roles of phosphatidylethanolamine and of its several biosynthetic pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*. 2001;**12**(4):997-1007. doi: 10.1091/mbc.12.4.997.
43. Steenbergen R, Nanowski TS, Beigneux A, Kulinski A, Young SG, Vance JE. Disruption of the phosphatidylserine decarboxylase gene in mice causes embryonic lethality and mitochondrial defects. *J Biol Chem*. 2005;**280**(48):40032-40. doi: 10.1074/jbc.M506510200.

44. Storey MK, Clay KL, Kutateladze T, Murphy RC, Overduin M, Voelker DR. Phosphatidylethanolamine has an essential role in *Saccharomyces cerevisiae* that is independent of its ability to form hexagonal phase structures. *J Biol Chem*. 2001;**276**(51):48539-48. doi: 10.1074/jbc.M109043200.
45. Bremer J, Greenberg DM. Methyl transferring enzyme system of microsomes in the biosynthesis of lecithin (phosphatidylcholine). *Biochim. Biophys. Acta*. 1961;**46**:205-216. [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(61\)90745-4](https://doi.org/10.1016/0006-3002(61)90745-4)
46. Menon AK, Stevens VL. Phosphatidylethanolamine is the donor of the ethanolamine residue linking a glycosylphosphatidylinositol anchor to protein. *J. Biol. Chem.*, 1992;**267**(22):15277-15280. DOI: 10.1016/S0021-9258(19)49529-X.
47. Calzada E, Onguka O, Claypool SM. Phosphatidylethanolamine Metabolism in Health and Disease. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2016;**321**:29-88. doi: 10.1016/bs.ircmb.2015.10.001.
48. Tortorella E, Giantulli S, Sciarra A, Silvestri I. AR and PI3K/AKT in Prostate Cancer: A Tale of Two Interconnected Pathways. *Int J Mol Sci*. 2023;**24**(3):2046. doi: 10.3390/ijms24032046.
49. Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*, 2002;**296**(5573):1655-1657. DOI: 10.1126/science.296.5573.1655.
50. Knuplez E, Marsche G. An updated review of pro- and anti-inflammatory properties of plasma lysophosphatidylcholines in the vascular system. *Int. J. Mol. Sci*. 2020;**21**(12):4501. DOI: 10.3390/ijms21124501.
51. Liu P, Zhu W, Chen C, Yan B, Zhu L, Chen X, Peng C. The mechanisms of lysophosphatidylcholine in the development of diseases. *Life Sci*. 2020;**247**:117443. doi: 10.1016/j.lfs.2020.117443.
52. Satturwar S, Parwani AV. Artificial Intelligence-Enabled Prostate Cancer

Diagnosis and Prognosis: Current State and Future Implications. *Adv Anat Pathol*. 2024;**31**(2):136-144. doi: 10.1097/PAP.0000000000000425.

53. Perincheri S, Levi AW, Celli R, Gershkovich P, Rimm D, Morrow JS, et al. An independent assessment of an artificial intelligence system for prostate cancer detection shows strong diagnostic accuracy. *Mod Pathol*. 2021;**34**(8):1588-1595. doi: 10.1038/s41379-021-00794-x.

54. Chua IS, Gaziel-Yablowitz M, Korach ZT, Kehl KL, Levitan NA, Arriaga YE, et al. Artificial intelligence in oncology: Path to implementation. *Cancer Med*. 2021;**10**(12):4138-4149. doi: 10.1002/cam4.3935..

55. Cooperberg MR, Freedland SJ, Pasta DJ, Elkin EP, Presti JC Jr, Amling CL, et al. Multiinstitutional validation of the UCSF cancer of the prostate risk assessment for prediction of recurrence after radical prostatectomy. *Cancer*. 2006;**107**(10):2384-91. doi: 10.1002/cncr.22262.

56. Memorial Sloan Kettering Cancer Center. Pre-radical prostatectomy nomogram. [S. l.], *Memorial Sloan Kettering Cancer Center*. **2025**. Disponível em: [https://www.mskcc.org/nomograms/prostate/pre\\_op](https://www.mskcc.org/nomograms/prostate/pre_op). Acesso em: 22 mar. 2025.

57. Eggener SE, Rumble RB, Armstrong AJ, Morgan TM, Crispino T, Cornford P, et al. Molecular Biomarkers in Localized Prostate Cancer: ASCO Guideline. *J Clin Oncol*. 2020;**38**(13):1474-1494. doi: 10.1200/JCO.19.02768.

58. Boyer MJ, Carpenter DJ, Gingrich JR, Raman SR, Sirohi D, Tabriz AA, et al. Genomic classifiers and prognosis of localized prostate cancer: a systematic review. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2025;**28**(1):103-111. doi: 10.1038/s41391-023-00766-z.

59. Mazzone E, Gandaglia G, Ploussard G, Marra G, Valerio M, Campi R, et al. Risk Stratification of Patients Candidate to Radical Prostatectomy Based on Clinical and Multiparametric Magnetic Resonance Imaging Parameters: Development and

External Validation of Novel Risk Groups. *Eur Urol*. 2022;**81**(2):193-203. doi: 10.1016/j.eururo.2021.07.027.

60. Spratt DE, Zhang J, Santiago-Jiménez M, Dess RT, Davis JW, Den RB, et al. Development and Validation of a Novel Integrated Clinical-Genomic Risk Group Classification for Localized Prostate Cancer. *J Clin Oncol*. 2018;**36**(6):581-590. doi: 10.1200/JCO.2017.74.2940.

### **Contribuições do autor**

## Artigo 2

### **ATR - FTIR E INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL NA VIGILÂNCIA ATIVA NO CÂNCER DE PRÓSTATA**

### **ATR - FTIR AND ARTIFICIAL INTELLIGENCE IN ACTIVE SURVEILLANCE IN PROSTATE CANCER**

Sebastião Antônio Borba<sup>1</sup>, Leandro Alves de Oliveira<sup>1</sup>, Aline Gomes de Souza<sup>3</sup>, Hebreia Oliveira Almeida Souza<sup>2</sup>, Mario Machado Martins<sup>3</sup>, Robinson Sabino Silva<sup>4</sup>, Abel Dib Rayashi<sup>5</sup>, Emília Rezende Vaz<sup>3</sup>, Vivian Alonso Goulart<sup>1</sup>, Esther Campos Fernandez<sup>3</sup>, Bruno Henrique Carrijo Borba<sup>5</sup>, Luiz Ricardo Goulart Filho<sup>1\*</sup>, Thulio Marquez Cunha<sup>5\*\*</sup>

\*In memorian

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

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

<sup>3</sup> Laboratório de Nanobiotecnologia Prof. Dr, Luiz Ricardo Goulart Filho, Instituto de Biotecnologia, Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.

<sup>4</sup> Centro de Inovação em Diagnóstico Salivar e Nanobiotecnologia, Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.

<sup>5</sup> Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.

\*\* Endereço do autor:

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

## RESUMO

Aproximadamente metade dos tumores de próstata recém-diagnosticados são localizados e potencialmente elegíveis para vigilância ativa. A definição de qual paciente deve receber tratamento definitivo ainda é alvo de controvérsias. Há evidências da necessidade de se identificar novas plataformas que possam contribuir para indicar observação vigilante com maior precisão. É imperativo que novos métodos sejam não invasivos, econômicos, rápidos e altamente sensíveis e a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) é uma técnica que atende a estes critérios. Avaliamos a plataforma ATR - FTIR e inteligência artificial para definição de vigilância ativa ou tratamento definitivo, para pacientes com no câncer de próstata clinicamente localizado. Os 11 pacientes com adenocarcinoma de próstata clinicamente localizados, conforme estratificação de risco de progressão e orientações de manejo da NCCN versão 4 2024, foram divididos em dois grupos com 8 (72,7%) participante elegíveis para vigilância ativa (grupo 1) e 3 (27,2%) com indicação de tratamento definitivo (grupo 2). O processamento dos espectros de FTIR de soro seco nos dois grupos foi realizado no software Orange 3.35. Os dados espectrais foram truncados para abranger a região lipídica ( $3050\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$ ) e a região de impressão digital ( $1800\text{--}900\text{ cm}^{-1}$ ). Para avaliação do desempenho preditivo foram utilizados os algoritmos: Redes Neurais Artificiais, AdaBoost, Random Forest e Máquina de Vetores de Suporte (SVM). O algoritmo SVM foi o que apresentou melhor desempenho na separação dos grupos com sensibilidade, especificidade e acurácia de 100%. O método SHAP (*Shapley Additive Explanations*) identificou os modos vibracionais que mais contribuíram para o desempenho preditivo do algoritmo SVM e os dois picos de espectros mais significativos foram o  $1423\text{ cm}^{-1}$  (Vibrações de anel mistos com flexão CH no plano) e  $3011\text{ cm}^{-1}$  (Estiramento N-H). Algoritmo de Inteligência artificial através de dados de FTIR no soro de pacientes com câncer de próstata clinicamente localizado identificou de maneira precisa os grupos elegíveis para vigilância ativa e com indicação de intervenção.

Palavras chaves: câncer de próstata, ATR-FTIR, vigilância ativa, tratamento definitivo, inteligência artificial, aprendizagem de máquina.

## ABSTRACT

Approximately 50% of newly diagnosed prostate cancers are localized and potentially eligible for active surveillance. The criteria for determining which patients should receive definitive treatment remain a subject of ongoing debate. Evidence suggests the need for new platforms that can more accurately indicate vigilant observation. It is imperative that these new methods be non-invasive, cost-effective, rapid, and highly sensitive; Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy meets these criteria. The ATR-FTIR platform and artificial intelligence were evaluated for determining active surveillance or definitive treatment in patients with clinically localized prostate cancer. Eleven patients with clinically localized prostate adenocarcinoma, according to the National Comprehensive Cancer Network (NCCN) risk stratification and management guidelines, version 4, 2024, were divided into two groups: 8 (72,7%) eligible for active surveillance (Group 1) and 3 (27,2%) indicated for definitive treatment (Group 2). FTIR spectra of dried soro from both groups were processed using Orange 3.35 software. Spectral data were truncated to cover the lipid region ( $3050\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$ ) and the fingerprint region ( $1800\text{--}900\text{ cm}^{-1}$ ). Predictive performance was evaluated using algorithms: Artificial Neural Networks, AdaBoost, Random Forest, and Support Vector Machine (SVM). The SVM algorithm demonstrated the best performance in separating the groups, with 100% sensitivity, specificity, and accuracy. The Shapley Additive Explanations (SHAP) method identified the vibrational modes most contributing to the SVM algorithm's predictive performance. The two most significant spectral peaks were at  $1423\text{ cm}^{-1}$  (mixed ring vibrations with in-plane CH bending) and  $3011\text{ cm}^{-1}$  (N-H stretching). Artificial intelligence algorithms applied to FTIR soro data from patients with clinically localized prostate cancer accurately identified groups eligible for active surveillance and those indicated for intervention.

Keywords: prostate cancer, ATR-FTIR, active surveillance, definitive treatment, artificial intelligence, learning machine.

## INTRODUÇÃO

No Brasil e no mundo o câncer de próstata (CaP), exceto o câncer de próstata não melanoma, é a neoplasia mais comum nos homens, correspondendo a 15% dos cânceres mundialmente e a segunda causa de mortes por câncer após o câncer de pulmão<sup>1,2</sup>. A Comissão *Lancet* sobre câncer de próstata, estimou que o número de novos casos por ano no mundo, aumentará de 1,4 milhão em 2020 para 2,9 milhões até 2040 e recomenda que os governos preparem estratégias para enfrentar este desafio<sup>2,3</sup>.

A vigilância ativa é recomendada pela NCCN para pacientes com câncer de próstata (CaP) de risco muito baixo, baixo e intermediário favorável, com expectativa de vida superior a 10 anos, como forma de adiar o tratamento definitivo e seus efeitos adversos, como incontinência urinária e disfunção erétil. Cerca de metade dos casos recém-diagnosticados são potencialmente elegíveis para essa abordagem, que pode manter a chance de cura futura. Estudos indicam que muitos pacientes permanecem em vigilância por até 10 anos sem progressão, embora exista risco de evolução da doença com metástases<sup>4, 5, 6, 7, 8</sup>.

Há evidências da necessidade de se identificar novas plataformas que possam contribuir para indicar observação vigilante com maior precisão, evitando tratamentos radicais inadequados (sobretratamento) e seus riscos inerentes de efeitos adversos<sup>9,10</sup>.

A espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) utilizando a reflexão total atenuada (ATR) é um método de espectroscopia vibracional usado para análise qualitativa e estrutural que identifica moléculas com base em sua absorção no infravermelho<sup>11,12</sup>.

A espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier com reflexão total atenuada (ATR-FTIR) é uma técnica vibracional que permite a identificação de moléculas com base em sua absorção de radiação infravermelha, sem necessidade de preparo de amostra ou uso de reagentes. Simples, rápida, de baixo custo e não invasiva, a ATR-FTIR possibilita a análise direta de amostras biológicas, detectando alterações bioquímicas no nível molecular. Seu potencial uso no câncer de próstata (CaP) inclui a identificação de biomarcadores sensíveis por meio das vibrações moleculares específicas presentes no espectro da região do infravermelho médio (MIR), possibilitando aplicações em diagnóstico, prognóstico e monitoramento da doença<sup>12,13,14,15, 16, 17, 18, 19, 20,21</sup>.

A associação da espectroscopia ATR-FTIR com algoritmos de *machine learning* (ML) permite a análise automatizada e precisa dos espectros obtidos, facilitando a identificação de padrões bioquímicos relevantes para diagnóstico e prognóstico em diversas doenças, incluindo o câncer<sup>11, 12, 15, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30,31</sup>.

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<sup>32</sup>.

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<sup>33</sup>.

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<sup>34</sup>.

O objetivo do estudo foi utilizando a plataforma ATR -FTIR no soro de pacientes com CaP clinicamente localizado, identificar alterações moleculares e desenvolver algoritmo de inteligência artificial para contribuir para indicação de observação vigilante com maior precisão.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Aspectos éticos e biossegurança**

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) sob Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) 71108817.2.0000.5152 e os pacientes que concordaram em participar, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Os métodos utilizados neste trabalho foram realizados seguindo as diretrizes éticas

relevantes da declaração de Helsinki<sup>35</sup> e os protocolos de segurança do laboratório de Nanobiotecnologia Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho, do Instituto de Biotecnologia da UFU.

### **Desenho do estudo**

Estudo clínico, epidemiológico, analítico, observacional, transversal, com participantes com CaP clinicamente localizados submetidos à prostatectomia radical.

### **Fonte de dados**

Os pacientes foram selecionados no Hospital de Clínicas (HC) da UFU e as análises laboratoriais realizadas no Laboratório de Nanobiotecnologia Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho do Instituto de Biotecnologia da UFU, no período de 2018 a 2024.

### **Critérios de inclusão**

Participaram deste estudo pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma de próstata por biópsia, clinicamente localizado, submetidos a tratamento cirúrgico, prostatectomia radical (PR) aberta ou videolaparoscópica recrutados no período de 2018 a 2024. Os participantes foram separados em dois grupos elegíveis para vigilância ativa (grupo 1) e com indicação de intervenção (grupo 2) de acordo com a classificação de risco da NCCN versão 4 de 2024.

### **Critérios de exclusão**


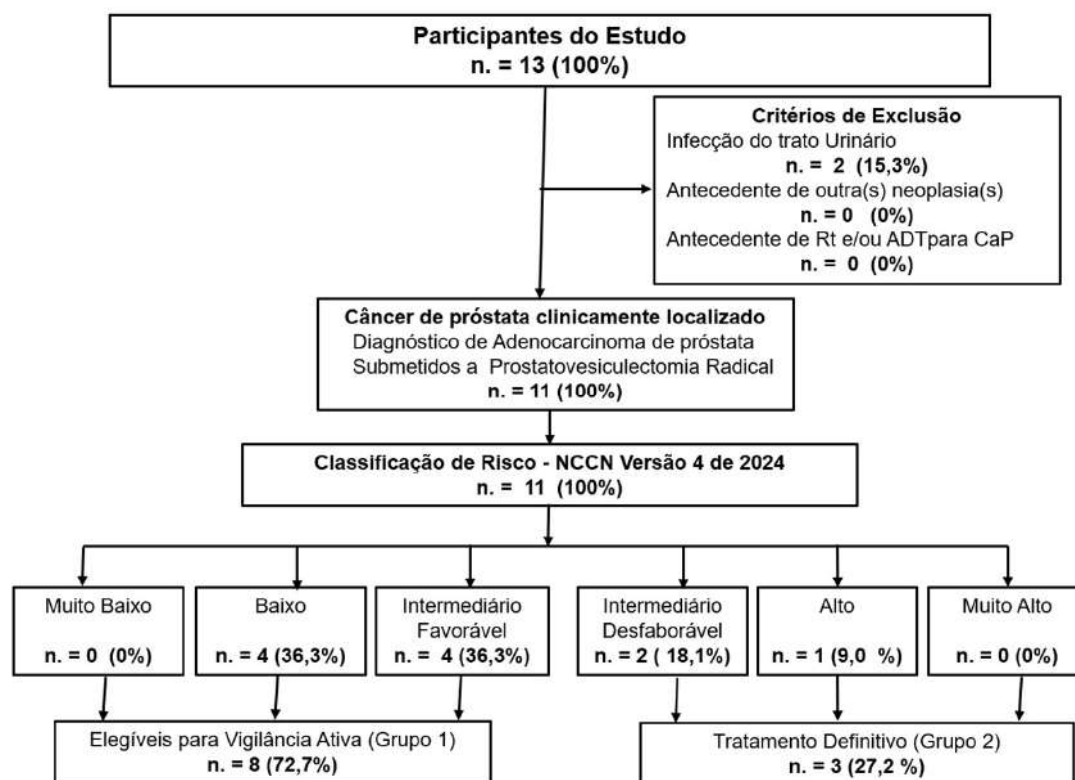
Foram excluídos pacientes com infecção do trato urinário até 7 dias antes da coleta de amostra de sangue, com antecedentes de outra(s) neoplasia(s) e de radioterapia e/ou terapia de derivação androgênica (ADT) para tratamento de CaP. Figura A1.

Figura 1 - Desenho do estudo



Fonte: os autores.

Legenda: n. = número - % = percentagem - Rt = radioterapia - ADT = terapia de derivação androgênica - CaP = câncer de próstata - NCCN = National Comprehensive Câncer Network<sup>4</sup>.

### Coleta de amostra biológica

Foi coletada amostra com cerca de 5mL a 10mL de sangue periférico de cada participante, utilizando-se agulha descartável e sistema a vácuo, em tubo com gel separador de plasma. As coletas ocorreram nos dias dos procedimentos cirúrgicos, na sala cirúrgica, antes da anestesia, com jejum de no mínimo 8 horas e entregues ao Laboratório de Nanobiotecnologia Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho em até 3 horas para início do processamento. As amostras foram imediatamente centrifugadas e o soro separado e congelado a -80° C e armazenado em freezer para posterior realização das análises ATR - FTIR.

Foram realizados exames anatomopatológicos das peças cirúrgicas de todos os participantes pelo serviço de patologia do Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina - UFU.

## Variáveis

As variáveis foram agrupadas em dados demográficos: idade, sexo, raça; dados clínicos: história familiar de câncer de próstata, avaliação clínica de infecção do trato urinário, antecedente de neoplasia(s), toque retal e estadiamento clínico (cT); exames laboratoriais: antígeno prostático específico (PSA) livre e total; exame de imagem: ultrassonografia (US) trans abdominal e/ou trans retal de próstata; densidade do PSA (DPSA); exames anatomopatológicos das biópsias de próstata e das peças cirúrgicas.

## Classificação de risco de progressão do câncer de próstata

Foi utilizado para estratificar o risco de progressão do câncer de próstata a classificação da *National Comprehensive Cancer Network versão 4 de 2024*<sup>4</sup>.

## 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  $\text{cm}^{-1}$ . A aquisição espectral foi realizada com resolução de 2  $\text{cm}^{-1}$ , 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  $\mu\text{l}$  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 duplicata para garantir a reprodutibilidade 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  $\text{cm}^{-1}$  do espectro original.

## **Análise Multivariada**

Os dados espectrais foram truncados para abranger a região lipídica (3050–2800  $\text{cm}^{-1}$ ) e a região de impressão digital (1800–900  $\text{cm}^{-1}$ ), 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.

## **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  $\text{cm}^{-1}$ ) associada à região de impressão digital (1800–900  $\text{cm}^{-1}$ ). 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.

## **Análise estatística**

As características dos participantes foram analisadas usando cálculos estatísticos descritivos: valor de média e desvio padrão para variáveis contínuas e valores absolutos e percentual para variáveis categóricas.

Foi verificado 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 e, para aqueles com distribuição não normal,

utilizou-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Para variáveis qualitativas foi utilizado o teste exato de Fisher generalizado. Foi considerado nível de significância de 0,05.

RESULTADOS

Participantes

Foram comparados os grupos de pacientes: elegíveis para vigilância ativa (Grupo 1 n. = 8) e com indicação de tratamento definitivo ou intervenção (Grupo 2 n. = 3) de acordo com a estratificação de risco e manejo do CaP da NCCN versão 4 de 2024. (NCCN, 2024). Os dados dos pacientes: estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Dados dos participantes: demográficos, clínicos, classificação de risco orientações para manejo do CaP da NCCN versão 4 de 2024 e valor de *p*.

		Participantes 11 (100)	Classificação de Risco e Manejo do Câncer de Próstata - ( NCCN versão 4 2024)					
			Elegíveis para Vigilância Ativa (Grupo1) 8 (72,7)			Indicado Intervenção (Grupo2) 3 (27,3)		
Total n (%)			Muito Baixo	Baixo	Intermediário Favorável	Intermediário Desfavorável	Alto	Muito Alto
Classificação de risco (NCCN versão 4 2024)			0 (0)	4 (50,0)	4 (50,0)	2 (66,6)	1 (33,3)	0 (0)
n (%) / Valor de p								
Idade em anos (a)	Média ± DP	62 ± 8		65 ± 9	64 ± 8	63	42	
Classificação da Cor da	n. (%)							
	Branco	5 (45,4)		2 (50)	2 (50)		1 (100)	
	Pardo	6 (54,5)		2 (50)	2 (50)			
	Negro	0 (0,0)						
História familiar de Câncer de Próstata	n. (%)							
	Sim	2 (18,19		1 (25)		1 (50)		
	Não	9 (81,8)		3 (75)	4 (100)	1 (50)	1 (100)	
PSA T Pré Biópsia ng/mL	Média ± DP	7,6 ± 4		7,3 ± 4	4,8 ± 4	9,2 ± 4	16 ± 0	
PSA L Pré Biópsia ng/mL	Média ± DP	0,7 ± 0,3		0,6 ± 0	0,7 ± 0	0,7 ± 0	1,3 ± 0	
Relação % PSA L/T Pré Biópsia	Média ± DP	10,3 ± 4		8,2 ± 2	14,3 ± 2	8,1 ± 4	7,9 ± 0	
(cT) Estadiamento Clínico Toque Retal	n. (%)							
	cT1 c	7 (63,3)		3 (75,0)	3 (75,0)	1 (50)		
	cT2 a	2 (18,1)		1 (25,0)	1 (25,0)			
	cT2 b	2 (18,1)						
	cT2c					1 (50)	1 (100)	
Densidade PSA T ng/mL/cm³	Média ± DP	0,22 ± 0,08		0,27 ± 0	0,13 ± 0	0,29 ± 0		
US Volume da Próstata em (g)	Média ± DP	37 ± 12		32 ± 12	40 ± 12	33 ± 124		
Grau ISUP 2014 / Gleason Biópsia Próstata	n. (%)					1 (50)		
	G 1 (3+3)	5 (45,4)		4 (100)		1 (50)		
	G 2 (3+4)	5 (45,4)			4 (100)			
	G 3 (4+3)							
	G 4 (Gleason 8)	1 (9,0)					1 (100)	
	G 5 (Gleason 9 ou 10)							

Fonte: os autores.

Legenda: NCCN = *National Comprehensive Cancer Network*<sup>4</sup> -. = número - % = percentual - PSA = antígeno prostático específico - ng = nanograma - mL = mililitro - DP = desvio padrão - (cT) = estadiamento clínico pelo toque retal<sup>36</sup> (Brierley, Gospadarowicz; Wittekind., 2017) - cm<sup>3</sup> = centímetro(s) cúbico - US = ultrassonografia - g = grama(s) - ISUP = *International Society of Urological Pathology*<sup>37</sup> - Gleason = escores de Gleason<sup>38</sup>.

Entre os grupos não se observou diferença em relação à idade, cor, histórico

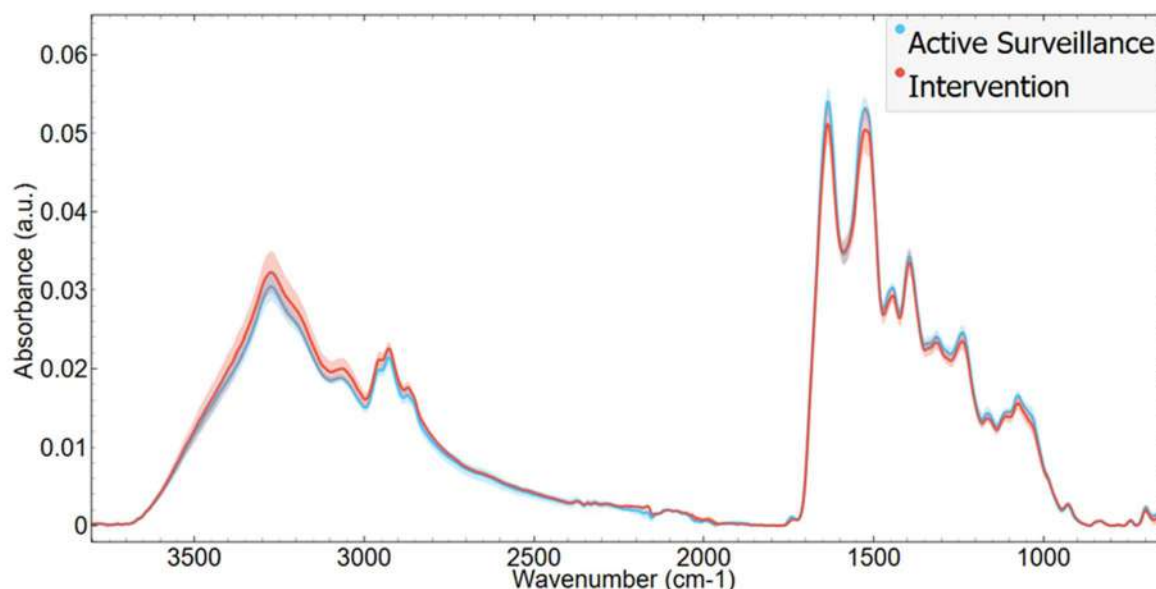
familiar, dosagem de PSA livre, relação PSA livre/total, estadiamento clínico e volume prostático. As variáveis com diferença numéricas entre os dois grupos foram a dosagem do PSA total, a densidade do PSA total e o Grau da ISUP2014 das biópsias.

Os exames anatomopatológicos das peças cirúrgicas de todos os participantes confirmaram câncer de próstata localizado (pT2) pela classificação TNM<sup>36</sup>.

### Perfil infravermelho no soro

O espectro médio do infravermelho original do soro na região de impressão digital (3700–800  $\text{cm}^{-1}$ ) coletado de pacientes elegíveis para vigilância ativa e com indicação de intervenção indica uma superposição de componentes no soro, como proteínas, lipídeos, DNA/RNA e carboidratos (Figura 2).

Figura 2. Espectro representativo médio, com respectivo desvio padrão, do ATR-FTIR (3700–900  $\text{cm}^{-1}$ ) no soro de pacientes elegíveis para vigilância ativa e com indicação de intervenção.



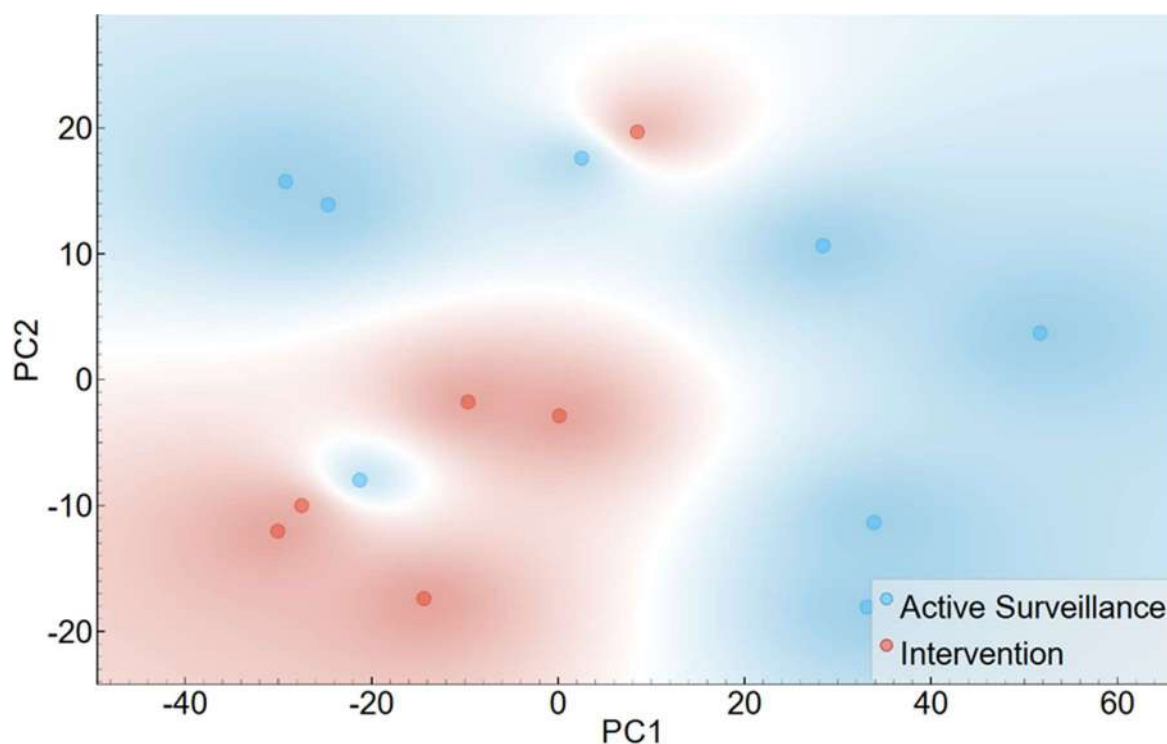
Fonte: os autores

### Análise de componentes principais (PCA)

Em seguida, a Análise de Componentes Principais (PCA) foi empregada para reduzir a dimensionalidade, comparando as alterações espectrais no infravermelho de pacientes elegíveis para vigilância ativa e com indicação de intervenção, com foco nos espectros truncados das regiões lipídica (3050–2800  $\text{cm}^{-1}$ ) e impressão digital (1800–

900  $\text{cm}^{-1}$ ). Estes espectros revelaram diferenças significativas entre os grupos elegíveis para vigilância ativa e com indicação de intervenção. Dois componentes principais, PC1 e PC2, explicaram, juntos, 69% da variância cumulativa, sendo PC1 responsável por 56% e PC2 por 13% (Figura 3).

Figura 3. Gráfico de escores da PCA para PC1 vs. PC2 (A) e loadings da PCA para PC1 e PC2 (B).



Fonte: os autores.

### **Análise de discriminação**

Para classificar e realizar análise preditiva das amostras espectrais no soro de pacientes elegíveis para vigilância ativa e com indicação de intervenção, foram utilizadas ferramentas de inteligência artificial (Tabela 2). Os resultados demonstraram que o algoritmo SVM foi o mais eficaz para discriminar entre pacientes em vigilância ativa e intervenção. O método de pré-processamento ideal combinou Filtro Derivada de Savitzky-Golay + Normalização Min-Max + Redução de Ruído MNF (Minimum Noise Fraction). O melhor desempenho foi avaliado utilizando os espectros das faixas de 3050–2800  $\text{cm}^{-1}$  e 1800–900  $\text{cm}^{-1}$ . Com esta abordagem de pré-processamento o modelo supervisionado SVM apresentou sensibilidade, especificidade e acurácia de

100% na diferenciação dos espectros de pacientes em vigilância ativa e intervenção.

Tabela 2.

Tabela 2. Algoritmos de aprendizado de máquina aplicados aos espectros do soro para discriminar pacientes em vigilância ativa e intervenção.

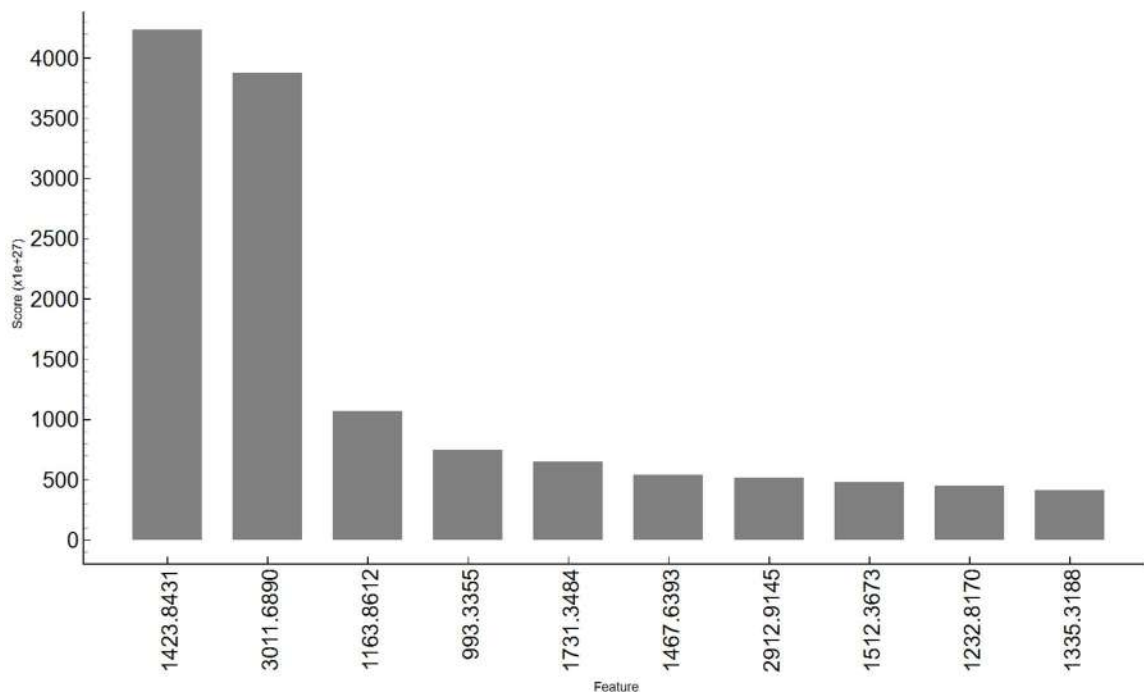
Pré-processamento Métodos de seleção de atributos	Modelos	Acurácia (%)	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
Dados brutos	Neural Network	92.9	100,0	87.5
	AdaBoost	57.1	66.7	50.0
	Random Forest	42.9	16.7	62.5
	SVM	42.9	0.0	75.0
Suavização Gaussiana + Normalização Min- Max	Neural Network	71.4	66.7	75.0
	AdaBoost	28.6	16.7	37.5
	Random Forest	71.4	50.0	87.5
	SVM	71.4	50.0	87.5
Suavização Gaussiana + PCA + Normalização Min- Max	Rede Neural	78.6	83.3	75.0
	AdaBoost	85.7	83.3	87.5
	Random Forest	85.7	83.3	87.5
	SVM	64.3	50.0	75.0
Filtro Savitzky-Golay + normalização Min-Max + redução de ruído MNF	Neural Network	92.9	100.0	87.5
	AdaBoost	92.9	100.0	87.5
	Random Forest	85.7	83.3	87.5
	<b>SVM</b>	<b>100.0</b>	<b>100.0</b>	<b>100.0</b>

Fonte: os autores

### Método SHAP (*Shapley Additive Explanations*)

Por fim, aplicou-se o método SHAP (*Shapley Additive Explanations*), para identificar os modos vibracionais que mais contribuíram para o desempenho preditivo do algoritmo SVM. Os valores de importância de cada característica, obtidos do SVM com espectros pré-processados (Filtro Savitzky-Golay + Normalização Min-Max + MNF), destacaram os principais modos vibracionais responsáveis pela discriminação das amostras. Os principais modos identificados foram: 1423  $\text{cm}^{-1}$ , 3011  $\text{cm}^{-1}$ , 1163  $\text{cm}^{-1}$ , 933  $\text{cm}^{-1}$ , 1731  $\text{cm}^{-1}$ , 1467  $\text{cm}^{-1}$ , 2912  $\text{cm}^{-1}$ , 1512  $\text{cm}^{-1}$ , 1232  $\text{cm}^{-1}$  e 1335  $\text{cm}^{-1}$  (Figura 4). Os respectivos agrupamentos moleculares para cada modo vibracional conforme análise do SHAP para SVM estão apresentados na Tabela 3.

Figura 4. Gráfico de importância das características (valores SHAP) do modelo SVM para discriminar pacientes em vigilância ativa e intervenção.



Fonte: os autores

Tabela 3. Atribuição das bandas dos valores SHAP de cada característica para discriminar pacientes em vigilância ativa e intervenção.

Número de Onda (cm <sup>-1</sup> )	Atribuição de Banda
1423	Vibrações (alongamento C=O) do anel misturadas com flexão CH no plano
3011	Estiramento N-H
1163	vC-O de proteínas e carboidratos
993	Região fosfodiéster
1731	Ésteres de ácidos graxos
1467	Banda metil colesterol
2912	Estiramento de CH <sub>2</sub> e CH <sub>3</sub> de fosfolipídeos, colesterol e creatina
1512	Amida II (vibração de flexão N-H acoplada ao alongamento C-N)

1232	Amida III (estiramento C-N e flexão de N-H no plano, frequentemente com contribuição de oscilações de CH <sub>2</sub> )
1335	δ(CH), anel (polissacarídeos, pectina)

Fonte: os autores.

## DISCUSSÃO

A inteligência artificial utilizando os dados espectrais da ATR-FTIR, neste estudo, revelaram diferenças significativas nos grupos elegíveis para vigilância ativa e com indicação de intervenção.

Analisando as variáveis utilizadas e a estratificação de risco e orientações de manejo do CaP da NCCN versão 4 de 2024 nos dois grupos, as características sociodemográficas não apresentaram diferença numéricas. As variáveis dosagem do PSA total, densidade do PSA total e o Grau da ISUP2014 das biópsias foram as que se mostraram com diferenças numéricas entre os dois grupos, achados estão de acordo com os dados de literatura.

O espectro médio do infravermelho original do soro na região de impressão digital (3700–800 cm<sup>-1</sup>) nos dois grupos, mostrou uma superposição de componentes do soro, como proteínas, lipídeos, DNA/RNA e carboidratos.

Espectros infravermelhos possuem muitos dados (cada “pico”) é uma variável) e a Análise de Componentes Principais (PCA - *Principal Component Analysis*), um método linear não supervisionado, transforma esses milhares de informações em um novo conjunto de variáveis (“componentes principais”) que capturam as maiores e mais importantes variações nos dados. Juntos, PC1 (com 56%) + PC2 (com 13%) explicam 69% da variância total do conjunto de dados nos espectros truncados das regiões lipídica (3050–2800 cm<sup>-1</sup>) e região de impressões digitais (“fingerprint region”). (1800–900 cm<sup>-1</sup>) mostrando a maior parte das informações importantes sobre as diferenças entre os grupos elegíveis para vigilância ativa e com indicação de intervenção identificadas na PCA.

Com as ferramentas de seleção de atributos que se mostraram ideais no pré-processamento: Derivada de Savitzky-Golay, Normalização Min-Max e Redução de Ruído MNF e os espectros das faixas de 3050–2800 cm<sup>-1</sup> e região de impressões

digitais (“fingerprint region”) 1800–900  $\text{cm}^{-1}$ , dentre os algoritmos testados o MVM (Support Vector Machine) apresentou o melhor desempenho preditivo com sensibilidade, especificidade e acurácia de 100% na separação dos dois grupos.

A faixa de 3050–2800  $\text{cm}^{-1}$  é conhecida como região das vibrações das ligações C-H e é muito sensível à presença de: lipídios (gorduras), proteínas (certos grupos) e  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$  presentes em cadeias de hidrocarbonetos (comuns em membranas celulares). As principais absorções nesta faixa são: ~2950  $\text{cm}^{-1}$  (Estiramento assimétrico do  $\text{CH}_3$ ), ~2920  $\text{cm}^{-1}$  (Estiramento assimétrico do  $\text{CH}_2$ ) e ~2850  $\text{cm}^{-1}$  (Estiramento simétrico do  $\text{CH}_2$ ). Essas bandas indicam a composição e o ambiente molecular dos lipídios e proteínas no soro. A faixa espectral 1800–900  $\text{cm}^{-1}$  é conhecida como região de impressões digitais (“fingerprint region”). Aqui, há uma enorme variedade de absorções, cada uma relacionada a diferentes grupos químicos sendo as principais: ~1740  $\text{cm}^{-1}$  (Estiramento do grupo C=O) (carbonila), presente em lipídios, ésteres e ácidos graxos, ~1650  $\text{cm}^{-1}$  (Banda Amida I) (proteínas, principalmente as ligações C=O dos peptídeos), ~1540  $\text{cm}^{-1}$  (Banda Amida II) (proteínas, ligações N-H e C-N), 1450–1390  $\text{cm}^{-1}$  (Grupos metil e metileno), importantes para proteínas e lipídios e 1200–900  $\text{cm}^{-1}$  (C-O e P=O), associados a carboidratos, ácidos nucleicos, fosfolipídios. Esta região permite identificar assinaturas químicas muito específicas de moléculas biológicas complexas<sup>16,42</sup>.

A técnica SHAP (Shapley Additive Explanations)<sup>34</sup> identificou quais faixas do espectro (os chamados modos vibracionais) foram as mais relevantes para a tomada de decisão do SVM. Os modos vibracionais com picos de 1423  $\text{cm}^{-1}$  (Vibrações de anel mistas com flexão CH no plano) e 3011  $\text{cm}^{-1}$  (Estiramento N-H), sinalizando para fosfolipídeos, foram os que mais contribuíram.

Este estudo é pioneiro em avaliar a ATR-FTIR no soro de pacientes com câncer de próstata clinicamente localizado, separados em dois grupos, elegíveis para vigilância ativa e com indicação de tratamento definitivo ou intervenção.

O trabalho de Mitura e colaboradores mostrou que algoritmos de aprendizado de máquina (ML) demonstraram alta precisão em FTIR na diferenciação de soro obtido de pacientes controle e com câncer de próstata<sup>43</sup>.

Além do diagnóstico, os algoritmos de IA têm o potencial de revelar novos insights sobre a compreensão da biologia do câncer de próstata e permitir uma melhor estratificação de risco e prognóstico<sup>44</sup>.

A IA em cancerologia tem demonstrado desempenho de alta precisão em anatomia patológica<sup>45</sup>, análise de imagens, análise preditiva e entrega de oncologia de precisão. No entanto, a adoção de ferramentas de IA não é generalizada e seu impacto para os pacientes nesta área ainda está em construção. Ações concretas para superar as barreiras à implementação da IA incluem treinar e educar a força de trabalho oncológica em IA; padronizar dados, métodos de validação de modelos e regulamentações legais e de segurança; financiar e conduzir pesquisas futuras; e desenvolver, estudar e implantar ferramentas de IA por meio de colaboração multidisciplinar<sup>46</sup>.

## CONCLUSÃO

Algoritmo de Inteligência artificial utilizando dados espectrais de FITR no soro de pacientes com câncer de próstata clinicamente localizado, identificou de maneira precisa os grupos elegíveis para vigilância ativa e com indicação de intervenção, se apresentando como uma plataforma promissora para contribuir na indicação de vigilância ativa com maior precisão.

## Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

## AGRADECIMENTOS

A todos os colegas e participantes que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão deste trabalho. Ao Programa de Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. Os autores também agradecem o financiamento da pesquisa ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Teranóstica e Nanobiotecnologia e à FAPEMIG.

## REFERÊNCIAS

1. Instituto Nacional do Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Divisão de Vigilância e Análise de Situação. Estimativa de Câncer no Brasil. *Instituto Nacional do Câncer*. Rio de Janeiro, **2022**. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/numeros/estimativa/sintese-de-resultados-e-comentarios>. Acesso

em: 22 nov. 2024

2. World Health Organization. International Agency for Research on Cancer. Prostate. *In: Cancer Today*. Lyon, **2022**. Disponível em: [https://gco.iarc.fr/today/en/dataviz/pie?mode=population&group\\_populations=0&cancers=27](https://gco.iarc.fr/today/en/dataviz/pie?mode=population&group_populations=0&cancers=27). Acesso em: 17 mar. 2025.
3. James ND, Tannock I, N'Dow J, Feng F, Gillessen S, Ali SA, *et al*. The Lancet Commission on prostate cancer: planning for the surge in cases. *Lancet*. 2024;**403**(10437):1683-1722.
4. National Comprehensive Cancer Network. NCCN clinical practice guidelines in oncology: prostate cancer. *National Comprehensive Cancer Network*, Plymouth Meeting, 2024;**4**. Disponível em: <https://www.nccn.org/guidelines/guidelines-detail?category=1&id=1459>. Acesso em: 22 nov. 2024.
5. Vernooij RWM, Cremers RGHM, Jansen H, Somford DM, Kiemeny LA, van Andel G, *et al*. Corrigendum to "Urinary incontinence and erectile dysfunction in patients with localized or locally advanced prostate cancer: a nationwide observational study". *Urol Oncol*. 2022;**40**(7):353. DOI: 10.1016/j.urolonc.2022.05.007.
6. Tosoian JJ, Mamawala M, Epstein JI, Landis P, Wolf S, Trock BJ, Carter HB. Intermediate and Longer-Term Outcomes from a Prospective Active-Surveillance Program for Favorable-Risk Prostate Cancer. *J Clin Oncol*. 2015;**33**(30):3379-3385. DOI: 10.1200/JCO.2015.62.5764.7.
7. Cooley LF, Emeka AA, Meyers TJ, Cooper PR, Lin DW, Finelli A, *et al*. Factors Associated with Time to Conversion from Active Surveillance to Treatment for Prostate Cancer in a Multi-Institutional Cohort. *J. Urol*. 2021;**206**(5):1147-1156. DOI: 10.1097/JU.0000000000001937.
8. Schaeffer EM, Srinivas S, Adra N, An Y, Barocas D, Bitting R, *et al*. NCCN

Guidelines® Insights: Prostate Cancer, Version 1.2023. *J Natl Compr Canc Netw*. 2022;**20**(12):1288-1298. DOI: 10.6004/jnccn.2022.0063.

9. Tricoli JV, Schoenfeldt M, Conley BA. Detection of prostate cancer and predicting progression: current and future diagnostic markers. *Clin. Cancer Res*. 2004;**10**(12 Pt 1):3943-3953. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-03-0200.

10. Schröder FH, Hugosson J, Roobol MJ, Tammela TL, Ciatto S, Nelen V, *et al*. Screening and prostate-cancer mortality in a randomized European study. *N. Engl. J. Med*. 2009;**360**(13):1320-1328. DOI: 10.1056/NEJMoa0810084.

11. Caixeta DC, Carneiro MG, Rodrigues R, Alves DCT, Goulart LR, Cunha TM, *et al*. Salivary ATR-FTIR Spectroscopy Coupled with Support Vector Machine Classification for Screening of Type 2 Diabetes Mellitus. *Diagnostics*, [Basel]. 2023;**13**(8):1396. DOI: <https://doi.org/10.3390/diagnostics13081396>

12. Bel'skaya LV, Sarf EA, Makarova NA. Use of fourier transform ir spectroscopy for the study of saliva composition. *J Appl Spectrosc*. 2018;**85**:445-451. DOI: 10.1007/s10812-018-0670-0.

13. Barth A. Infrared spectroscopy of proteins. *Biochim Biophys Acta*. 2007;**1767**(9):1073-1101. DOI: 10.1016/j.bbabi.2007.06.004.

14. Huck CW. Recent Developments in Solid-Phase Extraction for Near and Attenuated Total Reflection Infrared Spectroscopic Analysis. *Molecules*. 2016;**21**(5):633. DOI: 10.3390/molecules21050633.

15. Ellis DI, Goodacre R. Metabolic fingerprinting in disease diagnosis: biomedical applications of infrared and Raman spectroscopy. *Analyst*. 2006;**131**(8):875-885. DOI: 10.1039/b602376m.

16. Stuart BH. Biological applications. *In*: Stuart BH. Infrared spectroscopy: fundamentals and applications. *Chichester: John Wiley & Sons*. 2004;**7**:137-165.

17. Noreen R, Moenner M, Hwu Y, Petibois C. FTIR spectro-imaging of collagens for characterization and grading of gliomas. *Biotechnol Adv.* 2012;**30**(6):1432-46. doi: 10.1016/j.biotechadv.2012.03.009.
18. Elkins KM. Rapid presumptive "fingerprinting" of body fluids and materials by ATR FT-IR spectroscopy. *J Forensic Sci.* 2011;**56**(6):1580-1587. DOI: 10.1111/j.1556-4029.2011.01870.x.
19. Orphanou CM, Walton-Williams L, Mountain H, Cassella J. The detection and discrimination of human body fluids using ATR FT-IR spectroscopy. *Forensic Sci Int.* 2015;**252**:e10-6. doi: 10.1016/j.forsciint.2015.04.020.
20. Depciuch J, Kaznowska E, Zawlik I, Wojnarowska R, Cholewa M, Heraud P, Cebulski J. Application of Raman Spectroscopy and Infrared Spectroscopy in the Identification of Breast Cancer. *Appl Spectrosc.* 2016;**70**(2):251-63. doi: 10.1177/0003702815620127. Erratum in: *Appl Spectrosc.* 2018;**72**(9):1425-1426. doi: 10.1177/0003702818795394.
21. Das T, Harshey A, Srivastava A. *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.* 2021;**11**:11855. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91009-5>.
22. Movasaghi Z, Rehman S, Ur Rehman DI. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy of Biological Tissues. *Appl Spectrosc Rev.* 2008;**43**(2):134-179. DOI:10.1080/05704920701829043.
23. Kazmer ST, Hartel G, Robinson H, Richards RS, Yan K, van Hal SJ, *et al.* Pathophysiological Response to SARS-CoV-2 Infection Detected by Infrared Spectroscopy Enables Rapid and Robust Saliva Screening for COVID-19. *Biomedicines.* 2022;**10**(2):351. DOI: 10.3390/biomedicines10020351.

24. Bunaciu AA, Hoang VD, Aboul-Enein HY. Applications of FT-IR Spectrophotometry in Cancer Diagnostics. *Crit Rev Anal Chem.* 2015;**45**(2):156-165. DOI: 10.1080/10408347.2014.904733.
  
25. Butler HJ, Brennan PM, Cameron JM, Finlayson D, Hegarty MG, Jenkinson MD, *et al.* Development of high-throughput ATR-FTIR technology for rapid triage of brain cancer. *Nature Communications*, [London]. 2019;**10**(1):4501. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12527-5>
  
26. Ferreira ICC, Aguiar EMG, Silva ATF, Santos LLD, Cardoso-Sousa L, Araújo TG, *et al.* Attenuated Total Reflection-Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR) Spectroscopy Analysis of Saliva for Breast Cancer Diagnosis. *Journal of Oncology.* [s.l.], 2020;**2020**:1-11. DOI: <https://doi.org/10.1155/2020/4343590>
  
27. Rodrigues RP, Aguiar EM, Cardoso-Sousa L, Caixeta DC, Guedes CC, Siqueira WL, *et al.* Differential Molecular Signature of Human Saliva Using ATR-FTIR Spectroscopy for Chronic Kidney Disease Diagnosis. *Braz Dent J.* 2019;**30**(5):437-445. DOI: 10.1590/0103-6440201902228
  
28. Lukose J, Chidangil S, George SD. Optical technologies for the detection of viruses like COVID-19: Progress and prospects. *Biosensors e Bioelectronics.* 2021;**178**:113004. DOI: 10.1016/j.bios.2021.113004.
  
29. Samuel AL. Some Studies in Machine Learning Using the Game of Checkers. *IBM Journal of Research and Development.* 1959;**3**(3):210-229. DOI: 10.1147/rd.33.0210.
  
30. Schleder GR, Fazzio A. Machine Learning na Física, Química, e Ciência de Materiais: Descoberta e Design de Materiais. *Rev Bras Ensino Fís.* 2021;**43**: e20200407. DOI: 10.1590/1806-9126-RBEF-2020-0407.
  
31. Topol EJ. High-performance medicine: the convergence of human and artificial intelligence. *Nat Med.* 2019;**25**(1):44-56. DOI: 10.1038/s41591-018-0300-7.

32. Wang A, Li F, Chiang S, Fulcher J, Yang O, Wong D, Wei F. Machine Learning Prediction of COVID-19 Severity Levels from Salivaomics Data. *ArXiv*. **2022**. Preprint. DOI: arXiv:2207.07274v1.
33. Uddin S, Khan A, Hossain ME, Moni MA. Comparing different supervised machine learning algorithms for disease prediction. *BMC Med Inform Decis Mak*. 2019;**19**(1):281. doi: 10.1186/s12911-019-1004-8.
34. Shapley LS. A value for n-person games. In: Kuhn HW, Tucker AW (ed.). Contributions to the theory of games. *Princeton: Princeton University Press*. 1953;**2**:307-318. DOI: 10.1515/9781400881970-018.
35. Associação Médica Mundial. Declaração de Helsinque: princípios éticos para as pesquisas médicas em seres humanos adotado pela 18ª Assembléia Médica Mundial. Helsinque, *Associação Médica Mundial*. **1964**. Disponível em: [https://www.fcm.unicamp.br/fcm/sites/default/files/declaracao\\_de\\_helsinque.pdf](https://www.fcm.unicamp.br/fcm/sites/default/files/declaracao_de_helsinque.pdf). Acesso em: 17 mar. 2025.
36. Brierley JD, Gospodarowicz MK, Wittekind C (ed.). TNM Classification of Malignant Tumors (UICC). *Oxford: Wiley-Blackwell*. 2017;**8th ed**. Disponível em: <https://www.uicc.org/resources/tnm-classification-malignant-tumours-8th-edition>. Acesso em: 10 out. 2022.
37. Epstein JI, Egevad L, Amin MB, Delahunt B, Srigley JR, Humphrey PA; Grading Committee. The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma: Definition of Grading Patterns and Proposal for a New Grading System. *Am J Surg Pathol*. 2016;**40**(2):244-52. doi: 10.1097/PAS.0000000000000530.
38. Gleason DF. Classification of prostatic carcinomas. *Cancer Chemother Rep*., 1966;**50**:125-128. PMID: 5948714.

39. Savitzky A, Golay MJE. Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures. *Analytical Chemistry*. 1964;**36**(8):1627-1639. DOI: 10.1021/ac60214a047.
  
40. Hastie T, Tibshirani R, Friedman J. The Elements of Statistical Learning: Data Mining, *Inference, and Prediction*. New York: Springer. 2009;**2. ed.**:745.
  
41. Green AA, Berman M, Switzer P, Craig MD. A transformation for ordering multispectral data in terms of image quality with implications for noise removal. *IEEE Transactions on Geoscience and Remote Sensing*. 1988;**26**(1):65-74. DOI: 10.1109/36.3001.
  
42. Senevirathna K, Jayawardana N, Jayasinghe R, Seneviratne B, Perera U. Diagnostic Value of FTIR Spectroscopy, Metabolomic Screening and Molecular Genetics in Saliva for Early Detection of Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC). *Medical & Clinical Research*, 2021;**6**(2):435-454. DOI:10.33140/MCR.06.03.05.
  
43. Mitura P, Paja W, Klebowski B, Płaza P, Kuliniec I, Bar K, Depciuch J. 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*. 2025;**327**:125305. doi: 10.1016/j.saa.2024.125305.
  
44. Satturwar S, Parwani AV. Artificial Intelligence-Enabled Prostate Cancer Diagnosis and Prognosis: Current State and Future Implications. *Adv Anat Pathol*. 2024;**31**(2):136-144. DOI: 10.1097/PAP.0000000000000425.
  
45. Perincheri S, Levi AW, Celli R, Gershkovich P, Rimm D, Morrow JS, *et al*. An independent assessment of an artificial intelligence system for prostate cancer detection shows strong diagnostic accuracy. *Mod Pathol*. 2021;**34**(8):1588-1595. doi: 10.1038/s41379-021-00794-x.
  
46. Chua IS, Gaziel-Yablowitz M, Korach ZT, Kehl KL, Levitan NA, Arriaga YE, *et al*. Artificial intelligence in oncology: Path to implementation. *Cancer Med*.

2021;**10**(12):4138-4149. doi: 10.1002/cam4.3935.

### **Contribuições do autor**

## **6. CONCLUSÃO DA TESE**

A metabolômica exploratória (CLAE-MS) identificou dois marcadores promissores na separação dos grupos vigilância ativa e com indicação de intervenção. Com as duas plataformas (CLAE-MS) e ATR-FTIR aliadas com IA, foi possível criar algoritmos preditivos com bom desempenho na separação dos grupos.

Na separação dos dois grupos os dois metabólitos identificados na metabolômica (CLAE-EM) são fosfolipídeos e a análise por ATR-FTIR sinalizou na mesma direção fortalecendo a robustez dos marcadores. Ambos os marcadores e os algoritmos de predição têm potencial para indicar vigilância ativa com maior segurança após validação em estudos maiores.

## **7. CONFLITOS DE INTERESSE**

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

## **8. PERSPECTIVAS FUTURAS**

Este estudo, considerado prova de conceito, pelo seu potencial deve ser expandido, se possível também por meio de coortes multicêntricas e prospectivas, com amostras significativamente maiores que permitam avaliar de forma robusta a reprodutibilidade dos dados metabolômicos identificados e, validando a integração de dados clínicos, histopatológicos e multiômicos possam aprimorar ainda mais os algoritmos de inteligência artificial criados com as plataformas utilizadas (CLAE-MS) e ATR-FTIR, potencializando a precisão da orientação terapêutica individualizada.

Além disso, a padronização pré-analítica e analítica dos workflows, desde a coleta de soro até o processamento dos espectros e a extração de feições relevantes, será essencial para viabilizar a adoção clínica desses marcadores em laboratórios de rotina. Estudos de custo-efetividade deverão avaliar o impacto das duas plataformas na redução de biópsias desnecessárias e na otimização do manejo do paciente.

Por fim, a validação externa e o desenvolvimento de um protocolo regulatório visando certificação irão consolidar a proposta, abrindo caminho para a incorporação dessas técnicas como ferramentas de apoio à decisão em diretrizes de vigilância ativa do câncer de próstata.

## REFERÊNCIAS

ACR - American College of Radiology. **Prostate Imaging Reporting and Data System version 2.0 [Internet]. Reston (VA): ACR.** 2019. Disponível em: <<http://www.acr.org/Quality-Safety/Resources/PIRADS/>>. Acesso em [25 de Ago. 2022].

ALFORD, A. V. *et al.* The Use of Biomarkers in Prostate Cancer Screening and Treatment. **Rev Urol.**, v. 19, n. 4, p. 221-234, 2017. DOI: 10.3909/riu0772

ÁLVARES-SANCHES, B.; PRIEGO-CAPOTE, F.; LUQUE DE CASTRO, M. D. Metabolomics analysis. Selection of biological samples and practical aspects preceding sample preparation. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 2, p. 111-119, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2009.12.003>.

AMDIS - Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System. **Interpretação de dados GC-MS do NIST.** Disponível em <<http://www.amdis.net/index.html>>. Acesso em: [10 dez 2022].

AMIN, M. B. *et al.* (eds). The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more "personalized" approach to cancer staging. **CA Cancer J Clin.**, v. 67, n. 2, p. 93-99, 2017. DOI: 10.3322/caac.21388.

ANDREW CHAN, K. L.; KAZARIAN, S. G. Attenuated total reflection Fourier-transform infrared (ATR-FTIR) imaging of tissues and live cell. **Chem Soc Rev.**, v. 45, n. 7, p. 1850-64, 2016. DOI: 10.1039/c5cs00515a.

ANKERST, D. P. *et al.* Prostate Cancer Prevention Trial risk calculator 2.0 for the prediction of low- vs high-grade prostate cancer. **Urology**, v. 83, n. 6, p. 1362-7, 2014. DOI: 10.1016/j.urology.2014.02.035.

ANTONARAKIS, E. S. *et al.* The natural history of metastatic progression in men with prostate-specific antigen recurrence after radical prostatectomy: long-term follow-up. **BJU Int.**, v. 109, n. 1, p. 32-9, 2012. DOI: 10.1111/j.1464-410X.2011.10422.x.

ASSOCIAÇÃO MÉDICA MUNDIAL. **Declaração de Helsinque**: princípios éticos para as pesquisas médicas em seres humanos adotado pela 18ª Assembléia Médica Mundial. Helsinque, 1964. Disponível em: [https://www.fcm.unicamp.br/fcm/sites/default/files/declaracao\\_de\\_helsinque.pdf](https://www.fcm.unicamp.br/fcm/sites/default/files/declaracao_de_helsinque.pdf). Acesso em: 17 mar. 2025.

AWWAD, H. M.; GEISEL, J.; OBEID, R. The role of choline in prostate cancer. **Clin Biochem.**, v. 45, n. 18, p. 1548-53, 2012. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2012.08.012.

BAKER, M. J. *et al.* Using Fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials. **Nat Protoc.**, v. 9, n. 8, p. 1771-91, 2014. DOI: 10.1038/nprot.2014.110.

BANGMA, C. H. *et al.* The free-to-total prostate specific antigen ratio improves the specificity of prostata específico antígeno em screening for prostate cancer in general population. **J Urol.**, v. 157, n. 6, p. 2191-6, 1997. PMID: 9146612.

BARBERIS, E. *et al.* Large-Scale Plasma Analysis Revealed New Mechanisms and Molecules Associated with the Host Response to SARS-CoV-2. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 22, 2020. DOI: 10.3390/ijms21228623.

BARRETT, T.; HAIDER, M. A. The emerging role of MRI in prostate cancer active surveillance and ongoing challenges. **AJR Am J Roentgenol.**, v. 208, n. 1, p. 131-9, 2017. DOI: 10.2214/AJR.16.16355.

BARTH, A. Infrared spectroscopy of proteins. **Biochim Biophys Acta**, v. 1767, n. 9, p. 1073-1101, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2007.06.004>.

BECKER, T. *et al.* Role of phosphatidylethanolamine in the biogenesis of

mitochondrial outer membrane proteins. **J Biol Chem.**, v. 288, n. 23, p. 16451-16459, 2013. doi: 10.1074/jbc.M112.442392

BECKONERT, O. *et al.* Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. **Nat Protoc.**, v. 2, n. 11, p. 2692-703, 2007. DOI: 10.1038/nprot.2007.376.

BEEKES, M.; LASCH, P.; NAUMANN, D. Analytical applications of Fourier transform- infrared (FT-IR) spectroscopy in microbiology and prion research. **Vet Microbiology**, v. 123, n. 4, p. 305-319, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.04.010>.

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.**, v. 85, p. 445-451, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10812-018-0670-0>.

BERGER, A. P. *et al.* Complication rate of transrectal ultrasound-guided prostate biopsy: a comparison among 3 protocols with 6, 10 and 15 cores. **J Urol.**, v. 171, n. 4, p. 1478-80, discussion 1480-1, 2004. DOI:10.1097/01.ju.0000116449.01186.f7.

BERNAL-SORIANO, M. C.; *et al.* Factors associated with false negative and false positive results of prostate-specific antigen (PSA) and the impact on patient health. **Medicine** (Baltimore), v. 98, n. 40, p. e17451, 2019. DOI: 10.1097/MD.00000000000017451.

BIRNER, R. *et al.* Roles of phosphatidylethanolamine and of its several biosynthetic pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell.*, v. 12, n. 4, p. 997-1007, 2001. doi: 10.1091/mbc.12.4.997.

BLUME-JENSEN, P. *et al.* Development and clinical validation of an in situ biopsy-based multimarker assay for risk stratification in prostate cancer. **Clin Cancer Res.**, v. 21, n. 11, p. 2591-600, 2015. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-2603.

BOGDANOV, M.; DOWHAN, W. Lipid-assisted protein folding. **J Biol Chem.**, v. 274, n. 52, p. 36827-30, 1999. doi: 10.1074/jbc.274.52.36827.

BOGDANOV, M.; DOWHAN, W. Phosphatidylethanolamine is required for in vivo function of the membrane-associated lactose permease of Escherichia coli. **J Biol Chem.**, v. 270, n. 2, p. 732-9, 1995. doi: 10.1074/jbc.270.2.732.

BOGDANOV, M.; DOWHAN, W. Phospholipid-assisted protein folding: phosphatidylethanolamine is required at a late step of the conformational maturation of the polytopic membrane protein lactose permease. **EMBO J.**, v. 17, n. 18, p. 5255-64, 1998. doi: 10.1093/emboj/17.18.5255.

BOKHORST, L. P. *et al.* A Decade of Active Surveillance in the PRIAS Study: An Update and Evaluation of the Criteria Used to Recommend a Switch to Active Treatment. **Eur Urol.**, v. 70, n. 6, p. 954-960, 2016. DOI: 10.1016/j.eururo.2016.06.007.

BÖTTINGER, L, *et al.* Phosphatidylethanolamine and cardiolipin differentially affect the stability of mitochondrial respiratory chain supercomplexes. **J Mol Biol.**, v. 423, n. 5, p. 677-86, 2012. doi: 10.1016/j.jmb.2012.09.001.

BOYER, M. J. *et al.* Genomic classifiers and prognosis of localized prostate cancer: a systematic review. **Prostate Cancer Prostatic Dis.**, v. 28, n. 1, p. 103-111, 2025. doi: 10.1038/s41391-023-00766-z.

BRAUN, M. *et al.* ERG protein expression and genomic rearrangement status in primary and metastatic prostate cancer--a comparative study of two monoclonal antibodies. **Prostate Cancer Prostatic Dis.** v. 15, p. 165-169, 2012. DOI: 10.1038/pcan.2011.67.

BREMER, J.; GREENBERG, D. M. Methyl transferring enzyme system of microsomes in the biosynthesis of lecithin (phosphatidylcholine). **Biochim. Biophys. Acta**, v. 46, p. 205-216, 1961. [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(61\)90745-4](https://doi.org/10.1016/0006-3002(61)90745-4)

BRIERLEY, J. D. *et al.* TNM classification of malignant tumors. **UICC International Union Against Cancer**. 8th edn. 2017. Disponível em <<https://www.uicc.org/resources/tnm-classification-malignant-tumours-8th-edition>>. Acesso em [10 out 2022].

BRINK-VAN DER LAAN, E.; VAN DEN; KILLIAN, J.; A. KRUIJFF, B. Nonbilayer lipids affect peripheral and integral membrane proteins via changes in the lateral pressure profile. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1666, n. 1-2, p. 275-288, 2004. DOI: 10.1016/j.bbamem.2004.06.010.

BUNACIU, A. A.; HOANG, V. D.; ABOUL-ENEIN, H. Y. Applications of FT-IR Spectrophotometry in Cancer Diagnostics. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 45, n. 2, p. 156-165, Jan. 2015. DOI: 10.1080/10408347.2014.904733.

BUSZEWSKA-FORAJTA, M. *et al.* Lipidomics as a Diagnostic Tool for Prostate Cancer. **Cancers (Basel)**, v. 13, n. 9, p. 2000, 2021. doi: 10.3390/cancers13092000.

BUTLER, H. J. *et al.* Development of high-throughput ATR-FTIR technology for rapid triage of brain cancer. **Nat Commun.**, v. 10, n. 1, p. 4501, 2019. DOI: 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, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/diagnostics13081396>

CAIXETA, D. C. *et al.* Salivary molecular spectroscopy: A sustainable, rapid and non-invasive monitoring tool for diabetes mellitus during insulin treatment. **PLoS One**, v. 15, n. 3, p. e0223461, 2020. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223461>.

CALZADA, E.; ONGUKA, O.; CLAYPOOL, S. M. Phosphatidylethanolamine Metabolism in Health and Disease. **Int Rev Cell Mol Biol.**, v. 321, p. 29-88, 2016.

doi: 10.1016/bs.ircmb.2015.10.001.

CANTLEY, L. C. The phosphoinositide 3-kinase pathway. **Science**, v. 296, n. 5573, p. 1655-1657, 2002. DOI: 10.1126/science.296.5573.1655.

CANUTO, G. A. B. *et al.* Metabolômica: definições, estado da arte e aplicações representativas. **Quim. Nova**, v. 41, n. 1, 75- 91, 2018. doi.org/10.21577/0100-4042.20170134.

CARTER, H. B. *et al.* Expectant management of prostate cancer with curative intent: an update of the Johns Hopkins experience. **J Urol.**, v.178, n. 6, p. 2359-64, 2007. discussion 2364-5. DOI: 10.1016/j.juro.2007.08.039.

CARTER, H. B. *et al.* American Urological Association - AUA. **Early detection of prostate cancer**. Linthicum: AUA; 2018.

CARTER, H. B.; PETERSON, J. D. Prostate-specific antigen velocity and repeated measures of prostate-specific antigen. **Urol Clin North Am.**, v. 24, p. 333-8, 1997. DOI: 10.1016/s0094-0143(05)70380-3.

CASPI, R. *et al.* The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of pathway/genome databases. **Nucleic Acids Res.**, v. 40, Database issue, p. D742-53, 2012. DOI: 10.1093/nar/gkr1014.

CATALONA, W. J. *et al.* A multicenter study of [-2]pro-prostate specific antigen combined with prostate specific antigen and free prostate specific antigen for prostate cancer detection in the 2.0 to 10.0 ng/ml prostate specific antigen range. **J Urol.**, v. 185, n. 5, p. 1650-5, 2011. DOI: 10.1016/j.juro.2010.12.032. Erratum in: **J Urol.**, v. 186, n. 1, p. 354, 2011.

CATALONA, W. J. *et al.* Comparison of Digital Rectal Examination and Serum Prostate Specific Antigen in the Early Detection of Prostate Cancer: Results of a Multicenter Clinical Trial of 6,630 Men. **The Journal of Urology**, v. 197, n. 2S, p.

S200-S207, 2017. DOI: 10.1016/j.juro.2016.10.073.

CATALONA, W. J. *et al.* Comparison of percent free PSA, PSA density, and age-specific PSA cutoffs for prostate cancer detection and staging. **Urology**, v. 56, n. 2, p. 255-60, 2000. DOI: 10.1016/s0090-4295(00)00637-3.

CATALONA, W. J. *et al.* Use of the percentage of free prostate-specific antigen to enhance differentiation of prostate cancer from benign prostatic disease: a prospective multicenter clinical trial. **JAMA**, v. 279, n.19, p. 1542-7, 1998. DOI: 10.1001/jama.279.19.1542.

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..

CLEMENS, G. *et al.* Vibrational spectroscopic methods for cytology and cellular research. **Analyst.**, v. 139, n.18, p. 4411-44, 2014. DOI: 10.1039/c4an00636d.

COOLEY, L. F. *et al.* Factors Associated with Time to Conversion from Active Surveillance to Treatment for Prostate Cancer in a Multi-Institutional Cohort. **J Urol.**, v. 206, n. 5, p.1147-1156, 2021. DOI: 10.1097/JU.0000000000001937.

COOPERBERG, M. R. *et al.* Multiinstitutional validation of the UCSF cancer of the prostate risk assessment for prediction of recurrence after radical prostatectomy. **Cancer**, v. 107, n. 10, p. 2384-91, 2006. DOI: 10.1002/cncr.22262.

COOPERBERG, M. R. *et al.* Tailoring Intensity of Active Surveillance for Low-Risk Prostate Cancer Based on Individualized Prediction of Risk Stability. **JAMA Oncol.**, v. 6, n. 10, p. e203187, 2020. DOI: 10.1001/jamaoncol.2020.3187.

COOPERBERG, M. R. *et al.* The Diverse Genomic Landscape of Clinically Low-risk Prostate Cancer. **Eur Urol.**, v. 74, n. 4, p. 444-452. 2018. DOI: 10.1016/j.eururo.2018.05.014.

COOPERBERG, M. R. *et al.* The University of California, San Francisco Cancer of the Prostate Risk Assessment score: a straightforward and reliable preoperative predictor of disease recurrence after radical prostatectomy. **J Urol.**, v. 173, n. 6, p. 1938-42, 2005. DOI: 10.1097/01.ju.0000158155.33890.e7. Erratum in: **J Urol.**, v. 175, n. 6, p. 2369, 2006.

COOPERBERG, M. R. *et al.* Validation of a cell-cycle progression gene panel to improve risk stratification in a contemporary prostatectomy cohort. **J Clin Oncol.**, v. 31, n. 11, p.1428-34, 2013. DOI: 10.1200/JCO.2012.46.4396.

CULLEN, J. *et al.* A Biopsy-based 17-gene Genomic Prostate Score Predicts Recurrence After Radical Prostatectomy and Adverse Surgical Pathology in a Racially Diverse Population of Men with Clinically Low- and Intermediate-risk Prostate Cancer. **Eur Urol.**, v. 68, n. 1, p. 123-31, 2015. DOI: 10.1016/j.eururo.2014.11.030.

CUZICK, J. *et al.* Prognostic value of a combined estrogen receptor, progesterone receptor, Ki-67, and human epidermal growth factor receptor 2 immunohistochemical score and comparison with the Genomic Health recurrence score in early breast cancer. **J Clin Oncol.**, v. 29, n. 32, p. 4273-8, 2011. DOI: 10.1200/JCO.2010.31.2835.

CUZICK, J. *et al.* Validation of an RNA cell cycle progression score for predicting death from prostate cancer in a conservatively managed needle biopsy cohort. **Br J Cancer**, v. 13, n. 3, p. 382-9, 2015. DOI: 10.1038/bjc.2015.223.

DALL'ERA, M. A. *et al.* Active surveillance for the management of prostate cancer in a contemporary cohort. **Cancer**, v. 112, n. 12, p. 2664-70, 2008. doi: 10.1002/cncr.23502.

D'AMICO, A. V. *et al.* Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer. **JAMA**, v. 280, n. 11, p. 969-74, 1998. DOI:

10.1001/jama.280.11.969.

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.**, v. 11, n. 1, p. 11855, 2021. DOI: 10.1038/s41598-021-91009-5.

DE RAAD, M.; FISCHER, C. R.; NORTHERN, T. R. High-throughput platforms for metabolomics. **Curr Opin Chem Biol.**, v. 30, p. 7-13, 2016. DOI: 10.1016/j.cbpa.2015.10.012.

DEN, R. B. *et al.* Genomic classifier identifies men with adverse pathology after radical prostatectomy who benefit from adjuvant radiation therapy. **J Clin Oncol.**, v. 33, n. 8, p. 944-51, 2015. doi: 10.1200/JCO.2014.59.0026. Erratum in: **J Clin Oncol.**, v. 33, n. 12, p. 1416 2015. DOI: 10.1200/jco.2015.61.9759.

DEPCIUCH, J. *et al.* Application of Raman Spectroscopy and Infrared Spectroscopy in the Identification of Breast Cancer. **Appl Spectrosc.**, v. 70, v. 2, p. 251-63, 2016. doi: 10.1177/0003702815620127. Erratum in: **Appl Spectrosc.**, v. 72, n. 9, p. 1425-1426, 2018. doi: 10.1177/0003702818795394.

DEPCIUCH, J. *et al.* Phospholipid-protein balance in affective disorders: Analysis of human blood serum using Raman and FTIR spectroscopy. A pilot study. **J Pharm Biomed Anal.**, v.131, p. 287-296, 2016. DOI: 10.1016/j.jpba.2016.08.037.

DIAS, D. A. *et al.* Current and Future Perspectives on the Structural Identification of Small Molecules in **Biological Systems. Metabolites**, v. 6, n. 4, p. 46, 2016. DOI: 10.3390/metabo6040046.

DOWHAN, W.; BOGDANOV, M. Lipid-dependent membrane protein topogenesis. **Annu Rev Biochem.**, v. 78, p. 515-40, 2009. doi: 10.1146/annurev.biochem.77.060806.091251.

DUNN, W. B. *et al.* The importance of experimental design and QC samples in

large-scale and MS-driven untargeted metabolomic studies of humans.

**Bioanalysis**, v. 4, n. 18, p. 2249-64, 2012. DOI: 10.4155/bio.12.204.

EASTHAM, J. A.; BOORJIAN, S. A.; KIRKBY, E. Clinically Localized Prostate Cancer: AUA/ASTRO Guideline. **J Urol.**, v. 208, n. 3, p. 505-507, 2022. DOI: 10.1097/JU.0000000000002854.

ECIS - European Cancer Information System. **Incidence and Mortality 2020**. 2022. Disponível em: <[https://ecis.jrc.ec.europa.eu/explorer.php?\\$0-0\\$1-All\\$2-All\\$4-1,2\\$3-0\\$6-0,85\\$5-2020,2020\\$7-7\\$CEstByCountry\\$X0\\_8-3\\$X0\\_19-AE27\\$X0\\_20-No\\$CEstBySexByCountry\\$X1\\_8-3\\$X1\\_19-AE27\\$X1\\_-1-1\\$CEstByIndiByCountry\\$X2\\_8-3\\$X2\\_19-AE27\\$X2\\_20-No\\$CEstRelative\\$X3\\_8-3\\$X3\\_9-AE27\\$X3\\_19-AE27\\$CEstByCountryTable\\$X4\\_19-AE27](https://ecis.jrc.ec.europa.eu/explorer.php?$0-0$1-All$2-All$4-1,2$3-0$6-0,85$5-2020,2020$7-7$CEstByCountry$X0_8-3$X0_19-AE27$X0_20-No$CEstBySexByCountry$X1_8-3$X1_19-AE27$X1_-1-1$CEstByIndiByCountry$X2_8-3$X2_19-AE27$X2_20-No$CEstRelative$X3_8-3$X3_9-AE27$X3_19-AE27$CEstByCountryTable$X4_19-AE27)>. Acessado em [20 out 2022]

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

EIDELMAN, E. *et al.* The Metabolic Phenotype of Prostate Cancer. **Front Oncol.**, v. 7, p. 131, 2017. DOI: 10.3389/fonc.2017.00131.

ELKINS, K. M. Rapid presumptive "fingerprinting" of body fluids and materials by ATR FT-IR spectroscopy. **Journal of Forensic Sciences**, v. 56, n. 6, p. 1580-1587, 2011. DOI: 10.1111/j.1556-4029.2011.01870.x.

ELLIS, D. I.; GOODACRE, R. Metabolic fingerprinting in disease diagnosis: biomedical applications of infrared and Raman spectroscopy. **Analyst**, v. 131, n. 8, p. 875-885, 2006. DOI: 10.1039/b602376m.

EPSTEIN, J. I. *et al.* The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma: definition of grading patterns and proposal for a new grading system. **Am J Surg Pathol.**, v. 40, n. 2, p. 244-52, 2016. DOI: 10.1097/PAS.0000000000000530.

EPSTEIN, J. I. *et al.* ISUP Grading Committee. The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. **Am J Surg Pathol.**, v. 29, n. 9, p. 1228-42, 2005. DOI: 10.1097/01.pas.0000173646.99337.b1.

EPSTEIN, J. I. Diagnosis and reporting of limited adenocarcinoma of the prostate on needle biopsy. **Mod Pathol.**, v. 17, n. 3, p. 307-15, 2004. DOI: 10.1038/modpathol.3800050.

ETZIONI, R. *et al.* Limitations of basing screening policies on screening trials: the US preventive services task force and prostate cancer screening. **Med Care**, v. 51, n. 4, p. 295-300, 2013. <https://doi.org/10.1097/MLR.0b013e31827da979>.

FERREIRA, I. C. C. *et al.* Attenuated Total Reflection-Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR) Spectroscopy Analysis of Saliva for Breast Cancer Diagnosis. **J Oncol.**, p. 4343590, 2020. DOI: 10.1155/2020/4343590.

FLESHNER, N. E.; LAWRENTSCHUT, N. Risk of developing prostate cancer in the future: overview of prognostic biomarkers. **Urology**, v. 73, n. 5 Suppl, p. S21-7, 2009. DOI: 10.1016/j.urology.2009.02.022.

FORBAT, L. *et al.* A cohort study reporting clinical risk factors and individual risk perceptions of prostate cancer: implications for PSA testing. **BJU Int.**, v. 111, n. 3, p. 389-95, 2013. DOI: 10.1111/j.1464-410X.2012.11316.x.

FORCISI, S. *et al.* Liquid chromatography-mass spectrometry in metabolomics research: mass analyzers in ultra high pressure liquid chromatography coupling. **J Chromatogr A.**, v. 31, n. 1292, p. 51-65, 2013. DOI: 10.1016/j.chroma.2013.04.017.

FRANKEL, S. *et al.* Screening for prostate cancer. **Lancet**, v. 361, n. 9363, p. 1122-1128, 2003. DOI: 10.1016/S0140-6736(03)12890-5.

GARCIA, A.; BARBAS, C. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)-based metabolomics. **Methods Mol Biol.**, v. 708, p. 191-204, 2011. DOI: 10.1007/978-1-61737-985-7\_11.

GATES, P. J. *et al.* Mass Spectrometry Ionisation Techniques and Applications for the Analysis of Organic Compounds. In: TAFT, C. A.; SILVA, C. H. T. P. (editors). Current Methods in Medicinal Chemistry and Biological Physics. **Research Signpost**, p. 187 – 206, 2007.

GIBELLINI, F.; SMITH, T. K. The Kennedy pathway--De novo synthesis of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine. **IUBMB Life**, v. 62, n. 6, p. 414-28, 2010. doi: 10.1002/iub.337.

GISKEØDEGÅRD, G. F. *et al.* Spermine and citrate as metabolic biomarkers for assessing prostate cancer aggressiveness. **PLoS One**, v. 8, n. 4, p. e62375, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0062375.

GITTELMAN, M. C. *et al.* PCA3 molecular urine test as a predictor of repeat prostate biopsy outcome in men with previous negative biopsies: a prospective multicenter clinical study. **J Urol.**, v.190, n. 1, p. 64-9, 2013. DOI: 10.1016/j.juro.2013.02.018.

GIUNCHI, F.; FIORENTINO, M.; LODA, M. The Metabolic Landscape of Prostate Cancer. **Eur Urol Oncol.**, v. 2, n.1, p. 28-36, 2019. DOI: 10.1016/j.euo.2018.06.010.

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

GÓMEZ-CEBRIÁN, N. *et al.* Metabolomics Contributions to the Discovery of Prostate Cancer Biomarkers. **Metabolites**, v. 9, n. 3, p. 48, 2019. DOI: 10.3390/metabo9030048.

GOSSELAAR, C. *et al.* The role of the digital rectal examination in subsequent screening visits in the European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer (ERSPC), Rotterdam. **Eur Urol.**, v. 54, n. 3, p. 581-8, 2008. DOI: 10.1016/j.eururo.2008.03.104.

GREEN, A. A. *et al.* A transformation for ordering multispectral data in terms of image quality with implications for noise removal. **IEEE Transactions on Geoscience and Remote Sensing**, v. 26, n. 1, p.65-74, 1988. DOI: 10.1109/36.3001.

GREER, M. D. *et al.* Accuracy and agreement of PIRADSV2 for prostate cancer mpMRI: A multireader study. **J Magn Reson Imaging**, v. 45, n. 2, p. 579-585, 2017. DOI: 10.1002/jmri.25372.

GREER, M. D. *et al.* Validation of the dominant sequence paradigm and role of dynamic ontrastenhanced imaging in PI-RADS Version 2. **Radiology**, v. 285, n. 3, p. 859-69, 2017. DOI: 10.1148/radiol.2017161316.

GROSSMAN, D. C. *et al.* US Preventive Services Task Force: Screening for Prostate Cancer: US Preventive Services Task Force Recommendation Statement. **JAMA**, v. 319, n. 18, p. 1901-1913, 2018. doi: 10.1001/jama.2018.3710. Erratum in: **JAMA**, v. 319, n. 23, p. 2443, 2018. DOI: 10.1001/jama.2018.7453. PMID: 29801017.

HALAMA, A. Metabolomics in cell culture a strategy to study crucial metabolic pathways in cancer development and the response to treatment. **Arch Biochem Biophys**, v. 564, p. 100-9, 2014. DOI: 10.1016/j.abb.2014.09.002.

HAMM, B.; ASBACH, P. Magnetic resonance imaging of the prostate in the PI-RADS Era. In: HODLER, J.; KUBIK-HUCH, R. A.; von SCHULTHESS, G. K. (editors). **Source diseases of the abdomen and pelvis 20182021**: diagnostic imaging - IDKD Book. Cham: Springer; 2018.

HAN, J. *et al.* Towards high-throughput metabolomics using ultrahigh-field Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. **Metabolomics**, v. 4, n. 2, p.128-140, 2008. DOI: 10.1007/s11306-008-0104-8.

HASTIE, T.; TIBSHIRANI, R.; FRIEDMAN, J. The Elements of Statistical Learning: Data Mining, **Inference, and Prediction**. New York: Springer, v.; 745, 2. ed., 2009.

HAUG, K. *et al.* MetaboLights-an open-access general-purpose repository for metabolomics studies and associated meta-data. **Nucleic Acids Res.**, v. 41, Database issue, p. D781-6, 2013. DOI: 10.1093/nar/gks1004.

HAYEK, O. R. *et al.* The necessity of a second prostate biopsy cannot be predicted by PSA or PSA derivatives (density or free: total ratio) in men with prior negative prostate biopsies. **Curr Opin Urol.**, v. 9, p. 371-5, 1999. DOI: 10.1097/00042307-199909000-00001.

HE, J. C. *et al.* Systems biology of kidney diseases. **Kidney Int.**, v. 81, n. 1, p. 22-39, 2012. DOI: 10.1038/ki.2011.314.

HIRAYAMA, A; WAKAYAMA, M.; SOGA, T. Metabolome analysis based on capillary electrophoresis-mass spectrometry. **Trends Anal. Chem.**, v. 61, p. 215-222, 2014. 10.1016/j.trac.2014.05.005.

HORAI, H. *et al.* MassBank: a public repository for sharing mass spectral data for life sciences. **J Mass Spectrom**, v. 45, n. 7, p. 703-14, 2010. DOI: 10.1002/jms.1777.

HUANG, J. *et al.* Prospective serum metabolomic profile of prostate cancer by size and extent of primary tumor. **Oncotarget**, v. 8, n. 28, p. 45190-45199, 2017. DOI: 10.18632/oncotarget.16775.

HUCK, C. W. Recent Developments in Solid-Phase Extraction for Near and Attenuated Total Reflection Infrared Spectroscopic Analysis. **Molecules**, v. 21, n. 5,

p. 633, 2016. DOI: 10.3390/molecules21050633.

ICHIMURA, Y. *et al.* A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. **Nature**, v. 408, n. 6811, p. 488-92, 2000. doi: 10.1038/35044114.

INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa de Câncer no Brasil**. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Divisão de Vigilância e Análise de Situação, 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/numeros/estimativa/sintese-de-resultados-e-comentarios>. Acesso em: 22 nov. 2024

INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2020.

JAMES, N. D. *et al.* The Lancet Commission on prostate cancer: planning for the surge in cases. **Lancet**, v. 403, n. 10437, p. 1683-1722, 2024. Errata em: **Lancet**, London, v. 403, n. 10437, p. 1634, 2024.

KANEHISA, M. *et al.* From genomics to chemical genomics: new developments in KEGG. **Nucleic Acids Res.**, v. 34, Database issue, p. D354-7, 2006. DOI: 10.1093/nar/gkj102.

KARNES, R. J. *et al.* Validation of a genomic classifier that predicts metastasis following radical prostatectomy in an at risk patient population. **J Urol.**, v. 190, n. 6, p. 2047-53, 2013. DOI: 10.1016/j.juro.2013.06.017.

KARP, P. D.; CASPI, R. A survey of metabolic databases emphasizing the MetaCyc family. **Arch Toxicol.**, v. 85, n. 9, p. 1015-33, 2011. DOI: 10.1007/s00204-011-0705-2.

KAZARIAN, S. G.; CHAN, K. L. ATR-FTIR spectroscopic imaging: recent advances and applications to biological systems. **Analyst**, v. 138, n. 7, p. 1940-1951, 2013. DOI: 10.1039/c3an36865c.

KAZMER, S. T. *et al.* Pathophysiological Response to SARS-CoV-2 Infection Detected by Infrared Spectroscopy Enables Rapid and Robust Saliva Screening for COVID-19. **Biomedicines**, v. 10, n. 2, p. 351, 2022. DOI: 10.3390/biomedicines10020351.

KENNEDY, E. P.; WEISS, S. B. The function of cytidine coenzymes in the biosynthesis of phospholipides. **J Biol Chem.**, v. 222, n. 1, p. 193-214, 1956. PMID: 13366993.

KLEIN, A. *et al.* CCR4 is a determinant of melanoma brain metastasis. **Oncotarget**, v. 8, n. 19, p. 31079-31091, 2017. DOI: 10.18632/oncotarget.16076.

KLEIN, E. A. *et al.* A 17-gene assay to predict prostate cancer aggressiveness in the context of Gleason grade heterogeneity, tumor multifocality, and biopsy undersampling. **Eur Urol.**, v. 66, n. 3, p. 550-60, 2014. DOI: 10.1016/j.eururo.2014.05.004.

KLOOS, D. P. *et al.* Evaluation of different column chemistries for fast urinary metabolic profiling. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.**, v. 927, p. 90-6, 2013. DOI: 10.1016/j.jchromb.2013.02.017.

KLOTZ, L. *et al.* Clinical results of long-term follow-up of a large, active surveillance cohort with localized prostate cancer. **J Clin Oncol.**, v. 28, n. 1, p. 126-31, 2010. DOI: 10.1200/JCO.2009.24.2180.

KLOTZ, L. *et al.* Long-term follow-up of a large active surveillance cohort of patients with prostate cancer. **J Clin Oncol.**, v. 33, n. 3, p. 272-7, 2015. DOI: 10.1200/JCO.2014.55.1192.

KNUPLEZ, E.; MARSCHE, G. An updated review of pro- and anti-inflammatory properties of plasma lysophosphatidylcholines in the vascular system. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 21, n. 12, p. 4501, 2020. DOI: 10.3390/ijms21124501.

KUEHNBAUM, N. L. *et al.* Multiplexed separations for biomarker discovery in metabolomics: Elucidating adaptive responses to exercise training.

**Electrophoresis**, v. 36, n. 18, p. 2226-2236, 2015. DOI: 10.1002/elps.201400604.

KUEHNBAUM, N. L.; BRITZ-McKIBBIN, P. New advances in separation science for metabolomics: resolving chemical diversity in a post-genomic era. **Chem Rev.**, v. 113, n. 4, p. 2437-68, 2013. DOI: 10.1021/cr300484s.

KWELDAM, C. F. *et al.* Disease-specific survival of patients with invasive cribriform and intraductal prostate cancer at diagnostic biopsy. **Mod Pathol.**, v. 29, n. 6, p. 630-6, 2016. DOI: 10.1038/modpathol.2016.49.

KWELDAM, C. F.; VAN DER KWAST, T.; VAN LEENDERS, G. J. On cribriform prostate cancer. **Transl Androl Urol.**, v. 7, n. 1, p/ 145-154, 2018. DOI: 10.21037/tau.2017.12.33.

KYRIAKOPOULOS, C. E. *et al.* Chemohormonal Therapy in Metastatic Hormone-Sensitive Prostate Cancer: Long-Term Survival Analysis of the Randomized Phase III E3805 CHAARTED Trial. **J Clin Oncol.**, v. 36, n. 11, p. 1080-1087, 2018. DOI: 10.1200/JCO.2017.75.3657.

LEHMANN, W. D. A timeline of stable isotopes and mass spectrometry in the life sciences. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 36, n. 1, p. 58-85, 2017. DOI: 10.1002/mas.21497.

LEITZMANN, M. F.; ROHRMANN, S. Risk factors for the onset of prostatic cancer: age, location, and behavioral correlates. **Clin Epidemiol.**, v. 4, p. 1-11, 2012. DOI: 10.2147/CLEP.S16747.

LEYTEN, G. H. *et al.* Prospective multicentre evaluation of PCA3 and TMPRSS2-ERG gene fusions as diagnostic and prognostic urinary biomarkers for prostate cancer. **Eur Urol.**, v. 65, n. 3, p. 534-42, 2014. DOI: 10.1016/j.eururo.2012.11.014.

LIESENFELD, D. B. *et al.* Review of mass spectrometry-based metabolomics in cancer research. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.**, v. 22, n. 12, p. 2182-201, 2013. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-13-0584.

LIMA, A. R. *et al.* Biomarker Discovery in Human Prostate Cancer: an Update in Metabolomics Studies. **Transl Oncol.**, v. 9, n. 4, p. 357-70, 2016. DOI: 10.1016/j.tranon.2016.05.004.

LIMA, A. R. *et al.* MS-Based Endometabolome Analysis Differentiates Prostate Cancer from Normal Prostate Cells. **Metabolites**, v. 8, n. 1, p. 23, 2018. DOI: 10.3390/metabo8010023.

LIN, D. W. *et al.* Identification of men with low-risk biopsy-confirmed prostate cancer as candidates for active surveillance. **Urol Oncol.**, v. 36, n. 6, p. 310.e7-310.e13, 2018. DOI: 10.1016/j.urolonc.2018.03.011.

LIN, H. M. *et al.* A distinct plasma lipid signature associated with poor prognosis in castration-resistant prostate cancer. **Int J Cancer**, v. 141, n. 10, p. 2112-2120, 2017. DOI: 10.1002/ijc.30903.

Liu P, *et al.* The mechanisms of lysophosphatidylcholine in the development of diseases. *Life Sci.* 2020;**247**:117443. doi: 10.1016/j.lfs.2020.117443.

LOEB, S. *et al.* Evaluation of the 2015 Gleason grade groups in a nationwide population-based cohort. **Eur Urol.**, v. 69, n. 6, p. 1135-1141, 2016. DOI: 10.1016/j.eururo.2015.11.036.

LOTT, F. M. *et al.* Rastreamento do câncer de próstata 2020. In: Sociedade Brasileira de Urologia; CARVALHAL, G. F.; NOGUEIRA, L. (orgs). PROUROLOGIA Programa de Atualização em Urologia: Ciclo 2. Porto Alegre: **Artmed Panamericana**, p. 9–28, 2020. (Sistema de Educação Continuada a Distância, v. 2).

LUDWIG, C.; GÜNTHER, U. L. MetaboLab - advanced NMR data processing and analysis for metabolomics. **BMC Bioinformatics**, v. 12, n. 366, 2011. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-366>.

LUDWIG, C.; VIANI, M. R. Two-dimensional J-resolved NMR spectroscopy: review of a key methodology in the metabolomics toolbox. **Phytochem Anal**, v. 21, n. 1, p. 22-32, 2010. DOI: 10.1002/pca.1186.

LUKASE, 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.

MADSEN, R.; LUNDSTEDT, T.; TRYGG, J. Chemometrics in metabolomics--a review in human disease diagnosis. **Anal Chim Acta**, v. 659, n. 1-2, p. 23-33, 2010. DOI: 10.1016/j.aca.2009.11.042.

MARKS, L. S. *et al.* The interpretation of serum prostate specific antigen in men receiving 5 $\alpha$ -reductase inhibitors: a review and clinical recommendations. **J Urol.**, v. 176, n. 3, p. 868-74, 2006. DOI: 10.1016/j.juro.2006.04.024.

MAZZONE, E. *et al.* Risk Stratification of Patients Candidate to Radical Prostatectomy Based on Clinical and Multiparametric Magnetic Resonance Imaging Parameters: Development and External Validation of Novel Risk Groups. **Eur Urol.**, v. 81, n. 2, p. 193-203, 2022. doi: 10.1016/j.eururo.2021.07.027.

MCGRATH, S. *et al.* Prostate cancer biomarkers: Are we hitting the mark?. **Prostate Int.**, v. 4, n. 4, p. 130-135, 2016. DOI: 10.1016/j.pnil.2016.07.002.

McNEAL, J. E. The zonal anatomy of the prostate. **Prostate**, v. 2, n. 1, p. 35-49, 1981. DOI: 10.1002/pros.2990020105.

MEMORIAL SLOAN KATTERING CANCER CENTER. Pre-radical prostatectomy nomogram. [S. /], Memorial Sloan Kattering Cancer Center. **2025**. Disponível em: [https://www.mskcc.org/nomograms/prostate/pre\\_op](https://www.mskcc.org/nomograms/prostate/pre_op). Acesso em: 22 mar. 2025.

Menon AK, Stevens VL. Phosphatidylethanolamine is the donor of the ethanolamine residue linking a glycosylphosphatidylinositol anchor to protein. *J. Biol. Chem.*, 1992;**267**(22):15277-15280. DOI: 10.1016/S0021-9258(19)49529-X.

MIRNEZAMI, R. *et al.* Chemical mapping of the colorectal cancer microenvironment via MALDI imaging mass spectrometry (MALDI-MSI) reveals novel cancer-associated field effects. **Mol Oncol.**, v. 8, n. 1, p. 39-49, 2014. DOI: 10.1016/j.molonc.2013.08.010.

MISRA, B. B.; VAN DER HOOFT, J. J. Updates in metabolomics tools and resources: 2014-2015. **Electrophoresis**, v. 37, n. 1, p. 86-110, 2016. DOI: 10.1002/elps.201500417.

MITCHELL, M. **Machine Learning**. 1 ed: McGraw-Hill, Inc; 1997.

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.**, v. 327, p. 125305, 2025. doi: 10.1016/j.saa.2024.125305..

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.

MOVASAGHI, Z.; REHMAN, S.; UR REHMAN, D. I. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy of Biological Tissues. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 43, n. 2, p. 134-179, 2008. <https://doi.org/10.1080/05704920701829043>.

MUSSI, T. C. A ressonância magnética multiparamétrica de próstata nos dias atuais. **einstein (São Paulo)**, v.16, n. 2, p. 1-3, 2018. DOI: 10.1590/S1679-45082018MD4408.

NCCN - Clinical Practice Guidelines in Oncology. NCCN Guidelines®. **Prostate Cancer**. Disponível em:

<[https://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/prostate.pdf](https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/prostate.pdf)>. Acesso em: [11 Set 2024].

NCCN - National Comprehensive Cancer Network. Prostate cancer. NCCN clinical practice guidelines in oncology. **J Natl Compr Canc Netw**. 2004 May;2(3):224-48. doi: 10.6004/jnccn.2004.0021.

NEWCOMB, L. F. *et al*. Outcomes of Active Surveillance for Clinically Localized Prostate Cancer in the Prospective, Multi-Institutional Canary PASS Cohort. **J Urol.**, v. 195, n. 2, p. 313-20, 2016. DOI: 10.1016/j.juro.2015.08.087.

NIH/SEER. National Cancer Institute. Surveillance Epidemiology and results Program. **Cancer Statistics Explorer Network**. 2022 Disponível em:

<[seer.cancer.gov/statistics-network/explorer/application.html?site=66&data\\_type=1&graph\\_type=2&compareBy=rate&chk\\_race\\_1=1&rate\\_type=2&hdn\\_sex=2&age\\_range=1&stage=101&advopt\\_precision=1&advopt\\_show\\_ci=on&hdn\\_view=0&advopt\\_display=2#graphArea](https://seer.cancer.gov/statistics-network/explorer/application.html?site=66&data_type=1&graph_type=2&compareBy=rate&chk_race_1=1&rate_type=2&hdn_sex=2&age_range=1&stage=101&advopt_precision=1&advopt_show_ci=on&hdn_view=0&advopt_display=2#graphArea)>. Acessado em [20 Out. 2022].

NIH/SEER. National Cancer Institute. Surveillance Epidemiology and results Program Cancer Today. Age-Standardized Rate (World) per 100 000, Incidence and Mortality, Males, in 20222022.

NITUSCA, D. *et al*. Potential Diagnostic Biomarker Detection for Prostate Cancer Using Untargeted and Targeted Metabolomic Profiling. **Curr Issues Mol Biol.**, v. 45, n. 6, p. 5036-5051, 2023. doi: 10.3390/cimb45060320.

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

OBERLIN, D. T; *et al.* Diagnostic value of guided biopsies: fusion and cognitive-registration magnetic resonance imaging versus conventional ultrasound biopsy of the prostate. **Urology**. v. 92, p. 75-9. 2016. DOI: 10.1016/j.urology.2016.02.041.

ORPHANOU, C. M. *et al.* The detection and discrimination of human body fluids using ATR FT-IR spectroscopy. **Forensic Sci Int.**, v. 252, p. e10-6, 2015. DOI: 10.1016/j.forsciint.2015.04.020. Erratum in: **Forensic Sci Int.**, v. 261, p. 82, 2016.

ORSTED, D. D.; BOJESSEN, S. E. The link between benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. **Nat Rev Urol.**, v. 10, n. 1, p. 49-54, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrurol.2012.192>

PAREKH, D. J. *et al.* A multi-institutional prospective trial in the USA confirms that the 4Kscore accurately identifies men with high-grade prostate cancer. **Eur Urol.**, v. 68, n. 3, p. 464-70, 2015. DOI: 10.1016/j.eururo.2014.10.021.

PARTIN, A. W. *et al.* Clinical validation of an epigenetic assay to predict negative histopathological results in repeat prostate biopsies. **J Urol.**, v. 192, n. 4, p.1081-7, 2014. DOI: 10.1016/j.juro.2014.04.013.

PERINCHERI, S. *et al.* An independent assessment of an artificial intelligence system for prostate cancer detection shows strong diagnostic accuracy. **Mod Pathol.**, v. 34, n. 8, p. 1588-1595, 2021. doi: 10.1038/s41379-021-00794-x..

PERNER, S. *et al.* TMPRSS2-ERG fusion prostate cancer: an early molecular event associated with invasion. **Am J Surg Pathol.**, v. 31, n. 6, p. 882-8, 2007. DOI: 10.1097/01.pas.0000213424.38503.aa.

PUTZIG, C. L. *et al.* Infrared Spectroscopy. **Analytical Chemistry**, v. 66, n. 12, p. 26-66, 1994. DOI: 10.1021/ac00084a003.

RAALJMAKERS, R. *et al.* Complications rates and risk factors of 5802 transrectal ultrasound ghided sextant biopsies of the prostate within a population-based

screening program. **Urology**, v. 60, p. 826-30, 2002. DOI: 10.1016/s0090-4295(02)01958-1

RAMAUTAR, R. *et al.* Enhancing the coverage of the urinary metabolome by sheathless capillary electrophoresis-mass spectrometry. **Anal Chem.**, v. 84, n. 2, p. 885-92, 2012. DOI: 10.1021/ac202407v.

RAMAUTAR, R. *et al.* Human metabolomics: strategies to understand biology. **Curr Opin Chem Biol.**, v. 17, n. 5, p. 841-6, 2013. DOI: 10.1016/j.cbpa.2013.06.015.

RAMAUTAR, R.; SOMSEN, G. W.; JONG, G. J. CE-MS for metabolomics: developments and applications in the period 2012-2014. **Electrophoresis**, v. 36, n. 1, p. 212-24, 2015. DOI: 10.1002/elps.201400388.

REIS, L. O. *et al.* Biomarcadores no câncer de próstata. In: Sociedade Brasileira de Urologia; CARVALHAL, G. F.; NOGUEIRA, L. (Orgs). **PROUROLOGIA Programa de Atualização em Urologia: Ciclo 2**. Porto Alegre: Artmed Panamericana, p. 7;1–95, 2020. (Sistema de Educação Continuada a Distância, v. 1).

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.

ROSS, A. E.; RODRIGUEZ, R. Development, molecular biology, and physiology of the prostata. In: McDOUGAL, W. S.; WEIN, A. J.; KAVOUSSI, L. R.; PARTIN, A. W.; PETERS, C. A. (editors). **Campbell-Walsh urology**. 11th ed. Philadelphia: Elsevier, p. 2393-424, 2016.

SADEGHI, R. N.; KARAMI-TEHRANI, F.; SALAMI, S. Targeting prostate cancer cell metabolism: impact of hexokinase and CPT-1 enzymes. **Tumour Biol.**, v. 36, n. 4, p. 2893-905, 2015. DOI: 10.1007/s13277-014-2919-4.

SALAMI, S. S. *et al.* Combining urinary detection of TMPRSS2:ERG and PCA3 with

serum PSA to predict diagnosis of prostate cancer. **Urol Oncol.**, v. 31, n. 5, p. 566-71, 2013. DOI: 10.1016/j.urolonc.2011.04.001.

SALAMI, S. S. *et al.* Transcriptomic heterogeneity in multifocal prostate cancer. **JCI Insight**, v. 3, n. 21, p. e123468, 2018. DOI: 10.1172/jci.insight.123468.

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.

SATTURWAR, S.; PARWANI, A. V. Artificial Intelligence-Enabled Prostate Cancer Diagnosis and Prognosis: Current State and Future Implications. **Adv Anat Pathol.**, v. 31, n. 2, p. 136-144, 2024. DOI: 10.1097/PAP.0000000000000425.

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

SBPC/ML - SBU - Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial - Sociedade Brasileira de Urologia. **Posicionamento da SBPC/ML e SBU sobre rastreamento de câncer de próstata**. 2018. Disponível em: <<http://www.sbpc.org.br/noticias-e-comunicacao/posicionamento-da-sbpcml-e-sbu-sobre-rastreamento-de-cancer-de-prostata/>>. Acessado em [22 de Ago 2022].

SBU-Sociedade Brasileira de Urologia. **Aconselhamento para o Diagnóstico Precoce do Câncer de Próstata**. Disponível em: <<https://portaldaurologia.org.br/medicos/noticias/aconselhamento-para-o-diagnostico-precoce-do-cancer-de-prostata/>>. Acessado em: [19 Set 2022]. ISBN 978-85-7318-261-0.

SCHAEFFER, E. M. *et al.* NCCN Guidelines® Insights: Prostate Cancer, Version 1.2023. **J Natl Compr Canc Netw.**, v. 20, n. 12, p. 1288-1298, 2022. DOI: 10.6004/jnccn.2022.0063.

SCHIPPER, M. *et al.* Novel prostate cancer biomarkers derived from autoantibody signatures. **Transl Oncol.**, v. 8, n. 2, p. 106-11, 2015. DOI: 10.1016/j.tranon.2015.02.003.

SCHLEDER, G. R.; FAZZIO, A. Machine Learning na Física, Química, e Ciência de Materiais: Descoberta e Design de Materiais. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 43, Supl 1, 2021. DOI: 10.1590/1806-9126-RBEF-2020-0407.

SCHNEIDER, B. B. *et al.* Differential mobility spectrometry/mass spectrometry history, theory, design optimization, simulations, and applications. **Mass Spectrom Rev.**, v. 35, n. 6, p. 687-737, 2016. DOI: 10.1002/mas.21453.

SCHOENFIELD, L. *et al.* The incidence of high-grade prostatic intraepithelial neoplasia and atypical glands suspicious for carcinoma on first-time saturation needle biopsy, and the subsequent risk of cancer. **BJU Int.**, v. 99, n. 4, p. 770-4, 2007. DOI: 10.1111/j.1464-410X.2006.06728.x.

SCHRODER, F. H. *et al.* Screening and prostate cancer mortality: results of the European Randomised Study of Screening for Prostate Cancer (ERSPC) at 13 years of follow-up. **Lancet**, v. 384, n. 9959, p. 2027-35, 2014. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60525-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60525-0).

SCHRÖDER, F. H. *et al.* Screening and prostate-cancer mortality in a randomized European study. **N Engl J Med.**, v. 360, n. 13, p. 1320-1328, 2009. DOI: 10.1056/NEJMoa0810084.

SCHRODER, F. H.; WILDHAGEN, M. F. Screening for prostate cancer, evidence and perspectives. **BIU Int.**, v. 88, p. 811-7, 2008. DOI: 10.1046/j.1464-4096.2001.02449.x.

SEAMAN, E. *et al.* PSA density (PSAD). Role in patient evaluation and management. **Urol Clin North Am.**, v. 20, n. 4, p. 653-63, 1993. PMID: 7505973.

SENEVIRATHNA, K. *et al.* Diagnostic Value of FTIR Spectroscopy, Metabolomic Screening and Molecular Genetics in Saliva for Early Detection of Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC). **Medical & Clinical Research**, v. 6, n. 2, p. 435-454, 2021. DOI:10.33140/MCR.06.03.05.

SHAPLEY, L. S. A value for n-person games. In: Kuhn HW, Tucker AW (ed.). Contributions to the theory of games. **Princeton: Princeton University Press**, v. 2, p. 307-318, 1953. DOI: 10.1515/9781400881970-018.

SHIPITSIN, M. *et al.* Identification of proteomic biomarkers predicting prostate cancer aggressiveness and lethality despite biopsy-sampling error. **Br J Cancer**, v. 111, n. 6, p. 1201-12, 2014. DOI: 10.1038/bjc.2014.396.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Spectrometric identification of Organic Compounds**. 7. ed., John Wiley & Sons Ed., Danvers, 13 p., 2005.

SINGH, H. *et al.* Improved detection of clinically significant, curable prostate cancer with systematic 12-core biopsy. **J Urol.**, v. 171, p. 1089-92, 2004. DOI: 10.1097/01.ju.0000112763.74119.d4.

SLATKOFF, S. *et al.* vPURLs: PSA testing: when it's useful, when it's not. **J Fam Pract.**, v. 60, n. 6, p. 357-60, 2011. PMID: 21647471; PMCID: PMC3183963.

SONN, G. A. *et al.* Prostate Magnetic Resonance Imaging Interpretation Varies Substantially Across Radiologists. **Eur Urol Focus**, v. 5, n. 4, p. 592-599, 2019. DOI: 10.1016/j.euf.2017.11.010.

SPRATT, D. E. *et al.* Development and Validation of a Novel Integrated Clinical-Genomic Risk Group Classification for Localized Prostate Cancer. **J Clin Oncol.**, v. 36, n. 6, p. 581-590, 2018. doi: 10.1200/JCO.2017.74.2940.

SREEKUMAR, A. *et al.* Metabolomic profiles delineate potential role for sarcosine in prostate cancer progression. **Nature**, v. 457, n. 7231, p. 910-4, 2009. DOI: 10.1038/nature07762. Erratum in: **Nature**, v. 499, n. 7459, p. 504, 2013.

STEENBERGEN, R. *et al.* Disruption of the phosphatidylserine decarboxylase gene in mice causes embryonic lethality and mitochondrial defects. **J Biol Chem.**, v. 280, n. 48, p. 40032-40, 2005. doi: 10.1074/jbc.M506510200.

STEPHENSON, A. J. *et al.* Defining biochemical recurrence of prostate cancer after radical prostatectomy: a proposal for a standardized definition. **J Clin Oncol.**, v. 24, n. 24, p. 3973-8, 2006. DOI: 10.1200/JCO.2005.04.0756.

STEWART, G. D. *et al.* Clinical utility of an epigenetic assay to detect occult prostate cancer in histopathologically negative biopsies: results of the MATLOC study. **J Urol.**, v. 189, n. 3, p. 1110-6, 2013. DOI: 10.1016/j.juro.2012.08.219.

STOREY, M. K. *et al.* Phosphatidylethanolamine has an essential role in *Saccharomyces cerevisiae* that is independent of its ability to form hexagonal phase structures. **J Biol Chem.**, v. 276, n. 51, p. 48539-48, 2001. doi: 10.1074/jbc.M109043200.

STUART, B. H. Biological Applications. In: (Ed.). **Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications**: John Wiley & Sons, p.137-165, 2004. ISBN 9780470011140.

SUGIMOTO, M. *et al.* Bioinformatics Tools for Mass Spectroscopy-Based Metabolomic Data Processing and Analysis. **Curr Bioinform.**, v. 7, n. 1, p. 96-108, 2012. DOI: 10.2174/157489312799304431.

TASSEVA, G. *et al.* Phosphatidylethanolamine deficiency in Mammalian mitochondria impairs oxidative phosphorylation and alters mitochondrial morphology. **J Biol Chem.**, v. 288, n. 6, p. 4158-73, 2013. doi: 10.1074/jbc.M112.434183.

TAUTENHAHN, R. *et al.* An accelerated workflow for untargeted metabolomics using the METLIN database. **Nat Biotechnol.**, v. 30, n. 9, p. 826-8, 2012. DOI: 10.1038/nbt.2348.

THE HUMAN METABOLOME DATABASE. **Searching metabolites for phosphatidyletanolamine**. Canadian Institutes of Health Research, Canada Foundation for Innovation, and by The Metabolomics Innovation Centre. Canada, **2022**. Disponível em: <https://hmdb.ca/unearth/q?utf8=%E2%9C%93&query=phosphatidyletanolamine&searcher=metabolites&button=>. Acesso em: 6 dez. 2024.

THEODORIDIS, G. A. *et al.* Liquid chromatography-mass spectrometry based global metabolite profiling: A review. **Anal Chim Acta**, v. 711, p. 7-16, 2012. DOI: 10.1016/j.aca.2011.09.042.

THISSEN, U. *et al.* Comparing support vector machines to PLS for spectral regression applications. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 73, n. 2, p. 169–179, 2004. DOI: 10.1016/j.chemolab.2004.01.002.

TOMLINS, S. A. *et al.* Urine TMPRSS2:ERG Plus PCA3 for Individualized Prostate Cancer Risk Assessment. **Eur Urol.**, v. 70, n. 1, p. 45-53, 2016. DOI: 10.1016/j.eururo.2015.04.039.

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>.

TORTORELLA, E. *et al.* AR and PI3K/AKT in Prostate Cancer: A Tale of Two Interconnected Pathways. **Int J Mol Sci.**, v. 24, n. 3, p. 2046, 2023. doi: 10.3390/ijms24032046.

TOSOIAN, J. J. *et al.* Active surveillance program for prostate cancer: an update of the Johns Hopkins experience. **J Clin Oncol.**, v. 29, n. 16, p. 2185-90, 2011. DOI:

10.1200/JCO.2010.32.8112.

TOSOIAN, J. J. *et al.* Intermediate and Longer-Term Outcomes From a Prospective Active-Surveillance Program for Favorable-Risk Prostate Cancer. **J Clin Oncol.**, v. 33, n. 30, p. 3379-85, 2015. DOI: 10.1200/JCO.2015.62.5764.7.

TRICOLI, J. V.; SCHOENFELDT, M.; CONLEY, B. A. Detection of prostate cancer and predicting progression: current and future diagnostic markers. **Clin Cancer Res.**, v. 10, n. 12 Pt 1, p. 3943-3953, 2004. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-03-0200.

TROCK, B. J. Application of metabolomics to prostate cancer. **Urol Oncol.**, v. 29, n. 5, p. 572-81, 2011. DOI: 10.1016/j.urolonc.2011.08.002.

TWUM-AMPOFO, J. *et al.* Metabolic targets for potential prostate cancer therapeutics. **Curr Opin Oncol.**, v. 28, n. 3, p. 241-7, 2016. DOI: 10.1097/CCO.0000000000000276.

UDDIN, S. *et al.* Comparing different supervised machine learning algorithms for disease prediction. **BMC Medical Informatics and Decision Making**, v. 19, n. 1, p. 281, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12911-019-1004-8>.

VAN LEENDERS, G. J. L. H. *et al.* The 2019 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Grading of Prostatic Carcinoma **Am J Surg Pathol.**, v. 44, n. 8, p. e87-e99, 2020. DOI: 10.1097/PAS.0000000000001497.

VAN NESTE, L. *et al.* Detection of high-grade prostate cancer using a urinary molecular biomarker-based risk score. **Eur Urol.**, v. 70, n. 5, p. 740-8, 2016. DOI: 10.1016/j.eururo.2016.04.012.

VAN NESTE, L. *et al.* Risk score predicts high-grade prostate cancer in DNA-methylation positive, histopathologically negative biopsies. **Prostate**, v. 76, n. 12, p. 1078-87, 2016. DOI: 10.1002/pros.23191.

VANCE, J. E. Phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in mammalian cells: two metabolically related aminophospholipids. **J Lipid Res.**, v. 49, n. 7, p. 1377-87, 2008. doi: 10.1194/jlr.R700020-JLR200.

VANCE, J. E. Phospholipid synthesis and transport in mammalian cells. **Traffic**, v. v. 16, n. 1, p. 1-18, 2015. doi: 10.1111/tra.12230.

VERKLEIJ, A. J. *et al.* Non-bilayer structures in membrane fusion. **Ciba Found Symp.**, v. 103, p. 45-59, 1984. doi: 10.1002/9780470720844.ch4.

VERNOOIJ, R. W. M. *et al.* Corrigendum to "Urinary incontinence and erectile dysfunction in patients with localized or locally advanced prostate cancer: a nationwide observational study". **Urol Oncol.**, v. 40, n. 7, p. 353, 2022. DOI: 10.1016/j.urolonc.2022.05.007.

VICKERS, A. *et al.* Reducing unnecessary biopsy during prostate cancer screening using a four-kallikrein panel: an independent replication. **J Clin Oncol.**, v. 28, n. 15, p. 2493-8, 2010. DOI: 10.1200/JCO.2009.24.1968.

VICKERS, A. J. *et al.* A four-kallikrein panel predicts prostate cancer in men with recent screening: data from the European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer, Rotterdam. **Clin Cancer Res.**, v. 16, n. 12, p. 3232-9, 2010. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-10-0122.

VICKERS, A. J. *et al.* A panel of kallikrein markers can reduce unnecessary biopsy for prostate cancer: data from the European Randomized Study of Prostate Cancer Screening in Göteborg, Sweden. **BMC Med.**, v. 8, n. 6, p. 19, 2008. DOI: 10.1186/1741-7015-6-19.

VICKERS, A. J. *et al.* Impact of recent screening on predicting the outcome of prostate cancer biopsy in men with elevated prostate-specific antigen: data from the European Randomized Study of Prostate Cancer Screening in Gothenburg, Sweden. **Cancer**, v. 116, n.11, p. 2612-20, 2010. DOI: 10.1002/cncr.25010.

VILLAS-BÔAS, S. G.; BRUHEIM, P. The potential of metabolomics tools in bioremediation studies. **OMICS**, v. 11, n. 3, p. 305-13, 2007. DOI: 10.1089/omi.2007.0005.

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

WELTY, C. J. *et al.* Extended followup and risk factors for disease reclassification in a large active surveillance cohort for localized prostate cancer. **J Urol.**, v. 193, v. 3, p. 807-11, 2015. DOI: 10.1016/j.juro.2014.09.094.

WHO - World Health Organization. **International Agency for Research on Cancer**. Prostate. *In*: Cancer Today. Lyon, 2022. Disponível em: [https://gco.iarc.fr/today/en/dataviz/pie?mode=population&group\\_populations=0&cancers=27](https://gco.iarc.fr/today/en/dataviz/pie?mode=population&group_populations=0&cancers=27). Acesso em: 17 mar. 2025.

WISHART, D. S. *et al.* Querengesser L. HMDB: the Human Metabolome Database. **Nucleic Acids Res.**, v. 35, Database issue, p. D521-6, 2007. DOI: 10.1093/nar/gkl923.

WYMENGA, L. F. *et al.* Ultrasound-guided seminal vesicle biopsies in prostate cancer. **Prostate Cancer Prostatic Dis.**, v. 3, n. 2, p. 100-106, 2000. DOI: 10.1038/sj.pcan.4500407.

XIAYAN, L.; LEGIDO-QUIGLEY, C. Advances in separation science applied to metabonomics. **Electrophoresis**, v. 29, n. 18, p. 3724-36, 2008. DOI: 10.1002/elps.200700851.

YAMAMOTO, T. *et al.* Metastatic Prostate Cancer in Men Initially Treated with Active Surveillance. **J Urol.**, v. 195, n. 5, p. 1409-1414, 2016. DOI: 10.1016/j.juro.2015.11.075.

YOSHIMOTO, M. *et al.* FISH analysis of 107 prostate cancers shows that PTEN genomic deletion is associated with poor clinical outcome. **Br J Cancer**, v. 97, n. 5, p. 678-85, 2007. DOI: 10.1038/sj.bjc.6603924.

ZABALA-LETONA, A. *et al.* mTORC1-dependent AMD1 regulation sustains polyamine metabolism in prostate cancer. **Nature**, v. 547, n. 7661, p. 109-113, 2017. doi: 10.1038/nature22964. Erratum in: **Nature**, v. 554, n. 7693, p. 554, 2018. DOI: 10.1038/nature25470.

## APÊNDICE A.

### 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 ingeri 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 ainda 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.**

Uberlândia,            de                            de 20

---

Assinatura dos pesquisadores

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

---

Participante da pesquisa

## Apêndice B = 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

Pesquisa: Metabolômica no Câncer de Próstata <sup>2023</sup>

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. <sup>&gt;18 &lt;35 a</sup> ( )**	Fem. <sup>&gt;18 a</sup> ( )**

Nome do Participante:			
Data:		Pesquisador:	
N. Registro:		Instituição:	
Data Nasc.:		Iniciais do nome:	
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 <sup>2014</sup> G
Lobo D				+ =	
Lobo E				+ =	
Lesão RM				+ =	
BIÓPSIA				+ =	

IMUNOHISTOQUÍMICA DA BIÓPSIA: Gleason: + = ISUP <sup>2014</sup> 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 <sup>EDTA</sup>

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 computadorizada

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 - Prostatovesicectomy 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 1 – Parecer Aprovação Plataforma Brasil



UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
UBERLÂNDIA/MG



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DA EMENDA

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

**Pesquisador:** VIVIAN ALONSO GOULART

**Área Temática:**

**Versão:** 4

**CAAE:** 71108817.2.0000.5152

**Instituição Proponente:** Instituto de Genética e Bioquímica

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.533.461

#### Apresentação 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 teranósticas 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

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica  
Bairro: Santa Mônica CEP: 38.408-144

UF: MG Município: UBERLÂNDIA

Continuação do Parecer: 3.533.461

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 destas 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 a possibilidade de formação de um pequeno hematoma no local de punção venosa e devido a 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: 3.533.461

**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 espectrometria 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.

Continuação do Parecer: 3.533.461

pelo Pesquisador	Recurso.docx	14:51:53	GOULART	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_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	projeto detalhado emendado.docx	27/02/2019 16:07:57	VIVIAN ALONSO GOULART	Aceito
Cronograma	Cronograma emendado.docx	27/02/2019 16:07:20	VIVIAN ALONSO GOULART	Aceito
Outros	respostas pendencias 110917.pdf	11/09/2017 14:29:36	VIVIAN ALONSO GOULART	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	stephania.pdf	23/08/2017 15:43:22	VIVIAN ALONSO GOULART	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	coparticipante HCU.pdf	12/08/2017 13:25:20	VIVIAN ALONSO GOULART	Aceito
Outros	INSTRUMENTO COLETA.pdf	05/05/2017 10:46:36	VIVIAN ALONSO GOULART	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

UBERLÂNDIA, 28 de Agosto de 2019

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