Juliana Vieira Alberice

***Avaliação Analítica de Potenciais
Biomarcadores para Câncer de Bexiga em
Urina***

Tese apresentada ao Instituto de Química de
São Carlos da Universidade de São Paulo
como parte dos requisitos para a obtenção do
título de doutor em ciências.

Área de concentração: Química Analítica e
Inorgânica

Orientador: Prof. Dr. Emanuel Carrilho

São Carlos

2014

Exemplar revisado

O exemplar original encontra-se em acervo
reservado na Biblioteca do IQSC-USP

Dedicatória

Dedico esse trabalho aos meus pais com todo meu amor e gratidão.

Agradecimentos

A Deus pela dádiva da vida e força para vencer os obstáculos e alcançar meus objetivos.

Aos meus pais Claudir e Aparecida pela oportunidade de estudar, por todo apoio e amor incondicional. Ao meu irmão Wellington pelo carinho e paciência.

Ao meu namorado Camilo pelo companheirismo, amor, paciência e por me ajudar a ser uma pessoa melhor.

Aos meus familiares que contribuíram e contribuem para o meu crescimento agradeço pelo apoio, carinho e torcida.

Às minhas queridas amigas de infância Aline, Carol, Rachel, Giovana e Vanessa com as quais sei que posso contar independente da distância. Em especial agradeço à Rachel por me escutar e me entender, ainda que nenhuma palavra seja dita.

Agradeço imensamente ao Prof. Dr. Emanuel, por todos esses anos de orientação e amizade, pela oportunidade e confiança no desenvolvimento do trabalho. Sou muito grata e honrada de poder ter crescido profissionalmente dentro do BioMicS.

Aos queridos BiôMicoS que tornaram o trabalho mais divertido e prazeroso, mas em especial à Ju B., Karina, Jenifer, Fay, Sheila, Regiane, Rubi, Julia, Maribel, Lu e Thiago pela amizade e momentos de descontração, os quais espero poder continuar a compartilhar.

À Prof. Dr. Coral Barbas por me receber e orientar no estágio desenvolvido na Universidad San Pablo em Madrid.

Aos colegas do grupo CEMBIO que me receberam muito bem e ajudaram no desenvolvimento do trabalho e aprendizagem cultural e da

língua. Em especial agradeço à Prof. Dr. Antónia García, Dr. Emily Hooper e Cláudia Balderas que acompanharam diretamente meu trabalho.

Ao CNIO e Hospital AC Camargo pela concessão das amostras.

Aos meus queridos amigos Cláudia, Marcel, Kenia, Dani, Brenda, Thiago Mendes e Thiago Gomes que me acolheram em Madri e foram minha família durante todo o ano 2012 e com os quais tenho a imensa alegria de ainda compartilhar muitos momentos agradáveis.

Aos professores e funcionários do IQSC que de alguma forma contribuíram para a minha formação desde a graduação.

Ao CNPq (processo 143318/2009-8) pela bolsa concedida.

À EADS-CASA e Força Aérea Brasileira pela parceria a qual rendeu a concessão de bolsas de estudos usufruída para realizar o estágio em Madri.

À FAPESP e ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Bioanalítica pelo apoio financeiro ao longo do desenvolvimento do projeto.

“É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar; é melhor tentar, ainda que em vão, que sentar-se fazendo nada até o final. Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias tristes em casa me esconder. Prefiro ser feliz, embora louco, que em conformidade viver...”

Martín Luther King

Resumo

O câncer de bexiga é uma neoplasia urogenital que acomete homens e mulheres, sendo que somente no Brasil 8.600 novos casos ao ano são diagnosticados. Cistoscopia transuretral é a conduta padrão no diagnóstico e acompanhamento do câncer de bexiga. Entretanto, tal procedimento é extremamente invasivo e doloroso além de ter elevado custo e não garantir todos os resultados. Assim, busca-se por marcadores moleculares que possam auxiliar no diagnóstico e progressão do câncer de bexiga, bem como diminuir a necessidade de exames invasivos no acompanhamento de pacientes tratados. Nesse sentido, a urina tem papel de destaque como fonte de biomarcadores devido principalmente ao seu caráter não invasivo.

Nesse trabalho foram utilizadas duas abordagens ‘ômicas’: proteômica e metabolômica, para a busca de biomarcadores em urina para o diagnóstico e prognóstico do câncer de bexiga, respectivamente. Com a abordagem proteômica buscou-se apenas por biomarcadores para o diagnóstico da doença e, utilizando as técnicas de eletroforese 2-DE, OFFGEL e MS, juntamente com análise estatística multivariada, foi possível identificar 32 proteínas que apresentam-se como potenciais marcadores para o câncer de bexiga. A abordagem metabolômica foi empregada para a busca de biomarcadores para reincidência e progressão da doença. As técnicas analíticas utilizadas nessa abordagem, LC-MS e CE-MS, mostraram-se complementares e, dos resultados obtidos com ambas e avaliados com análise estatística multivariada foi possível indicar 19 metabólitos para reincidência e 23 metabólitos para progressão do câncer de bexiga.

Assim, neste trabalho explorou-se como as ciências ‘ômicas’, a qual abrange técnicas analíticas de *high-throughput*, estatística multivariada e ferramentas de bioinformática auxiliando na descoberta de potenciais biomarcadores não invasivos para o diagnóstico e prognóstico do câncer de bexiga. Portanto, o presente estudo foi de grande importância e relevância à medida que ilustrou como tais técnicas podem potencialmente auxiliar no diagnóstico e prognóstico de doenças e contribuir para tratamentos personalizados no futuro, indicando a potencialidade de estudos dessa natureza.

Abstract

Bladder cancer is an urogenital cancer affecting men and women, and just in Brazil 8,600 new cases are diagnosed annually. Transurethral cystoscopy is a standard conduct in the diagnosis and monitoring of bladder cancer. However, this procedure is extremely invasive, painful, expensive and does not guarantee the best results. Thus, the searching for molecular markers may assist in the diagnosis and monitoring of bladder cancer, as well as decreasing the need for invasive tests in the monitoring of patients treatment. In this way, urine shows an important role as a source of biomarkers, mainly due to its non-invasive nature.

In this work we used two 'omics' approaches: proteomics and metabolomics, to search for biomarkers in urine for the diagnosis and progression of bladder cancer, respectively. The proteomics approach was explored for biomarkers for diagnosing disease. Using 2-DE, OFFGEL electrophoresis, and MS techniques, as well multivariate statistical analysis, they were identified 32 proteins that may be pointed as potential markers for bladder cancer. The metabolomics approach was used to search for biomarkers for progression and recurrence of the disease. The analytical techniques used for this approach, LC-MS and CE-MS, were complementary to each other and the results evaluated with multivariate statistical analysis indicated that 19 metabolites for recurrence and 23 metabolites for progression of bladder cancer could possibly be used for validation studies.

Thus, we demonstrated how the 'omics' sciences, which include high- throughput analytical techniques, multivariate statistical analysis, and bioinformatics tools, aid in the discovery of potential biomarkers for noninvasive diagnosis, evaluate recurrence and monitor progression of bladder cancer. Therefore, this study was of high relevance to demonstrate the potential of such techniques to contribute to studies of personalized medicine.

Lista de Ilustrações

Capítulo 1

Câncer de Bexiga, Biomarcadores e Ciências ‘Ômicas’

Figura 1.1 - Diagrama do estadiamento do câncer de bexiga.	3
Figura 1.2 - Exame de cistoscopia transuretral para diagnóstico de câncer de bexiga.	4
Figura 1.3 - Formação da urina pelos rins.	10
Figura 1.4 - Evolução no número de artigos indexados publicados na última década.	11
Figura 1.5 - Representação do processo de ionização por <i>electrospray</i> .	16
Figura 1.6 - Representação do processo de ionização por MALDI.	17
Figura 1.7 - <i>Score plot</i> da urina de pacientes com câncer de bexiga de (●) alto e (●) baixo risco construídos com PCA, PLS-DA e OPLS-DA.	22

Capítulo 2

Análise Proteômica

Figura 2.1 - Esquema ilustrativo das etapas da eletroforese 2-DE.	26
Figura 2.2 - (A) Equipamento OFFGEL (<i>Agilent Technologies</i>) e (B) esquema do seu processo de fracionamento das proteínas.	28
Figura 2.3 - Perfil eletroforético do <i>pool</i> de amostras de indivíduos controle obtidos por diferentes métodos de extração utilizando as condições eletroforéticas descritas no item 3.3.	42
Figura 2.4 - Géis de 2-DE do <i>pool</i> de amostras de indivíduos controle obtidos com precipitação com (A) acetona e (B) etanol, utilizando 150 µg de proteínas e condições eletroforéticas descritas no item 3.3.	42

Figura 2.5 - Comparação do mesmo gel do <i>pool</i> de indivíduos controle precipitadas com acetona e corado com (A) <i>Coomassie Blue</i> e (B) nitrato de prata, utilizando 150 µg de proteínas e condições eletroforéticas descritas no item 3.3.	44
Figura 2.6 - Gel 1-DE para o <i>pool</i> de amostras de indivíduos controle antes e após a remoção da albumina e da fração retida na coluna, utilizando as condições eletroforéticas descritas no item 3.3.	45
Figura 2.7 - Géis 2-DE do <i>pool</i> de indivíduos (A) antes, (B) após a remoção da albumina e (C) da fração retida na coluna, utilizando 150 µg de proteínas e condições eletroforéticas descritas no item 3.3.	46
Figura 2.8 - Gel 1-DE para comparação de <i>pool</i> de amostras de indivíduos controle, pacientes com câncer de bexiga sem diluição e pacientes com câncer de bexiga com diluição de 20 vezes. As condições eletroforéticas utilizadas foram descritas no item 3.3.	48
Figura 2.9 - Géis de eletroforese 2-DE do <i>pool</i> de amostras de (A) indivíduos controle e (B) pacientes com câncer de bexiga utilizando 150 µg de proteínas e condições eletroforéticas descritas no item 3.3.	49
Figura 2.10 - (A) <i>Score</i> e (B) <i>loading plot</i> do modelo construído com PCA a partir dos dados obtidos por eletroforese 2-DE para comparação de indivíduos controle (●C) e doentes com câncer de bexiga (●D). $R^2 = 0,983$; $Q^2 = 0,960$. ● Variáveis de ambas as classes.	50
Figura 2.11 - Cromatogramas das frações (A) CF5 (controle - fração 5) e (B) D5 (doente - fração 5) após focalização no OFFGEL. As condições cromatográficas utilizadas foram descritas no item 3.8.	51
Figura 2.12 - (A) <i>Score</i> e (B) <i>loading plot</i> do modelo construído com PCA a partir dos dados obtidos por OFFGEL e LC-MS para comparação das frações de indivíduos controle (●CF) e doentes com câncer de bexiga (●DF). $R^2 = 0,997$; $Q^2 = 0,513$. ● Variáveis de ambas as classes.	52
Figura 2.13 - Esquema de ativação da via reguladora anti-apoptótica (via Akt).	63
Figura 2.14 - Esquema de inibição da proteína pró-apoptótica TNFA pela fetuína A e TNFR14.	65

Capítulo 3

Análise Metabolômica

- Figura 3.1** - Perfil de todas as amostras obtidas com A) LC-MS e B) CE-MS antes do alinhamento 83
- Figura 3.2** - Modelos construídos com PCA a partir dos dados obtidos com (A) LC-MS e (B) CE-MS. $\pm$ QC, ● EB, ◆ RB, ■ EA, ▲ RA. 84
- Figura 3.3** - Modelos construídos com PLS-DA a partir dos dados obtidos com (A) LC-MS e (B) CE-MS. $\pm$ QC, ● EB, ◆ RB, ■ EA, ▲ RA. 86
- Figura 3.4** - Modelos construídos com OPLS-DA a partir dos dados obtidos com LC-MS para as seguintes comparações: (A) EB vs. RB; (B) EA vs. RA; (C) EB vs. EA; (D) RB vs. RA. $\pm$ QC, ● EB, ◆ RB, ■ EA, ▲ RA. A: $R^2 = 1,000$, $Q^2 = 0,448$; B: $R^2 = 1,000$, $Q^2 = 0,607$; C: $R^2 = 1,000$, $Q^2 = 0,414$; D: $R^2 = 1,000$, $Q^2 = 0,744$. 87
- Figura 3.5** - Modelos construídos com OPLS-DA a partir dos dados obtidos com CE-MS para as seguintes comparações: (A) EB vs. RB; (B) EA vs. RA; (C) EB vs. EA; (D) RB vs. RA. $\pm$ QC, ● EB, ◆ RB, ■ EA, ▲ RA. A: $R^2 = 0,867$, $Q^2 = 0,242$; B: $R^2 = 0,974$, $Q^2 = 0,449$; C: $R^2 = 1,000$, $Q^2 = 0,572$; D: $R^2 = 0,971$, $Q^2 = 0,402$. 88
- Figura 3.6** - Esquema simbolizando parte do metabolismo da tirosina, com destaque para formação de tirosina e dopaquinona pela enzima tirosinase. 94
- Figura 3.7** - Esquema simbolizando parte do metabolismo da purina, com destaque para os metabólitos hipoxantina e ácido úrico e atuação da xantina oxiredutase. 96

Lista de Tabelas

Capítulo 1

Câncer de Bexiga, Biomarcadores e Ciências ‘Ômicas’

Tabela 1.1 - Estadiamento dos tumores de câncer de bexiga (T)	3
--	---

Tabela 1.2 - Esquema resumido do sistema de fases para estudos de busca de biomarcadores proposto em 2002 pelo EDNR, NCI, USA	7
--	---

Capítulo 2

Análise Proteômica

Tabela 2.1 - Condições de focalização isoeletrica para fitas de 13 cm pH 3-10	36
--	----

Tabela 2.2 - Concentração e eficiência de extração de proteínas totais obtidas a partir do <i>pool</i> de amostras de indivíduos controle por diferentes métodos de extração utilizando o ensaio de Bradford	41
---	----

Tabela 2.3 - Concentração de proteínas totais obtidas a partir do <i>pool</i> de amostras de indivíduos controle e pacientes com câncer de bexiga	48
--	----

Tabela 2.4 - Proteínas identificadas apenas na urina do grupo controle	54
---	----

Tabela 2.5 - Proteínas identificadas apenas na urina do grupo doente	58
---	----

Tabela 2.6 - Proteínas diferencialmente expressas identificadas na urina de ambos os grupos (controle e doente)	60
--	----

Capítulo 3

Análise Metabolômica

Tabela 3.1 - Principais classes químicas de metabólitos presentes na urina de humanos	76
--	----

Tabela 3.2 - Número de compostos obtidos após as referidas etapas do tratamento de dados	89
Tabela 3.3 - Metabólitos identificados e estatisticamente significativos que mostraram diferenças entre os grupos	90
Tabela 3.4 - Metabólitos apontados como biomarcadores em potencial para o câncer de bexiga	97

Lista de abreviaturas e siglas

- ACN: acetonitrila
- APCI: (*amospheric-pressure chemical ionization*) ionização química a pressão atmosférica
- AKT: proteína quinase B
- AXL: receptor da proteína tirosina-quinase
- BSA: (*bovine serum albumin*) albumina de soro bovino
- CCT: carcinoma de células transicionais
- CE: (*capillary electrophoresis*) eletroforese capilar
- CE-MS: (*capillary electrophoresis - mass spectrometry*) eletroforese capilar acoplada à espectrometria de massas
- CID: (*collision induced dissociation*) dissociação induzida por colisão
- CV: coeficiente de variação
- DAD-UV: (*diode array detector - ultraviolet*) ultravioleta com detector de arranjo de diodo
- 1-DE: (*one dimensional electrophoresis*) eletroforese unidimensional
- 2-DE: (*two dimensional electrophoresis*) eletroforese bidimensional
- 2D-DIGE: (*difference gel electrophoresis*) eletroforese em gel diferencial
- DTT: ditioneitol
- EA: pacientes com tumor estável e de alto risco
- EB: pacientes com tumor estável e de baixo risco
- EDRN: *Early Detection Research Network*
- ESI: (*electrospray ionization*) ionização por *electrospray*
- FDA: *Food and Drug Administration*
- FTICR: (*Fourier transform ion cyclotron resonance*) ressonância ciclônica de íons por transformada de Fourier
- GAS6: *Growth arrest specific protein 6*
- GC-MS: (*gas chromatography - mass spectrometry*) cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
- HILIC: (*Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*) cromatografia líquida de alta eficiência de interação hidrofílica
- HMDB: *Human Metabolome Database*

- HPLC: (*high performance liquid chromatography*) cromatografia líquida de alta eficiência
- IAA: iodoacetamida
- ID: (*internal diameter*) diâmetro interno
- IEF: (*isoelectric focusing*) focalização isoeletrica
- IgG: (*Immunoglobulin G*) imunoglobulina G
- IPG: (*immobilized ph gradiente*) gradiente de pH imobilizado
- IT: *ion trap*
- KEGG: *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*
- LC: (*liquid chromatography*) cromatografia líquida
- LC-MS: (*liquid chromatography - mass spectrometry*) cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
- LC-NMR: (*liquid chromatography – nuclear magnetic resonance*) cromatografia líquida com detector de ressonância magnética nuclear
- LTQ: *linear trap quadrupole*
- MALDI: (*matrix-assisted laser desorptio/ionization*) dessorção/ionização a laser assistida por matriz
- MM: massa molar
- MS: (*mass spectrometry*) espectrometria de massas
- NCI: *National Cancer Institute*
- OPLS-DA (*Orthogonal Partial Least-Squares Discriminant Analysis*) Análise Discriminante pelo Método dos Mínimos Quadrados Parciais Ortogonal
- OT: *orbitrap*
- PCA: (*Principal Component Analysis*) Análise de Componentes Principais
- PCR: (*Principal Component Regression*) Regressão em Componentes Principais
- pI: ponto isoeletrico
- PLS: (*Partial Least Squares*) Regressão por Mínimos Quadrados Parciais
- PLS-DA: (*Partial Least-Squares Discriminant Analysis*) Análise de Discriminante Linear com Mínimos Quadrados Parciais
- PMF: (*peptide mass fingerprinting*) mapa de digerido triptico
- Q: quadrupolo
- QC: (*Quality Controls*) controles de qualidade
- qTOF (*Quadropole Time of Fligth*) quadrupolo tempo de voo

- RA: pacientes com tumor reincidente e de alto risco
- RB: pacientes com tumor reincidente e de baixo risco
- RMN: ressonância magnética nuclear
- SDS-PAGE: (*sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel*) gel de poliacrilamida em dodecil-sulfato de sódio –
- SILAC: (*stable isotope labeling by amino acids in cell culture*) marcação com isótopos estáveis com aminoácidos em cultura de células
- SIMCA (*Soft Independent Modeling of Class Analogy*) Modelagem Independente e Flexível por Analogia de Classe
- TCA: (*trichloroacetic acid*) ácido tricloroacético
- TFA: (*trifluoroacetic acid*) ácido trifluoroacético
- TM: tempo de migração
- TNFA: fator de necrose tumoral alfa
- TNR14: proteína receptora do fator de necrose tumoral
- TOF: (*time of flight*) tempo de voo
- TR: tempo de retenção
- iTRAQ: (*isobaric tag for relative and absolute quantitation*) marcador isobárico para quantificação relativa e absoluta
- WHO – ISUP: *World Health Organisation - International Society of Urological Pathology*
- XOR: xantina oxidoreductase

Sumário

Capítulo 1

<i>Câncer de Bexiga, Biomarcadores e Ciências ‘Ômicas’</i>	1
1 Câncer de bexiga	2
2 Biomarcadores	5
3 Urina como fonte de biomarcadores	9
4 Ciências ‘Ômicas’	11
5 Desenvolvimento de Técnicas Analíticas <i>High-Throughput</i>	13
5.1 Espectrometria de Massas	14
6 Bioinformática e Ciências ‘Ômicas’	17
7 Quimiometria aplicada às Ciências ‘Ômicas’	19

Capítulo 2

<i>Análise Proteômica</i>	23
1 Introdução	24
1.1 Proteômica	24
1.2 Técnicas Analíticas para Análises Proteômicas	25
1.2.1 Eletroforese Bidimensional	25
1.2.2 Eletroforese em OFFGEL	27
1.2.3 Espectrometria de Massas Aplicada às Análises Proteômicas	29
1.3 Estratégias Analíticas para Análises Proteômicas: <i>Bottom-up</i> e <i>Top-down</i>	29
1.4 Análise Proteômica Aplicada ao Câncer de Bexiga	30
2 Objetivos	33

3	Materiais e Métodos	34
3.1	Amostras Biológicas	34
3.2	Extração de Proteínas	34
3.2.1	Acetona	34
3.2.2	Etanol	35
3.2.3	TCA	35
3.3	Separação de Proteínas por Eletroforese 1-DE e 2-DE	35
3.4	Análise Estatística	36
3.5	Depleção de Albumina	37
3.6	Análises no OFFGEL	37
3.7	Digestão de Proteínas	38
3.7.1	Digestão de Proteínas em Gel	38
3.7.2	Digestão de Proteínas em Solução	38
3.8	Análise dos Peptídeos por LC-MS/MS	39
3.9	Análise dos Dados	39
4	Resultados e Discussões	41
4.1	Padronização do Preparo de Amostra de Urina para Análise Proteômica	41
4.2	Análises de Indivíduos Controle vs. Pacientes com Câncer de Bexiga	47
5	Conclusões	69
Capítulo 3		
	<i>Análise Metabolômica</i>	70
1	Introdução	71
1.1	Metabolômica	71
1.2	Técnicas Analíticas para Análise Metabolômicas	72
1.2.1	Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas	73
1.2.2	Eletroforese Capilar acoplada à Espectrometria de Massas	74
1.3	Análise Metabolômica Aplicada ao Câncer de Bexiga	75
2	Objetivos	78

3	Materiais e Métodos	78
3.1	Amostras Biológicas	79
3.2	Tratamento das Amostras	79
3.3	<i>Fingerprint</i> de urina utilizando CE-MS	80
3.4	<i>Fingerprint</i> de urina utilizando LC-MS	81
3.5	Tratamento dos Dados	81
3.6	Identificação de Compostos	82
4	Resultados e Discussões	83
5	Conclusões	98
Capítulo 4		
	<i>Conclusões Gerais e Perspectivas Futuras</i>	100
	Referencias Bibliográficas	104

Prefácio

Esta tese foi dividida em quatro capítulos. O Capítulo 1 apresenta uma revisão sobre o câncer de bexiga, biomarcadores e ciências ‘ômicas’, o tripé que sustentou toda a tese. Os capítulos 2 e 3 foram divididos conforme a abordagem ‘ômica’ utilizada. Mais especificamente, o Capítulo 2 versa sobre a parte proteômica do trabalho, enquanto o Capítulo 3 aborda a parte metabolômica. Finalmente, o Capítulo 4 apresenta uma conclusão geral do trabalho bem como perspectivas de trabalho futuros e novas possibilidades de pesquisa derivadas desse trabalho.

Capítulo 1

Câncer de Bexiga, Biomarcadores e Ciências ‘Ômicas’

1 Câncer de bexiga

O câncer de bexiga é a segunda neoplasia urogenital, em número de casos, a acometer homens nos Estados Unidos, e o oitavo tipo de câncer mais prevalente em mulheres.¹⁻⁴ No Brasil, é estimado que 3,9% dos cânceres em homens sejam de bexiga, sendo que 8.600 novos casos ao ano são diagnosticados.⁵ Em ambos os sexos a incidência vem aumentando, entretanto este tipo de câncer é de 2 a 5 vezes mais comum em homens que em mulheres.⁶ Apesar de poder ocorrer em qualquer idade, a incidência de câncer de bexiga aumenta diretamente com a idade, sendo o diagnóstico mais frequente na 6ª e 7ª décadas de vida.⁵

Noventa por cento dos cânceres de bexiga são carcinomas de células transitórias (CCT) que surgem do revestimento interno da bexiga chamado de urotélio. Os outros 10% dos tumores são carcinomas de células escamosas ou adenocarcinomas, associado à irritação crônica por cálculo, cateter vesical permanente, infecção urinária ou infecção crônica por *Schistosoma haematobium* (especialmente em países norte-africanos).⁶

Os tumores de bexiga são classificados com relação ao estadiamento baseando-se na profundidade em que um tumor penetra a parede deste órgão. A classificação completa e um diagrama do estadiamento encontram-se na Tabela 1.1 e Figura 1.1, respectivamente.

Cerca de 20% dos casos de câncer de bexiga estão associados à exposição ocupacional a aminas aromáticas e a substâncias químicas orgânicas em uma série de atividades profissionais, em especial atividades de indústrias têxteis, de borracha e tecelagem.⁶ Aminas aromáticas também estão presentes na fumaça de cigarros e os metabólitos a ela relacionados excretados na urina de fumantes são responsáveis por cerca de 50% dos casos de câncer de bexiga. De fato, indivíduos tabagistas apresentam incidência de câncer de bexiga até quatro vezes maior em comparação a não fumantes, e a redução de risco leva até 20 anos para retornar aos níveis de um não tabagista após a cessação do hábito.⁶ O consumo de grandes quantidades do analgésico fenacetina por longo tempo, bem como do medicamento ciclofosfamida, está associado a maior risco de desenvolvimento de câncer de bexiga. Ainda, a radioterapia pélvica pode estar associada ao desenvolvimento desse câncer.

Tabela 1.1 - Estadiamento dos tumores de câncer de bexiga (T)

<i>Classe</i>	<i>Descrição do tumor</i>
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> plano de alto grau (confinado ao urotélio)
Ta	Tumor papilar não invasivo (confinado no urotélio)
T1	Ocorre a invasão da lâmina própria
T2a	Ocorre a invasão superficial do músculo da bexiga
T2b	Ocorre a invasão profunda do músculo da bexiga
T3a	Ocorre a invasão microscópica da gordura perivesical
T3b	Ocorre a invasão macroscópica da gordura perivesical (e progredindo para além da bexiga)
T4a	Ocorre a invasão de órgãos adjacentes (útero, ovários, próstata)
T4b	Ocorre a invasão da parede pélvica e/ou da parede abdominal

Fonte: BRASIL MINISTÉRIO DA SAÚDE. **TNM: classificação de tumores malignos**. Rio de Janeiro: INCA, 2004. p. 209.⁷

Figura 1.1 – Diagrama do estadiamento do câncer de bexiga.

Fonte: NAT PERNICK, M. D. **Bladder Staging**. Pathology Outlines.com. Disponível em: <<http://www.pathologyoutlines.com/topic/bladderstaging.html>> Acesso em: 21 set. 2013.⁸

Hematuria indolor e intermitente é o sintoma e o sinal mais comum em câncer de bexiga, ocorrendo na grande maioria dos pacientes. Sintomas irritativos do trato urinário, como aumento do número de micções com diminuição do volume da urina, urgência, dificuldade e ardência para urinar, bem como dores vesicais também são sintomas da doença.^{4,5} Entretanto, tais sintomas não são exclusivos dessa doença, ou seja, outras enfermidades do trato gênito urinário podem apresentar os mesmo sintomas, dificultando um diagnóstico preciso.

Cistoscopia transuretral é a conduta padrão no diagnóstico e acompanhamento do câncer de bexiga. O procedimento consiste da introdução de um capilar no canal da uretra até que este alcance a bexiga (Figura 1.2), possibilitando a visualização ótica dos segmentos uretrais e da própria bexiga. Entretanto, este procedimento é extremamente invasivo e doloroso além de ter elevado custo e ainda não garantir todos os resultados esperados.

Figura 1.2 – Exame de cistoscopia transuretral para diagnóstico de câncer de bexiga.

Fonte: THOMPSON, E. G.; SEIFERT, A. L. **Cystoscopy of the Bladder**. Urology WebMD. Disponível em: <<http://www.webmd.com/cancer/bladder-cancer/cystoscopy-of-the-bladder>> Acesso em: 18 set. 2013.⁹

A citologia urinária pode também ser empregada no diagnóstico de pacientes com suspeita de câncer de bexiga e no acompanhamento destes após terapêutica. Porém, as desvantagens desse método residem na subjetividade de critérios e experiência do

citopatologista e também na baixa sensibilidade, ao redor de 35%, especialmente para tumores de baixo grau.⁶

Com o propósito de desenvolver melhores ferramentas de diagnóstico e de avaliar a progressão do câncer de bexiga, bem como diminuir a necessidade de exames invasivos no acompanhamento de pacientes tratados, busca-se continuamente por marcadores moleculares detectáveis na urina.

2 Biomarcadores

Biomarcador é um termo abrangente para a investigação de processos biológicos e seu uso na detecção precoce, diagnóstico, monitoramento de doenças e escolha de tratamentos.¹⁰ Um biomarcador é definido como um indicador mensurável de um estado biológico específico, particularmente a presença ou o estágio de uma doença.¹¹ De fato, um biomarcador refere-se a uma molécula, a qual pode pertencer a diversas classes de compostos e, como consequência, uma variedade de estratégias têm sido adotadas para sua descoberta.

A propagação de pesquisas com biomarcadores foi possível a partir do desenvolvimento de tecnologias para detecção, quantificação e identificação de biomoléculas. O crescente conhecimento dos mecanismos moleculares juntamente com a aplicação de técnicas de *high-throughput* nas análises ômicas vêm fornecendo a possibilidade de identificação de potenciais biomarcadores específicos para diferentes doenças.¹²

Apesar do reconhecimento dos benefícios que os biomarcadores podem trazer e dos esforços realizados para a descoberta de novos marcadores, poucos deles estão sendo utilizados na prática clínica. Desde 1998 a taxa de introdução de novos biomarcadores aprovado pelo FDA (*US Food and Drug Administration*) tem sido em média de um por ano.¹¹ As razões para isso são várias e refletem o longo e difícil caminho desde a descoberta do candidato até a implementação do marcador.

O desenvolvimento de um novo biomarcador segue um processo tão sistemático e rigoroso quanto a de um fármaco. Em 2002, a Rede de Pesquisa de Detecção Precoce (*Early Detection Research Network*, EDRN) do Instituto Nacional do Câncer (*National Cancer*

Institute, NCI - USA) propuseram um sistema de cinco passos para estudos de busca de biomarcadores antes da sua implementação:^{10,13}

- Fase I – Esta etapa compreende essencialmente a fase de geração da hipótese, ou seja, a pergunta biológica envolvida com uma patologia particular. Nesta etapa, não só a pergunta biológica deve ser clara, mas também a escolha da matriz a ser utilizada na pesquisa, o que requer do pesquisador um estudo detalhado de tal. Dependendo da matriz alvo, testes *in vitro* ou em modelos animais, podem ser realizados.
- Fase II – Desenvolvimento de ensaios preliminares em amostras de pacientes para determinação de potenciais biomarcadores e avaliação de sua reprodutibilidade e robustez. Nesta etapa, indivíduos com e sem câncer ou com tumores de diferentes estágios devem ser distinguidos pelo biomarcador, a fim de ser considerado promissor e passível de ser avaliado nas demais etapas do processo.
- Fase III – O biomarcador é testado em um grupo de pacientes com relação a sua capacidade de discriminar entre os grupos avaliados. Se nesta etapa o biomarcador discrimina bem apenas determinada subpopulação, esta informação deve ser considerada para a seleção de populações apropriadas para nova triagem.
- Fase IV – O biomarcador é testado em uma população relevante, representativa da população alvo, para determinar a funcionalidade do mesmo. Esta é, efetivamente, a fase de validação do marcador o qual deve demonstrar sua utilidade na prática clínica. Idealmente, o biomarcador deve ser testado em populações diferentes daquela da descoberta e as taxas de sensibilidade e especificidade devem ser determinadas.
- Fase V – Finalmente, a última fase antes da implementação do marcador deve avaliar o impacto deste na sociedade. Devem ser avaliados não apenas a funcionalidade do biomarcador, mas também as dificuldades na sua implementação, custos e acesso pela comunidade, visando a viabilidade da sua implementação. Não é raro que nesta fase os interesses no marcador diminuam devido tanto à falta de avaliação dos parâmetros anteriormente mencionados como a não conformidade com os mesmos.
-

A Tabela 1.2 mostra um esquema resumido do sistema de fases para estudos de busca de biomarcadores proposto em 2002 pelo EDNRN, NCI, USA.

Tabela 1.2 - Esquema resumido do sistema de fases para estudos de busca de biomarcadores proposto em 2002 pelo EDNRN, NCI, USA

<i>Fase</i>	<i>Objetivo</i>	<i>Experimentação</i>	<i>Detalhes da amostra</i>
I	Geração da hipótese	Estudos pré-clínicos	Possibilidade de ensaios <i>in vitro</i> ou em modelos animais
II	Nomear e classificar os candidatos a biomarcadores	Reprodutibilidade e robustez; discriminação entre os grupos estudados	Ensaio preliminares em grupos reduzidos
III	Testar em uma população pequena	Avaliação da discriminação, estabelecimento de regras de predição	Ensaio em grupos de pacientes maior que a fase anterior
IV	Validação do candidato a biomarcador	Avaliação da funcionalidade	Ensaio em população grande, multi-institucional
V	Avaliação do impacto do candidato a biomarcador	Relatório descrevendo sua funcionalidade e viabilidade de implementação	-

Fonte: Adaptado de SHARIAT, S. F.; LOTAN, Y.; VICKERS, A.; KARAKIEWICZ, P. I.; SCHMITZ-DRÄGER, B. J.; GOEBELL, P. J.; MALATS, N. Statistical consideration for clinical biomarker research in bladder cancer. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, v. 28, p. 389-400, 2010.¹⁰

O esquema de fases apresentado acima propõe a sistematização de estudos envolvendo biomarcadores, entretanto, tal sistema não segue como regra uma vez que não há regulamentação para estes estudos.

Além da complexidade na sistemática, as pesquisas abrangendo a busca de biomarcadores devem lidar com diversos desafios analíticos. Fundamentalmente, estudos que buscam por biomarcadores analisam a abundância relativa de moléculas por comparação, ou seja, moléculas de qualquer classe de compostos com abundância diferenciada entre os

grupos pode ser um biomarcador em potencial. Por isso, determinar os parâmetros analíticos para todas as moléculas medidas nesse tipo de estudo é um desafio.

Parâmetros como eficiência de extração, recuperação e reprodutibilidade são facilmente determinadas em estudos analíticos que avaliam um único composto. Neste caso, tais parâmetros são determinados através de curva de calibração analítica e adicionando quantidades conhecidas do composto alvo na matriz de interesse. Entretanto, quando o objetivo é detectar o máximo número de compostos possíveis, estabelecer estes parâmetros para cada analito é uma tarefa impossível.¹⁴

Não há técnicas analíticas capazes de separar completamente o proteoma ou metaboloma de uma amostra complexa. Porém, isso não se deve apenas às limitações analíticas das técnicas ou ao número de compostos presentes na amostra, mas também à ampla faixa dinâmica de concentração desses compostos, que em muitos casos extrapolam nove ordens de grandeza. Consequentemente, é necessário o uso técnicas para depleção de moléculas majoritárias, as quais podem mascarar compostos em menor concentração que podem atuar como marcadores.

Outros processos importantes em análises de biomarcadores que devem ser avaliados são a manipulação e estocagem de amostras. Os compostos presentes nas amostras são suscetíveis a modificações quando estocados ou manuseados incorretamente e, assim, uma análise incorreta das moléculas diferencialmente expressas ocorreria. Até mesmo o número de ciclos de congelamento e descongelamento já foi relatado afetar compostos em soro e, por isso, é importante aderir a um procedimento padrão para evitar erros na avaliação dos marcadores.¹⁵

Basicamente, duas fontes de materiais estão disponíveis para estudos de *screening* de biomarcadores em humanos: fluidos corporais e tecidos. Pesquisas deste tipo relacionadas à nefrologia têm, em geral, focado na urina como matriz devido à sua fácil acessibilidade e grande disponibilidade de material sem que haja a necessidade do uso de procedimentos invasivos. Além disso, como regra, mudanças fisiopatológicas no trato gênito urinário e rim são refletidas por mudanças no perfil urinário.¹⁶

3 Urina como fonte de biomarcadores

O perfil de biomoléculas de fluidos corporais tem sido bastante explorado na busca de biomarcadores para doenças.¹⁷ Neste cenário, a urina representa a matriz mais acessível e seu perfil biomolecular tem mostrado ser promissor na identificação de potenciais biomarcadores, principalmente relacionadas ao trato urinário.¹⁸ Particularmente, a disponibilidade de biomarcadores de tumor através da urina representa uma alternativa conveniente para sua detecção precoce e acompanhamento, devido ao contato direto da urina com o tumor.¹⁹ Assim, os compostos liberados das células tumorais enriquecidos na urina podem ser detectados nesse fluido corporal.

O uso de biomarcadores urinários não é uma prática recente. Durante muito tempo a glicose foi detectada em urina avaliando se formigas eram atraídas pela mesma. A presença de albumina na urina tem sido usada por séculos como indicador de doenças renais, avaliando sua capacidade de formar espuma após agitação. Assim, estudos para identificar biomarcadores de doenças na urina têm sido um componente fundamental da medicina investigativa ao longo dos séculos XX e XXI. Esses estudos têm se baseado no conhecimento da fisiopatologia da doença para identificar biomarcadores putativos que podem ser testados em triagens clínicas.²⁰

A urina é produzida pelo rim o qual é formado por milhares de células funcionais chamadas néfrons. Os néfrons são divididos em glomérulos e tubo renal, sendo que os primeiros filtram o plasma originando a urina primitiva e o segundo absorve essa urina primitiva.²¹ A urina final chega através dos ureteres à bexiga, onde fica armazenada até eliminação (Figura 1.3). Destino de muitas das biomoléculas do plasma, o que lhe confere informações de órgãos mais distantes, a urina também é enriquecida com biomoléculas dos rins e trato urinário, o que a torna o fluido ideal para estudos relacionados a alterações nesses órgãos.²¹

Comparada com outros fluidos corpóreos, a urina tem características que a torna favorita entre os demais. A principal vantagem do uso da urina nos estudos de biomarcadores, além de sua natureza não invasiva e fácil acessibilidade, é que o paciente não é exposto a procedimentos desconfortáveis e não tem sua rotina de tratamento alterada. Tais vantagens permitem a amostragem repetida de um mesmo indivíduo para avaliação de reprodutibilidade.

Além disso, as biomoléculas contidas na urina são em geral, solúveis em água. Finalmente, o conteúdo biomolecular é relativamente estável, provavelmente devido ao fato da sua permanência estagnada na bexiga, o que é um fator positivo para a busca de biomarcadores.^{12,}

21

Figura 1.3 – Formação da urina pelos rins.

Fonte: Adaptado de DECRAMER, S.; DE PEREDO, A. G.; BREUIL, B.; MISCHAK, H.; MONSARRAT, B.; BASCANDS, J. L.; SCHANSTRAA, J. P. Urine in clinical proteomics. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 7, p. 1850 –1862, 2008.²¹

Contudo, a urina também apresenta algumas desvantagens que devem ser superadas. A principal delas está relacionada ao fato que a concentração das biomoléculas urinárias varia conforme a ingestão de líquidos, variações na dieta, processos metabólicos ou catabólicos, ritmo cardíaco e exercícios, bem como nível circulatório. Entretanto, isso pode ser contornado normalizando-se a concentração de proteínas (e outras moléculas) pela razão de creatinina ou peptídeos presentes na mesma.²¹ Outra desvantagem está relacionada à baixa concentração de algumas biomoléculas na urina, como proteínas, por exemplo, tornando-se necessárias etapas adicionais para concentração das mesmas, podendo levar a perdas. Ainda para o caso de proteínas, existem algumas delas que são abundantes na urina, como a albumina, que podem mascarar outras proteínas, e desta forma, uma etapa de depleção deve ser realizada. Por fim, a urina apresenta alto conteúdo de sal, o que é incompatível com algumas técnicas analíticas.

Portanto, esse sal deve ser eliminado da amostra para que a busca por biomarcadores possa ser realizada.

4 Ciências ‘Ômicas’

Os avanços na genômica, observados com o Projeto Genoma Humano, aliado ao desenvolvimento de equipamentos poderosos para miniaturização e automação da aquisição de dados em larga escala (*high-throughput*) proporcionaram o surgimento do que pode ser chamado de ciências ‘ômicas’.²² O termo ‘ômicas’ é um termo geral para uma grande disciplina da ciência que visa o mapeamento e interação comparativa de biomoléculas, tais como DNA, proteínas, metabólitos, entre outros,²³ os quais são intitulados genômica, proteômica, metabolômica, etc. A Figura 1.4 apresenta a evolução das pesquisas em ciências ‘ômicas’ na última década.

Figura 1.4 – Evolução no número de artigos em ciências ‘ômicas’ indexados publicados na última década.

Fonte: Gráfico produzido mediante busca no banco de artigos *Scopus* (<http://www.scopus.com/>) pela palavra-chave ‘*omics’.

A abordagem ‘ômica’ faz uso de um conjunto de dados amplo e abrangente para fornecer informações sobre os processos bioquímicos ao invés de focar na reducionista medicina molecular baseada em metodologias *target*. De fato, as pesquisas que buscavam por biomoléculas individuais nos parecem ingênuas frente ao conjunto de ‘ômicas’ que pode ser obtido atualmente. Entretanto, talvez no futuro, observaremos com o mesmo compadecimento para a capacidade tecnológica atual e perceberemos que a complexidade da biologia de sistemas é muito maior que os avanços alcançados até o momento.²⁴ Indiscutivelmente, metodologias *target* continuam sendo úteis em diversos campos e, efetivamente, *target* e *untarget* são procedimentos complementares na busca de biomarcadores, uma vez que para a validação de um marcador o procedimento *target* se faz necessário.

Conforme mencionado anteriormente, o desenvolvimento de métodos analíticos instrumentais proporcionou o surgimento das ciências ‘ômicas’. O avanço de tecnologias de *high-throughput* possibilitou o exame de sistemas biológicos em nível de genoma, proteoma e metaboloma totais com alta resolução e a custos acessíveis. A capacidade de olhar em sistemas biológicos sob os diferentes níveis ‘ômicos’ nos permite estratificar fenômenos biológicos complexos e entender processos patológicos de interesse. Assim, pacientes podem ser monitorados quanto aos seus perfis ‘ômicos’ para obtenção de uma assinatura molecular ou de um estado patológico. Tais assinaturas moleculares podem permitir que médicos individualizem o diagnóstico, tratamento, prevenção e a avaliação de risco de doenças.²⁵

Os progressos no campo das ‘ômicas’ alavancaram os estudos de biomarcadores à medida que permitiram não apenas a busca por classes de compostos completos (genoma, proteoma, metaboloma, etc.), mas também a interação entre elas em tempo reduzido. Embora a aquisição dos dados tenha crescido, a complexidade no entendimento de suas relações também aumentou. Portanto, a interação de pesquisadores de diversas áreas como físicos, químicos, bioquímicos, estatísticos, bioinformatas, entre outros, é fundamental. Em geral, as abordagens ‘ômicas’ necessitam de muitos recursos, são analiticamente exigentes e requerem a utilização de técnicas estatísticas multivariadas para analisar o conjunto de dados obtidos que consiste de centenas a milhares de variáveis.

Um revés que deve ser cuidadosamente avaliado e evitado em análises ‘ômicas’ é a presença de *bias* (tendência). O problema de *bias* aparece, efetivamente, relacionado a todos

os estudos que envolvem medidas analíticas. Entretanto, em análises ‘ômicas’ esse problema pode levar a uma associação sistemática errônea de alguma característica de um grupo, de maneira que a comparação com outro grupo se dá de forma distorcida.²⁶ Lay Jr. *et al.*²⁶ associam esse problema à falta de uma hipótese específica em estudos envolvendo ‘ômicas’. Para os autores, experimentos vagamente definidos no princípio tendem a gerar mais erros culminando no aparecimento de *bias*. Os autores também afirmam que o aparecimento de *bias* poderia forçar o descobrimento do que se procura, o que se torna mais evidente em dados ‘ômicos’ os quais possuem conjuntos de dados maiores, tornando mais fácil encontrar uma correlação, independentemente da verdadeira causa e efeito. Além da pouca especificidade no planejamento experimental, a análise dos dados pouco adequada também é apontada por pesquisadores como uma fonte de *bias* em experimentos ‘ômicos’.²⁷ Infelizmente a questão de *bias* não pode ser minimizada pelo simples aumento do número de indivíduos na amostragem (n). Uma maneira de minimizar *bias* em análises ‘ômicas’ é fazer um planejamento experimental adequado e desenvolver protocolos de manipulação de amostras que sejam utilizados por toda comunidade científica.

Se a evolução das técnicas analíticas de *high-throughput* permitiu o desenvolvimento das ciências ‘ômicas’, essa por sua vez impulsionou avanços nas áreas de estatística multivariada e bioinformática. Tais áreas detêm extrema importância nas análises de dados ‘ômicos’ a tal ponto de não ser possível avançar nessa ciência sem um mínimo conhecimento nesses campos.

5 Desenvolvimento de Técnicas Analíticas *High-Throughput*

As últimas décadas assistiram a uma explosão na quantidade de dados biológicos gerados por um número cada vez maior de técnicas as quais permitem a detecção simultânea de um grande número de biomoléculas. As ‘ômicas’ utilizam técnicas de *high-throughput*, pois essas são capazes de gerar grandes quantidades de dados necessárias para permitir o entendimento em nível de sistema e traçar correlações de componentes moleculares.²⁸ No entanto, todos esses dados apenas puderam ser gerados após a evolução dos equipamentos e metodologias analíticas disponíveis atualmente. Assim, as ciências ‘ômicas’ englobam uma variedade de tecnologias as quais são capazes de ajudar a explicar vias celulares normais e

anormais, redes e processos via o monitoramento simultâneo de centenas de componentes moleculares.

Uma definição que pode ser aplicada para tecnologia *high-throughput* é o uso de automação para aumentar o rendimento de um procedimento experimental e aquisição de dados.²⁸ As técnicas de *high-throughput* fazem uso de componentes robóticos, óptica, química, biologia, etc. para fornecer, de maneira satisfatória, o montante de dados requeridos nas ‘ômicas’. De fato, a explosão na produção de dados ‘ômicos’ é uma consequência da queda dos preços dos equipamentos, o que permitiu o acesso de diversas universidades e centros de pesquisa a tais tecnologias.

Sabe-se que, atualmente existem metodologias *high-throughput* para a maior parte dos domínios ‘ômicos’, genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica. Técnicas de sequenciamento, *microarray*, ressonância magnética nuclear e espectrometria de massas são algumas delas. Em particular, o desenvolvimento da espectrometria de massas de alta resolução foi de extrema importância para a proteômica e metabolômica e será abordada a seguir.

5.1 Espectrometria de Massas

A espectrometria de massas (MS), em combinação com métodos de separação e ferramentas de bioinformática, é a técnica analítica chave na qual as tecnologias ‘ômicas’ baseiam-se. Tal técnica permite a análise de moléculas em fase gasosa as quais são ionizadas e separadas de acordo com sua razão massa/carga (m/z) quando submetidas a condições específicas de campo elétrico e/ou magnético. A espectrometria de massas permite a determinação da massa molecular, a caracterização estrutural, o estudo da reatividade de compostos, bem como a análise qualitativa e quantitativa de componentes de uma mistura.

Um espectrômetro de massas é composto basicamente por uma fonte de ionização, um analisador de massas, um detector e um sistema de aquisição de dados. Atualmente, existem diversas fontes de ionização e analisadores de massas com características peculiares os quais favorecem a análise de determinada classe de compostos.

No seu surgimento, na década de 80, as análises em espectrometria de massas eram restritas a compostos orgânicos de baixa massa molecular, substâncias voláteis e termicamente estáveis. Entretanto, o desenvolvimento da técnica de ionização química a pressão atmosférica (APCI - *Atmospheric-Pressure Chemical Ionization*) permitiu o acoplamento com HPLC, permitindo, dessa forma, a análise de uma gama maior de compostos. Contudo, as análises de biomoléculas por espectrometria de massas só foi possível a partir do desenvolvimento de técnicas de ionização brandas como MALDI (*Matrix-assisted laser desorption ionization*)²⁹ e ESI (*Electrospray ionization*)³⁰ e de analisadores de massas em sequência (MS/MS), permitindo o aumento do poder de resolução e limites de detecção, bem como a determinação de características estruturais de compostos.

Em ESI, o *electrospray* é produzido aplicando-se uma diferença de potencial, sob pressão atmosférica, a uma solução que passa através de um tubo capilar. O campo elétrico induz o acúmulo de carga na superfície do líquido localizado promovendo a formação de gotas altamente carregadas. O solvente contido nas gotas evapora com o auxílio de um gás secante causando a diminuição das mesmas e aumento da carga por unidade de volume. As gotículas carregadas tornam-se cada vez menores de modo que a densidade de carga torna-se tão alta que as moléculas carregadas são ejetadas para a fase gasosa, seguindo para o analisador de massas.³¹ Uma representação do processo de ionização por *electrospray* é apresentada na Figura 1.5. A fonte de ionização por ESI pode ser facilmente acoplada à cromatografia líquida e à eletroforese capilar uma vez que as moléculas da amostra são introduzidas em solução.

Figura 1.5 - Representação do processo de ionização por *electrospray*.

Fonte: Adaptado de GATES, P. **Electrospray ionisation (ESI)**. The University of Bristol, School of Chemistry. 2004. Disponível em: <<http://www.chm.bris.ac.uk/ms/theory/esi-ionisation.html>>. Acesso em: 10 out. 2013.³²

Em MALDI, a solução contendo os analitos desejados é saturada com uma matriz orgânica a qual deve absorver fortemente radiação de determinado comprimento de onda. A mistura é seca e o resultado é uma solução sólida depositada de cristais da matriz dopada do analito. A placa de metal, contendo essa solução e mantida a vácuo dentro do espectrômetro, é bombardeada com pulsos de laser. A irradiação pelo laser induz rápido aquecimento dos cristais pelo acúmulo de energia causado pela excitação da matriz. O rápido aquecimento causa sublimação da matriz, dessorção e expansão desta para a fase gasosa, permitindo que o analito intacto seja obtido, os quais seguirão para o analisador de massas.³³ Uma representação do processo de ionização por MALDI é apresentada na Figura 1.6.

Figura 1.6 - Representação do processo de ionização por MALDI.

Fonte: Adaptado de HENDRICKSON, C. **Matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI)**. Magnet lab. 2004. Disponível em http://www.magnet.fsu.edu/education/tutorials/tools/ionization_maldi.html. Acesso em: 10 out. 2013.³⁴

A parte fundamental de um espectrômetro de massas é o analisador de íons, pois é onde estes são separados de acordo com sua razão massa/carga (m/z). Analisadores de massa mais comumente usados incluem quadrupolo (Q), *ion trap* (IT), *orbitrap* (OT), tempo de voo (TOF) e de ressonância ciclônica de íons (FTICR - *Fourier transform ion cyclotron resonance*). Cada um deles detêm características de desempenho particulares que os torna adequado para determinada análise ou classe de compostos. Entretanto, a combinação de dois ou mais analisadores compondo equipamentos híbridos permite a conciliação de tais características, aumentando a resolução, a sensibilidade e a velocidade na obtenção dos resultados.

6 Bioinformática e Ciências ‘Ômicas’

A análise da enorme quantidade de dados obtidos com tecnologias de *high-throughput* não seria possível sem ferramentas de bioinformática adequadas. Bioinformática é definida

como o conjunto de ferramentas para armazenamento, recuperação e análise da informação derivada de computadores em um contexto biológico.³⁵ Componente essencial da era ‘ômica’, a bioinformática serve para analisar e visualizar de forma abrangente os dados obtidos e, de fato, a evolução das pesquisas nesse campo só foi possível através destas ferramentas. A bioinformática veio para facilitar o uso de computadores no sentido de organizar e analisar integradamente um grande montante de dados complexos e variados, possibilitando enfrentar o desafio de decifrar componentes importantes dentro de um universo crescente de informações.

Atualmente, os dados podem ser explorados com o uso de poderosas ferramentas de busca, acessando fontes de informação eletrônica associada e integrada. Muitas dessas ferramentas como KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*), *Ensembl Genome Browser*, METLIN, entre outros, são de domínio público e possibilitam a obtenção de informações organizadas, além de, em alguns casos, integrarem ferramentas comparativas. Para isso, os dados devem ser cuidadosamente gravados e armazenados nos bancos de dados em um formato estruturado e padronizado, o que permite o compartilhamento de vários recursos, bem como o desenvolvimento de ferramentas comuns capacitando a mescla de conjuntos de dados gerados por diferentes tecnologias.²⁸

Pode-se afirmar que nos dias de hoje não é mais possível avançar em pesquisas ‘ômicas’ sem a integração da tecnologia da informação com a tecnologia experimental. Muitos estudos estão sendo feitos simplesmente pela análise sistematizada de fontes de dados sendo as descobertas dirigidas pela informação contida nessas fontes. Um exemplo típico disso é a busca em banco de dados por sequências similares a uma sequência desconhecida e, com o auxílio de algoritmos computacionais, predizer suas possíveis identidades e funções.

Entretanto, apesar de todos os avanços nessa área, muitos problemas ainda devem ser superados. O próprio formato de organização e estruturação de dados para inclusão em bancos públicos ainda é uma dificuldade. Além disso, o entendimento da informação molecular até a célula, órgão e o sistema biológico do organismo é o maior desafio. A passagem do genótipo para o fenótipo requer ferramentas computacionais altamente robustas, o que ainda é um desafio real.

Assim, as pesquisas de bioinformática aplicada às ciências ‘ômicas’ devem avançar ainda mais. Contudo, o crescente número de profissionais e centros de bioinformática ainda não é suficiente para atender a demanda de dados obtidos e, isso segue sendo um dos gargalos neste desenvolvimento.

7 Quimiometria aplicada às Ciências ‘Ômicas’

As tecnologias analíticas de *high-throughput* (*microarrays*, LC-MS, GC-MS, LC-NMR, CE-MS) aplicadas às ciências ‘ômicas’ geram uma enorme quantidade de dados complexos. A abundância de dados em si não é uma garantia de obtenção de informações úteis sobre os principais eventos que ocorrem no sistema investigado. Pelo contrário, os dados obtidos pelas ‘ômicas’ precisam ser processados e analisados a fim de destacar as informações úteis das medidas realizadas. Uma vez que estes dados são altamente multivariados por natureza, devem ser utilizadas técnicas de análise de dados que são capazes de lidar com os desafios inerentes à quantidade de dados, presença de ruídos, colinearidades, e os dados perdidos (*missing data*). Assim, métodos quimiométricos para análise de dados multivariados tornam-se imprescindíveis na avaliação de dados das ciências *ômicas*.^{36,37}

Os dados ‘ômicos’ fornecem um novo padrão de obtenção dos resultados, o chamado paradigma p.n. Sob este novo paradigma, o número de indivíduos independentes n (amostras) é muito menor do que o número de variáveis p (por exemplo, o número de genes, proteínas ou metabólitos de um perfil de expressão). Enquanto nas definições clássicas algumas hipóteses nulas pré-especificadas são avaliadas, com dados ‘ômicos’ centenas de hipóteses devem ser confrontadas simultaneamente. Métodos estatísticos clássicos tipicamente requerem que o número de indivíduos independentes seja grande, a fim de evitar a colinearidade e *overfitting*.³⁸ No entanto, o número de indivíduos que podem ser considerados nos ensaios de *high-throughput* é muitas vezes restrito devido às limitações técnicas e econômicas do experimento. Assim, novos métodos estatísticos tiveram que ser desenvolvidos para lidar com dados ‘ômicos’.

Atualmente, existe um número considerável de técnicas quimiométricas especialmente adequadas para o estudo do complexo conjunto de dados multivariados, tanto para fins

exploratórios ou de modelagem. Em geral, tais técnicas utilizam métodos de projeção multivariada, os quais, basicamente representam as observações (amostras) como pontos projetados em um espaço n-dimensional. A abordagem de projeção pode ser adaptada a uma variedade de objetivos tais como *i*) resumo e visualização de um conjunto de dados, *ii*) classificação e análise discriminante, e *iii*) investigação de relações quantitativas entre variáveis.³⁷ Os métodos estatísticos utilizados neste contexto são principalmente PCA (*Principal Component Analysis*), SIMCA (*Soft Independent Modeling of Class Analogy*), PLS-DA (*Partial Least-Squares Discriminant Analysis*), OPLS-DA (*Orthogonal Partial Least-Squares Discriminant Analysis*) PCR (*Principal Component Regression*) e PLS (*Partial Least Squares*).³⁶ Neste trabalho, serão discutidos apenas PCA, PLS-DA e OPLS-DA.

Principal Component Analysis (PCA) constitui a base para a análise de dados multivariados.^{25,37-39} O ponto de partida para PCA é uma matriz de dados X consistindo de N linhas (observações) e K colunas (variáveis). Em estudos ‘ômicos’, as observações compreendem as amostras e as variáveis as medidas de RMN, LC-MS, CE-MS, GC-MS, etc. O objetivo da PCA é representar uma tabela de dados multivariados como um plano de baixa dimensão, que consiste geralmente de 2 a 5 dimensões, tais que uma visão global dos dados é obtida. Essa visão global pode revelar grupos de observações, tendências e *outliers*. Ela também revela as relações entre observações e variáveis, e das variáveis entre elas. Assim, podemos dizer que PCA reduz um grande número de variáveis em um número menor, as chamadas componentes principais. A primeira componente principal explica a maior variabilidade dos dados, a segunda (independente de/ortogonal à primeira) explica a segunda melhor e assim por diante. Se pensarmos no espaço de dados reduzido a um cubo, PCA se assemelha a uma ferramenta capaz de mostrar diferentes ângulos e planos do cubo os quais separam os grupos estudados (tipicamente controle e caso).²⁵ A representação gráfica do PCA é dada por *score* e *loading plots*. O *score plot* é um resumo das relações entre as observações e mostra como as observações são projetadas. Similarmente, o *loading plot* resume a tendência das variáveis; geometricamente, ele representa a direção do plano no espaço K em relação às variáveis originais.³⁹ Os dois *plots* (*score* e *loading*) são complementares e sobreponíveis, e a direção de um *plot* corresponde a mesma direção no outro. Assim, um padrão interessante visto no *score plot* pode ser interpretado olhando ao longo desta direção no *loading plot*.

Um método supervisionado (isto é, que utiliza um conjunto de dados com parâmetros conhecidos) amplamente utilizado em análises ômicas é PLS (*Partial Least Squares*).⁴⁰ Este método relaciona uma matriz de dados de observações a uma matriz de variáveis dependentes à medida que cria um modelo de regressão linear projetando as variáveis e observações para um novo espaço.⁴⁰ PLS pode também ser combinado com a análise discriminante (DA), para estudos de discriminação, resultando no método estatístico denominado PLS-DA (*Partial Least-Squares Discriminant Analysis*). PLS-DA tem sido frequentemente utilizado para problemas de classificação e discriminação, embora PLS não tenha sido originalmente projetado para esta finalidade. O objetivo deste método é encontrar um modelo que separe as observações levando em consideração as classes previamente conhecidas. Os modelos de PCA são calculados para aproximar o melhor possível as observações. Assim, PCA encontra as direções no espaço multivariado que representam as maiores fontes de variação, as chamadas componentes principais. Entretanto, não necessariamente essas direções de variações coincidem com aquelas entre as classes, e pode ser que outras direções sejam mais pertinentes para discrimina-las.^{41,42}

Outra extensão do método de regressão PLS é o OPLS-DA (*Orthogonal Partial Least-Squares Discriminant Analysis*), que integra um filtro de correção de sinal ortogonal, para promover a discriminação entre as observações. OPLS-DA foi introduzido como um aprimoramento do método PLS-DA para discriminar dois ou mais grupos usando dados multivariados. Em OPLS-DA um modelo de regressão é calculado entre os dados multivariados e uma variável resposta que contém apenas informações de classe é considerada. A vantagem quando comparada com PLS-DA é uma interpretação mais fácil dos modelos, uma vez que a informação é resumida em uma única componente preditiva para a classe, enquanto as demais componentes são descritas como variações ortogonais em relação à primeira componente de previsão.^{41,42}

A Figura 1.7 mostra o *score plot* do mesmo grupo de dados construídos com PCA, PLS-DA e OPLS-DA, respectivamente.

Figura 1.7 - *Score plot* da urina de pacientes com câncer de bexiga de (●) alto e (●) baixo risco construídos com PCA, PLS-DA e OPLS-DA.

Capítulo 2

Análise Proteômica

1 Introdução

1.1 Proteômica

O termo proteoma refere-se ao conjunto de proteínas encontrado em uma célula, tecido ou organismo quando sujeito a determinadas condições.⁴³ O estudo de um proteoma tenta descrever o conjunto completo de proteínas, produto da expressão do genoma e modificações pós-traducionais.

A análise proteômica pode ser definida como o conjunto de metodologias analíticas empregadas para caracterizar qualitativamente e quantitativamente um proteoma. Diversos estudos podem ser realizados em análises proteômicas, entre eles identificação de cada proteína de um proteoma, avaliação de expressão diferencial ou comparativa de perfis proteicos distintos, análises de modificações pós-traducionais, estudos de interação proteína-proteína, entre outros.

A complexidade de um proteoma é enorme. Enquanto o genoma humano compreende "apenas" aproximadamente 25.000 genes,³⁸ o proteoma humano é estimado abranger 100.000 proteínas, número que alcança uma ordem de magnitude maior devido às modificações pós-traducionais que as proteínas podem sofrer.³⁸ Além disso, a esta complexidade soma-se a enorme faixa dinâmica que as proteínas podem adquirir, isto é, o intervalo de concentração da maioria das proteínas menos abundantes é pequeno quando comparado com as mais abundantes, tornando a análise global de proteínas uma tarefa muito difícil. Além da complexidade da composição e do intervalo de concentração, proteínas são dinâmicas, isto é, a expressão de proteínas muda ao longo do tempo, o que aumenta a complexidade de um proteoma. Apesar disso, as proteínas são moléculas bastante afetadas quando um organismo é acometido por uma doença, e, por isso, apresentam-se como promessa na descoberta de biomarcadores.

O desenvolvimento de tecnologias e bancos de dados relacionados à análise proteômica possibilitou a identificação de inúmeras proteínas de amostras biológicas complexas até então desconhecidas. Esses avanços tornaram a análise proteômica uma ferramenta muito promissora, especialmente para a busca de biomarcadores, entretanto, elucidar proteomas inteiros ainda é uma tarefa impossível.

Uma etapa crucial em análise proteômica é o preparo de amostra. De maneira superficial, o preparo de amostra para análise proteômica compreende as etapas de extração, limpeza, separação, visualização, identificação e quantificação das proteínas presentes em uma matriz biológica. Todos esses estágios apresentam limitações e devem ser cuidadosamente otimizados. Ainda, etapas de fracionamento, depleção de proteínas abundantes, enriquecimento de proteínas e limpeza de interferentes da amostra devem ser considerados, otimizados e aplicados, se necessário.

1.2 Técnicas Analíticas para Análises Proteômicas

Como já mencionado, a análise de proteínas em amostras biológicas é um tópico desafiador da proteômica devido à complexidade dessas matrizes. Além do proteoma não ser estático, as proteínas se apresentam em grande variedade e diferentes concentrações. Diante de tal complexidade, é necessário utilizar métodos de separação analíticos robustos e que propiciem alta resolução para esses tipos de amostras. Dentre as técnicas mais utilizadas em análise proteômica destacam-se eletroforese unidimensional (1-DE ou SDS-PAGE) e bidimensional (2-DE), eletroforese em gel diferencial (2D-DIGE), cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) e eletroforese capilar acoplada à espectrometria de massas (CE-MS).

1.2.1 Eletroforese Bidimensional

A eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2-DE) é uma técnica de separação largamente utilizada para análises de misturas complexas de proteínas extraídas de células, tecidos ou outras amostras biológicas. Em teoria, 2-DE é capaz de resolver até 10.000 proteínas simultaneamente, sendo possível detectar quantidades menores que 1 ng de proteínas por *spot*.⁴⁴

A eletroforese 2-DE promove a separação das proteínas em duas dimensões, baseando-se em dois processos separativos ortogonais independentes. A primeira dimensão consiste da focalização isoeletrica (IEF), onde as proteínas são separadas de acordo com seus

pontos isoelétricos (pI). Já a segunda dimensão consiste da eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) a qual separa as proteínas de acordo com suas massas moleculares (MM). A Figura 2.1 apresenta um esquema ilustrativo das etapas da eletroforese 2-DE.

Figura 2.1 – Esquema ilustrativo das etapas da eletroforese 2-DE.

Proteínas são macromoléculas de natureza anfotérica, ou seja, apresentam características ácidas ou básicas dependendo do pH ao qual estão expostas. Portanto, em diferentes pHs elas apresentam estados de ionização distintos, adquirindo uma carga global que pode ser positiva, negativa ou neutra. Desta forma, em um gradiente de pH e sob a influência de um campo elétrico, as proteínas irão migrar até encontrarem o pH correspondente ao seu ponto isoelétrico, onde a carga efetiva é zero. Atualmente, o gradiente de pH é produzido pela técnica de gradiente de pH imobilizado (IPG) em fitas, nas quais ocorre a copolimerização de derivados de acrilamida, cuja combinação em concentrações adequadas define o intervalo e a forma do gradiente de pH produzido.⁴⁵ Assim, a focalização isoelétrica pode ser realizada em fitas de diversos comprimentos e diferentes faixas de pH.

Após a IEF, as proteínas desnaturadas são transferidas para a segunda dimensão, onde são separadas de acordo com suas massas moleculares relativas em um gel de poliacrilamida. Estes géis são formados por ligações cruzadas entre a acrilamida e a N'-N-

metilenobisacrilamida, o que faz com que a estrutura do gel seja porosa, com poros distribuídos ao longo de toda a matriz. O tamanho médio dos poros é determinado pelas porcentagens de acrilamida e bisacrilamida utilizadas, sendo que quanto maior a concentração de acrilamida, menores os poros formados na matriz. A concentração do gel é um parâmetro importante a ser determinado, uma vez que uma boa resolução depende dele.

Para que a separação na segunda dimensão dependa apenas da massa molecular das proteínas, sua carga intrínseca deve ser anulada, o que é feito pela adição de dodecil sulfato de sódio (SDS). O SDS é um agente tensoativo aniônico capaz de formar micelas em meio aquoso. Assim, o SDS desnatura as proteínas através da formação de um complexo micela-proteína (na razão 1,4 g SDS/1 g de proteína), o qual apresenta carga global negativa, fazendo com que a separação eletroforética no gel dependa basicamente da massa molecular da proteína.⁴⁵

As críticas mais incisivas com relação à eletroforese 2-DE referem-se à baixa reprodutibilidade e, em alguns casos, à baixa repetibilidade. De fato, tais parâmetros são importantes em análises proteômicas, pois a quantificação relativa se dá pela comparação dos géis. Assim, para aumentar a confiabilidade da quantificação é essencial que os géis comparados tenham boa qualidade de separação que possa ser reproduzida para todas as amostras.

Embora 2-DE apresente tais limitações e seja alvo de críticas também quanto à falta de automação e elevado tempo de análise, ela ainda permanece como uma boa técnica para resolver um grande número de proteínas de uma mistura, ao mesmo tempo em que permite acessar as mudanças no nível de expressão e a purificação de proteínas chave para posterior caracterização.

1.2.2 Eletroforese em OFFGEL

Como exposto anteriormente, a eletroforese 2-DE é uma técnica com alta resolução de separação, porém demorada e de difícil automação. Pensando nisso, a *Agilent Technologies* lançou uma tecnologia denominada *OFFGEL Fractionator*. A separação das proteínas ocorre em um sistema de duas fases; uma fase líquida, que é dividida em compartimentos e outra

fase que é a convencional fita com gradiente de pH immobilizado. Tipicamente a amostra é diluída no tampão de focalização e alocada nos compartimentos, sobre a fita com gradiente de pH immobilizado. Como não há conexões fluídicas entre os poços, as proteínas são forçadas a migrar através do gel para o compartimento contendo a faixa de pH próxima a seu pI, como mostra o esquema da Figura 2.2. O equipamento promove então a focalização isoeletrica e permite que as frações sejam recuperadas em fase líquida.⁴⁶

Figura 2.2 – (A) Equipamento OFFGEL (*Agilent Technologies*) e (B) esquema do seu processo de fracionamento das proteínas.

Fonte: Adaptado de PRECKEL, T. **Novel prefractionation technology enables more protein identifications**. Agilent Technologies. Disponível em: http://www.chem.agilent.com/cag/Pharmanews/Pharma18/newsletter.asp?page=PN_18_F4_OFFGEL.html Acesso em: 21 nov. 2013.⁴⁷

1.2.3 Espectrometria de Massas Aplicada à Análises Proteômica

Como mencionado anteriormente, a espectrometria de massas (MS) é uma técnica essencial para análise das ‘ômicas’. Ainda, o desenvolvimento de métodos de ionização brando como MALDI e ESI impulsionou o avanço do conhecimento em proteômica.

A MS fornece não somente um perfil proteico de células, tecidos ou organismos quali e quantitativamente, mas também é capaz de identificar proteínas e caracterizar modificações pós-traducionais.

As plataformas MALDI-TOF e ESI-MS/MS são as mais amplamente utilizadas em análises proteômicas. Comumente, métodos de separação baseados em gel (realizados anteriormente às análises de MS) utilizando a abordagem *bottom-up*, a qual será discutida a seguir, fazem uso de MALDI-TOF. Já a outra plataforma, ESI-MS/MS, é bastante utilizada em métodos *gel free* utilizando a abordagem *top-down*. Porém, esse tipo de plataforma é acoplada a um equipamento de cromatografia líquida (LC), permitindo a separação, ionização e análise das proteínas de interesse *on-line*. O acoplamento de LC com ionização ESI é compatível com diversos analisadores de massa tais como LTQ, qTOF, LTQ-orbitrap, LTQ-FTICR. Um recente avanço relacionado ao acoplamento LC-ESI-MS/MS trata-se do uso de colunas capilares, com diâmetro interno na faixa de 50-100 μm , para separação de proteínas e peptídeos. Com estas colunas são empregadas vazões de fase móvel entre 100 e 500 nL min^{-1} , o que caracteriza um sistema *nanoflow*. Ainda, o volume de amostra empregado em um sistema *nanoflow* é da faixa de 1-10 μL .

1.3 Estratégias Analíticas para Análises Proteômicas: *Bottom-up* e *Top-down*

Basicamente, existem duas abordagens em análises proteômicas com relação à estratégia empregada para analisar proteínas por espectrometria de massas, *bottom-up* e *top-down*. A abordagem *bottom-up* requer que as proteínas sejam isoladas e submetidas a um tratamento com uma protease (normalmente tripsina) para fragmenta-las em peptídeos, os quais são analisados por MS. Na abordagem *top-down*, as proteínas são identificadas por MS diretamente, sem a digestão proteolítica anterior ou outro tratamento químico.

Bottom-up é a estratégia mais comumente utilizada em estudos proteômicos e, em geral, envolve a separação da mistura de proteínas por eletroforese 2-DE, seguida de digestão proteolítica e análise por MS. O espectro de massas dos peptídeos oriundos da digestão indicam a relação m/z e, consequentemente, a massa molecular dos peptídeos. Esta metodologia é chamada *peptide mass fingerprinting* (PMF) e, juntamente com o espectro de fragmentação de peptídeos obtidos em *tandem*, permite uma identificação confiável das proteínas.²⁰ Ao final do processo, os resultados inerentes a MM dos peptídeos, obtida a partir do PMF, bem como a informação da sequência de aminoácidos dos peptídeos contida nos espectros de fragmentação (MS/MS) são usados pelos *softwares* de busca para encontrar proteínas semelhantes nos bancos de dados. *Bottom-up* apresenta a vantagem de apresentar resultados satisfatórios em espectrômetros de massas relativamente simples e de baixo custo. Entretanto, tal abordagem apresenta desvantagens como: *i*) baixa cobertura da sequência de aminoácidos (dependendo da amostra)⁴⁸ *ii*) não detecção de peptídeos muito pequenos (MM inferior a 500 Da) ou muito grandes (MM superior a 5000 Da) e *iii*) limitações de informações relativas à modificações pós-traducionais.

Na abordagem *top-down* a MM da proteína deve ser determinada com grande precisão e posteriormente, realizam-se estágios de fragmentação da proteína proporcionando a identificação de pequenos trechos de sequência que permitem a identificação da proteína. Nessa abordagem a cobertura da sequência é total.⁴⁹ No entanto, essa estratégia requer o uso de espectrômetros de massas de altíssima resolução e precisão de massa e, consequentemente, elevado custo. Além disso, a identificação absoluta de proteínas é mais difícil via *top-down* e os métodos ainda não estão bem consolidados.

Assim, o altíssimo custo dos equipamentos bem como a complexidade na identificação absoluta das proteínas faz com que a abordagem mais tradicional (*bottom-up*) continue sendo a mais utilizada apesar das limitações que a mesma apresenta.

1.4 Análise Proteômica Aplicada ao Câncer de Bexiga

A análise proteômica de urina não é uma prática recente uma vez que esta matriz sempre foi alvo de biomarcadores por sua natureza não invasiva e facilidade de acesso. Um

dos primeiros trabalhos data de 1979 e descreve o proteoma urinário humano de indivíduos adultos normais, conforme descrição dos autores, utilizando eletroforese 2-DE.⁵⁰ Os autores comparam o mapa proteômico da urina com o de plasma na tentativa de encontrar proteínas similares e, a seguir, a identificação é feita por co-eletroforese e imunoquímica. Desde então, diversos trabalhos com variadas técnicas analíticas aplicadas a estudos proteômicos em urina foram realizados.

As proteínas da urina incluem na sua maioria proteínas solúveis presentes na faixa de pH de 3 a 9, com maior predominância em pHs ácidos, e na faixa de massa molecular entre 7 e 67 kDa.^{20,51} As proteínas solúveis da urina são derivadas em grande parte da filtração glomerular, a qual retarda a passagem de proteínas de elevado peso molecular. No entanto, proteínas que são abundantes no plasma sanguíneo, tais como a albumina e várias globulinas podem passar o filtro glomerular em elevada concentração.²⁰ Além disso, peptídeos e pequenas proteínas (10 kDa) passam livremente através do glomérulo. Assim, muitas proteínas presentes na urina são provenientes do plasma sanguíneo. Algumas das proteínas da urina originam como proteínas ligadas a membrana que são proteoliticamente clivadas.²⁰ Uma dessas é a proteína Tamm-Horsfall (uromodulina), uma proteína urinária abundante que é secretada por um segmento de néfrons chamada de alça de Henle. Outras proteínas abundantes na urina são albumina e transferrina.

Análises proteômicas aplicadas ao câncer de bexiga são mais recentes e envolvem não apenas diferentes técnicas analíticas, como também diferentes matrizes e abordagens de estudo. Com relação às abordagens utilizadas em estudos proteômicos, alguns trabalhos empregaram *target* baseando-se em trabalhos anteriores,⁵²⁻⁵⁵ entretanto, a maior parte dos trabalhos aplicam a abordagem *untarget*, buscando por qualquer proteína (ou grupo de proteínas) diferencialmente expressos entre controle e doente.^{2,56-62} Quanto às matrizes empregadas em análises proteômicas de câncer de bexiga, destacam-se linhagens celulares,^{2,63-66} tecido,^{52,55,57-71} soro^{59,60} e urina.^{3,53,54,56,58,61,72}

Diversas técnicas analíticas foram utilizadas em estudos proteômicos de câncer de bexiga, tais como *western blotting*,^{55,50} eletroforese 1-DE⁵⁸ e 2-DE,^{52,56,57,60,63,64,67} cromatografia de afinidade,⁷³ LC-MS/MS,^{2,58,73-75} MALDI-TOF,^{59,2,72,76} iTRAQ,^{3, 62} 2D-DIGE^{72,77,78} e SILAC.⁶⁶

A maior parte dos trabalhos envolvendo câncer de bexiga busca por biomarcadores proteicos para a doença. Muitos deles obtiveram resultados positivos e apontaram algumas proteínas como potenciais biomarcadores para o diagnóstico, entre eles calreticulina,^{55,79} γ -sinucleína,⁵⁴ catechol-o-metiltransferase,⁵⁴ resistina,⁵⁸ subunidade α -GsGTP,^{58,80} entre outras.

2 Objetivos

Objetivos Gerais

O objetivo geral do trabalho descrito nesse capítulo foi buscar por proteínas diferencialmente expressas em urina que poderiam ser apontadas como potenciais biomarcadores para o diagnóstico de câncer de bexiga.

Objetivos Específicos

- ✓ Análise comparativa do perfil proteico de urina de pacientes com câncer de bexiga *versus* indivíduos controle utilizando eletroforese em gel bidimensional e análises quimiométricas;
- ✓ Análise comparativa do perfil proteico de urina de pacientes com câncer de bexiga e indivíduos controle utilizando eletroforese em OFFGEL e análises quimiométricas;
- ✓ Identificação das proteínas de interesse utilizando LC-ESI-MS/MS;

3 Materiais e Métodos

3.1 Amostras Biológicas

Amostras da primeira urina da manhã foram coletadas de 15 pacientes diagnosticados com câncer de bexiga urotelial no Hospital AC Camargo em São Paulo durante 2009-2013. Da mesma forma, 15 indivíduos controle, sem patologias do trato gênito urinário, tiveram a primeira urina da manhã coletadas no mesmo hospital. As amostras de pacientes foram coletadas antes de receberem qualquer tratamento. Os pacientes foram diagnosticados com câncer de bexiga de baixo grau do tipo Ta/G1/2 por um patologista especialista de acordo com a classificação da Organização Mundial da Saúde - Sociedade Internacional de Patologistas Urológicos (*World Health Organisation - International Society of Urological Pathology*, WHO - ISUP) de 2004.⁸¹ Os pacientes com o tumor incluíram 9 homens e 6 mulheres entre 63 e 87 anos, enquanto os indivíduos controle compreenderam 8 homens e 7 mulheres entre 60 e 81 anos. Todas as análises proteômicas foram realizadas em triplicatas com um *pool* de amostras (mistura de volumes iguais de todas as amostras) de indivíduos controle e doentes, separadamente.

3.2 Extração de Proteínas

Para a otimização do preparo de amostra de urina foi utilizado apenas o *pool* com de indivíduos controle. Foram testados três metodologias para extração das proteínas da urina conforme descrito a seguir. Após a extração, a quantificação das proteínas foi realizada pelo ensaio de Bradford, utilizando BSA (*Bovine Serum Albumin*) para a construção da curva de calibração.

3.2.1 Acetona

Dez mililitros do *pool* de urina contendo inibidor de proteases foram previamente centrifugados a 13.000 rpm à 4 °C por 15 min. O sobrenadante foi recolhido e precipitado com 9 mL de acetona PA gelada. A amostra foi incubada a -20 °C *overnight* e depois centrifugada a 13.000 rpm, 4 °C por 30 min. O sobrenadante foi descartado, o precipitado

seco, ressuspendido em água ultrapura e dialisado contra água por 48 h. Após a diálise, a amostra foi liofilizada e ressuspendida em solução de reidratação (7 mol L⁻¹ ureia, 2 mol L⁻¹ tioureia e 4% CHAPS).

3.2.2 Etanol

Dez mililitros do *pool* de urina contendo inibidor de proteases foram previamente centrifugados a 13.000 rpm à 4 °C por 15 min. O sobrenadante foi recolhido e precipitado com 9 mL de etanol 100% gelado. A amostra foi incubada a -20 °C *overnight* e depois centrifugada a 13.000 rpm, 4 °C por 30 min. O sobrenadante foi descartado, o precipitado seco, ressuspendido em água ultrapura e dialisado contra água por 48 h. Após a diálise, a amostra foi liofilizada e ressuspendida em solução de reidratação (7 mol L⁻¹ ureia, 2 mol L⁻¹ tioureia e 4% CHAPS).

3.2.3 Ácido Tricloroacético (TCA)

TCA 100% foi adicionado a 10 mL do *pool* de urina previamente centrifugada a 13.000 rpm à 4 °C por 15 min e contendo inibidor de proteases de forma a obter-se a concentração final de 10%. A amostra foi incubada à 4 °C *overnight* e depois centrifugada a 13.000 rpm, 4 °C por 30 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com acetona gelada três vezes. A seguir, o precipitado seco foi ressuspendido em água ultrapura, liofilizado e ressuspendido em solução de reidratação (7 mol L⁻¹ ureia, 2 mol L⁻¹ tioureia e 4% CHAPS).

3.3 Separação de Proteínas por Eletroforese 1-DE e 2-DE

Os métodos de extração foram avaliados por 1-DE utilizando-se gel de poliacrilamida 12% ao qual foi aplicada uma corrente inicial de 10 mA/gel por 20 min, seguida de aumento da corrente para 15 mA/gel até o final da corrida. O gel foi corado com *Comassie Brilliant*

Blue R-250 e avaliado no *software ImageMaster 2D Platinum v. 7.0 (GE Healthcare)*. Os melhores métodos de extração foram selecionados e submetidos à eletroforese 2-DE.

Para a eletroforese 2-DE, amostras contendo 150 µg de proteínas da urina foram diluídas em solução de reidratação (7 mol L⁻¹ ureia, 2 mol L⁻¹ tiourea e 4% CHAPS, IPGPhor 3-10, DTT) e reidratadas passivamente *overnight* em fitas de 13 cm com gradiente de pH imobilizado na faixa de pH 3-10 (*Immobiline Drystrips, GE Healthcare*). As fitas foram então aplicadas no equipamento *Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare)* para que a focalização isoeletrica procedesse, segundo o protocolo descrito na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 – Condições de focalização isoeletrica para fitas de 13 cm pH 3-10

<i>Etapa</i>	<i>Voltagem (V)</i>	<i>Duração (h)</i>	<i>Rampa</i>
1	50	12	Aumento rápido
2	500	1	Aumento linear
3	1000	1	Aumento linear
4	8000	1	Aumento linear
5	8000	3	Aumento linear

Após a focalização, as fitas foram equilibradas em solução de equilíbrio (Tris HCl 50 mmol L⁻¹, pH 8,8, ureia 6 mol L⁻¹, glicerol 20%, SDS 2%) contendo 2% ditioneitol (DTT) e agitadas durante 15 min, seguida da mesma solução contendo 2,5% iodoacetamida (IAA) por 15 min. As fitas equilibradas foram então aplicadas em um gel de poliacilamida 12% com corrente inicial de 15 mA/gel por 20 min, seguida de aumento da corrente para 25 mA/gel até o final da corrida. Os géis foram corados com *Comassie Brilliant Blue R-250* ou nitrato de prata e a seguir avaliados com o *software ImageMaster 2D Platinum v. 7.0 (GE Healthcare)*.

3.4 Análise Estatística

Após serem avaliados pelo software *ImageMaster 2D Platinum* v. 7.0 (*GE Healthcare*) com relação ao número de *spots* e ao *matching*, os resultados foram exportados e avaliados no software *SIMCA-P (Umetrics)*. Nele foram construídos modelos de PCA, a partir do qual foi possível obter as proteínas diferencialmente expressas e estatisticamente válidas entre os grupos utilizando-se i) *t-test* (com $p < 0,05$), e ii) *Jack knife*.

3.5 Depleção de Albumina

A depleção da albumina foi realizada com o kit *Qproteome Albumin/IgG Depletion* (Qiagen) conforme protocolo fornecido pelo fabricante. Extratos de proteínas da urina diluídos em solução de reidratação (7 mol L^{-1} ureia, 2 mol L^{-1} tiourea e 4% CHAPS) foram aplicados às colunas previamente equilibradas com o mesmo tampão de diluição da amostra. As colunas foram então incubadas por 15 min em temperatura ambiente e a solução coletada por centrifugação a 500 g por 10 s. A seguir a coluna foi lavada com o tampão de diluição para recolher toda solução de proteína. Para a obtenção da fração retida na coluna, esta foi lavada com tampão contendo 50 mmol L^{-1} tris, 7 mol L^{-1} ureia, 2 mol L^{-1} tiourea e 4% CHAPS).

3.6 Análises no OFFGEL

As análises no equipamento *Agilent 2100 OFFGEL Fractionator* (*Agilent Technologies*) foram realizadas conforme protocolo do fabricante. A amostra foi distribuída nos reservatórios sobre a fita de 13 cm com gradiente de pH imobilizado na faixa de pH 3-10 (*Immobiline Drystrips, GE Healthcare*). A seguir, as amostras foram submetidas à focalização isoeletrica por 24 h, segundo protocolo fornecido pelo equipamento.

3.7 Digestão de Proteínas

3.7.1 Digestão de Proteínas em Gel

Os *spots* diferencialmente expressos e estatisticamente válidos foram excisados do gel manualmente e transferidos para microtubos individuais. Cada *spot* foi lavado com 500 μL de água ultrapura por 3 vezes durante 15 min cada à temperatura ambiente e sob agitação suave. Em seguida, a prata presente nas manchas foi removida com uma solução contendo 50 mmol L^{-1} de tiosulfato de sódio e 15 mmol L^{-1} de ferricianeto de potássio, durante 5 min à temperatura ambiente e sob agitação. Os pedaços de géis foram lavados com 500 μL de água ultrapura por 3 vezes durante 15 min cada à temperatura ambiente e sob agitação suave. Em seguida, os pedaços de géis foram equilibrados com 500 μL de tampão bicarbonato de amônio aquoso 100 mmol L^{-1} por 20 min, seguido por uma lavagem com 50 mmol L^{-1} de bicarbonato de amônio contendo 50% (v/v) de acetonitrila (ACN). Os géis excisados foram então desidratados com ACN, secos e finalmente reidratados com 20 ng μL^{-1} de tripsina dissolvida em bicarbonato de amônio 50 mmol L^{-1} . Após uma hora, os tubos com os *spots* e a tripsina foram incubados a 37 °C *overnight*. Após a incubação, os sobrenadantes foram transferidos para outros tubos e o restante dos peptídeos foram extraídos a partir dos géis primeiramente com uma solução feita com 5% (v/v) ácido fórmico em água e, a seguir, 5% (v/v) ácido fórmico em ACN 50%. As soluções de peptídeos foram secas em *speed vac* e os tubos armazenados a -80 °C para posterior análise de MS.

3.7.2. Digestão de Proteínas em Solução

A digestão em solução foi realizada para as frações recolhidas das análises de OFFGEL. Inicialmente, a cada fração foi adicionada ureia 8 mol L^{-1} . A seguir, as frações foram reduzidas adicionando-se DTT na concentração final de 5 mmol L^{-1} e incubado essa solução a 56 °C por 25 min. Posteriormente, adicionou-se IAA na concentração final de 14 mmol L^{-1} e incubou-se a solução a temperatura ambiente por 30 min para promover a alquilação das proteínas. Novamente adicionou-se DTT na concentração final de 5 mmol L^{-1} e incubou-se a solução a temperatura ambiente por 15 min. As frações foram então diluídas com 50 mmol L^{-1} na proporção 1:5 para reduzir a concentração da ureia. A seguir, adicionou-

se CaCl_2 na concentração final de 1 mmol L^{-1} e tripsina $20 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ solubilizada em bicarbonato de amônio 50 mmol L^{-1} . As frações foram então incubadas a 37°C *overnight*. Após a incubação com tripsina a reação enzimática foi parada pela adição de TFA na concentração final de 0,4% (v/v). As frações foram então centrifugadas a 2.500 g por 10 min em temperatura ambiente e o *pellet* foi descartado. Finalmente, as amostras foram dessanilizadas utilizando colunas C18 (*TopTip, Glygen, Columbia, MD*) e armazenados a -20°C para posterior análise de MS.

3.8 Análise dos Peptídeos por LC-MS/MS

Os peptídeos digeridos foram submetidos às análises por LC-MS utilizando um sistema nano-LC (*EASY-nLC II, Thermo Scientific*), acoplado *online* a um espectrômetro de massas híbrido *ion trap linear-Orbitrap* (*LTQ Orbitrap Velos, Thermo Scientific*) através de uma fonte de íons *nanospray Nano-Flex II nanospray* (*Thermo Scientific*). As fases móveis utilizadas foram: A) 0,1% de ácido fórmico em água e B) 0,1% de ácido fórmico em ACN. Após o equilíbrio da coluna com 95% de solvente A e 5% de solvente B, as amostras contendo 0,1% de ácido fórmico foram injetadas ($10 \mu\text{L min}^{-1}$, 4 min) em uma pré-coluna (C18, $100 \mu\text{m DI} \times 2 \text{ cm}$, *Thermo Scientific*) e, em seguida, eluídas sob vazão de 300 nL min^{-1} através de um gradiente de eluição para uma coluna C18 ($10 \text{ cm} \times 75 \mu\text{m DI}$, $3 \mu\text{m}$, $120 \text{ \AA}$, *Thermo Scientific*). O gradiente utilizado foi: isocrático a 5% B, 0-5 min; 5% a 35% B, 5-65 min; 35-90% B, 65-80 min e isocrático a 5% B, 80-90 min. O tempo total de análise, desde o equilíbrio da coluna até a análise, foi aproximadamente 105 min. Todos os dados de LC-MS/MS foram adquiridos utilizando o *software XCalibur*, versão 2.0.7 (*Thermo Fisher Scientific*). As análises foram feitas no modo *scan* no intervalo de $400\text{-}2000 \text{ m/z}$; modo positivo; tensão do capilar de 4500 V ; nebulizador a $8,0 \text{ psi}$; gás secante a uma vazão de $5,0 \text{ L min}^{-1}$ e temperatura para evaporação do *spray* de 220°C .

3.9 Análise dos Dados

Os dados exportados do equipamento (*raw data*) foram processados e analisados utilizando o *software Proteome Discoverer 1.3* (*Thermo Scientific*), SEQUEST frente ao

banco de dados *Uniprot-Human* (Feb 25, 2012 *version*, 81,213 *protein sequences*). Foram utilizados os seguintes parâmetros para a busca: tripsina como enzima de digestão; duas clivagens perdidas permitidas; carbamidometilação de cisteína como modificação fixa e oxidação de metionina como modificação variável; tolerância dos íons precursores ajustada para 10 ppm; tolerância para fragmento de massa ajustado para 0,8 Da para espectros de baixa resolução e 0,05 Da para espectros de alta resolução.⁸²

4 Resultados e Discussão

4.1 Padronização do Preparo de Amostra de Urina para Análise Proteômica

Conforme já mencionado, uma etapa crucial em análise proteômica é o preparo de amostra, pois esta influencia no número e qualidade das proteínas observadas posteriormente. Por isso, foram testados três métodos diferentes de extração comumente empregados em urina, os quais foram quantificados pelo método de Bradford e a seguir avaliados por eletroforese 1-DE. A Tabela 2.2 mostra os valores de concentração obtidos a partir do *pool* de amostras de indivíduos controle com cada método de precipitação, enquanto a Figura 2.3 mostra o perfil destes em um gel de eletroforese 1-DE.

Tabela 2.2 - Concentração e eficiência de extração de proteínas totais obtidas a partir do *pool* de amostras de indivíduos controle por diferentes métodos de extração utilizando o ensaio de Bradford

<i>Método de Extração</i>	<i>Concentração ($\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$)</i>	<i>Eficiência de extração*</i>
Acetona	$0,889 \pm 0,023$	96%
Etanol	$1,272 \pm 0,014$	67%
TCA	$0,184 \pm 0,027$	21%

*A eficiência de extração foi calculada como a razão entre a concentração da proteína antes e após o procedimento

Os métodos de extração de proteínas utilizando apenas precipitação com solventes foram escolhidos porque as proteínas estão diretamente solubilizadas na urina, não havendo necessidade de lise de células ou organelas celulares. A Tabela 2.2 mostra que a precipitação com TCA rendeu a menor concentração ($0,184 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) enquanto a precipitação com etanol rendeu a maior concentração de proteínas totais ($1,272 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$). Uma possível causa para a menor concentração obtida com TCA é o fato de que proteínas precipitadas com esse ácido são de difícil solubilização.^{83,84} A causa disso, bem como do mecanismo de precipitação de proteínas por TCA, é pouco conhecido, mas uma explicação plausível é que o ácido interage com as proteínas induzindo um aumento na hidrofobicidade das mesmas o que pode levar a agregação por meio de interações hidrofóbicas.⁸⁵

Figura 2.3 - Perfil eletroforético do *pool* de amostras de indivíduos controle obtidos por diferentes métodos de extração, utilizando as condições eletroforéticas descritas no item 3.3.

O perfil de 1-DE do *pool* de amostras para cada método de extração revelou perfis semelhantes para todos eles. Em vista disso e da menor concentração de proteínas totais obtidas com o TCA, foram escolhidos apenas os protocolos utilizando acetona e etanol para serem testados com a técnica de eletroforese 2-DE. Na Figura 2.4 são exibidos os géis de 2-DE obtidos com ambos os métodos de extração.

Figura 2.4 – Géis 2-DE do *pool* de amostras de indivíduos controle obtidos com precipitação com (A) acetona e (B) etanol, utilizando 150 µg de proteínas e condições eletroforéticas descritas no item 3.3.

O *software Image Master 2D Platinum (GE Healthacare)* foi usado para analisar os *spots* de proteínas entre os géis de diferentes protocolos. Os *spots* foram detectados como “*spots* verdadeiros” utilizando o seguinte critério: área mínima de 5 *pixels*, fator *smooth* de 2,0 e saliência de 2,0. Com esse critério de detecção foram obtidos 332 *spots* para o gel preparado a partir da extração com acetona e 197 *spots* para o gel preparado a partir da extração com etanol. O resultado de *spot matching* entre os géis com os dois protocolos de extração foi de 56%, o que indica a similaridade nas propriedades físico-químicas das proteínas isoladas por esses métodos.

O método de extração escolhido para dar continuidade ao trabalho foi a precipitação com acetona, devido ao maior número de *spots* visualizados no gel. Esse resultado está de acordo com diversos trabalhos que recomendam a precipitação com acetona como método de escolha para análises do proteoma urinário.⁸⁶⁻⁸⁸

Em geral, o número de *spots* encontrado em um proteoma varia bastante quando diferentes estudos são comparados. Isso ocorre porque são utilizados diferentes métodos de extração, critérios de detecção de “*spots* verdadeiros” e corantes para a visualização dos *spots*. Nesse trabalho foi utilizada a coloração com nitrato de prata para visualização dos *spots* nos géis, entretanto corantes como *Coomassie Blue*, *SYPRO Ruby* e *Deep Purple*, podem ser utilizados e revelar diferentes números de *spots*. Isso é claramente demonstrado na Figura 2.5 onde é apresentado o mesmo gel do *pool* de indivíduos controle precipitadas com acetona e corado com *Coomassie Blue* e nitrato de prata, respectivamente.

O gel corado com *Coomassie* apresentou poucos *spots* visíveis, tornando evidente a melhora no número de *spots* do mesmo gel corado com nitrato de prata. *Coomassie* é menos sensível que a coloração por nitrato de prata, exigindo, uma maior quantidade de amostra para que as proteínas sejam devidamente visualizadas. Entretanto, como como concentrações de proteínas superiores a 150 µg não permitiram uma focalização adequada dos géis e a quantidade de amostra era uma limitação, resolveu-se utilizar uma concentração de 150 µg e corar os géis com nitrato de prata.

Figura 2.5 – Comparação do mesmo gel do *pool* de indivíduos controle precipitadas com acetona e corado com (A) *Coomassie Blue* e (B) nitrato de prata, utilizando 150 µg de proteínas e condições eletroforéticas descritas no item 3.3.

Escolhido o método de extração das proteínas da urina e o tipo de coloração dos géis bidimensionais, o próximo passo foi avaliar a remoção da proteína albumina. A albumina é uma proteína abundante da urina e, portanto, sua presença pode mascarar outras proteínas menos abundantes. Dessa forma, a remoção da albumina deve ser realizada para se avaliar se outras proteínas ficam ocultas na sua presença. Entretanto, deve ser ponderado que outras proteínas que não a albumina podem ser perdidas nessa etapa, inclusive por associação à ela. Foi escolhido para realizar a remoção o método por colunas de afinidade, o qual utiliza uma resina com anticorpos monoclonais que se ligam a albumina. A Figura 2.6 mostra um gel 1-DE para o *pool* de amostras de indivíduos controle antes e após a remoção e da fração retida na coluna.

Figura 2.6 – Gel 1-DE para o *pool* de amostras de indivíduos controle antes e após a remoção da albumina e da fração retida na coluna, utilizando as condições eletroforéticas descritas no item 3.3.

Nota-se que a intensidade da banda referente à albumina aproximadamente em 66,0 kDa perdeu intensidade na amostra esgotada (*depleted*) com relação à amostra não esgotada, enquanto outras bandas abaixo desse tamanho foram intensificadas. No entanto, além da banda da albumina, diversas outras bandas foram visualizadas na fração retida na coluna, nomeada na figura de albumina. Isso fica ainda mais evidente quando as amostras foram submetidas à eletroforese 2-DE, como mostrado na Figura 2.7.

Figura 2.7 – Géis 2-DE do *pool* de indivíduos (A) antes, (B) após a remoção da albumina e (C) da fração retida na coluna, utilizando 150 µg de proteínas e condições eletroforéticas descritas no item 3.3.

O gel após o esgotamento ou remoção da albumina apresentou apenas 119 *spots*, enquanto o gel sem o tratamento apresentou 332 *spots*. Entretanto, o gel da fração retida da coluna que deveria apresentar “somente” albumina e IgG, apresentou diversas outras proteínas, totalizando 193 *spots*. Observou-se que a soma do número de *spots* obtidos com os géis após a depleção e da fração retida na coluna totalizou 312 *spots*, um número bastante aproximado daquele obtido com o gel antes da remoção. Além disso, as análises de *spot matching* resultaram uma porcentagem de *matching* de 57% para o gel após a depleção e da fração retida na coluna e de 43% para o gel da fração retida na coluna. Assim, praticamente todos os *spots* de cada um dos géis estão relacionados com o gel da amostra original. Em vista disso, optou-se por não realizar a depleção das amostras, uma vez que esta não foi seletiva e que muitas proteínas estavam sendo perdidas nessa etapa. Os resultados encontrados nesse trabalho com relação à falta de eficiência na remoção da albumina estão de acordo com outros estudos.^{87,89,90} Suzuki *et al.*⁸⁹ utilizaram em seu trabalho quatro abordagens distintas para remoção da albumina, incluindo aquela utilizada neste trabalho (Qiagen, *Qproteome albumin/IgG depletion kit*), e não obtiveram sucesso com nenhuma delas. Magistroni *et al.*⁸⁷, relataram a falta de especificidade de kits comerciais para depleção de albumina e imunoglobulinas. Ainda, Afkarian *et al.*⁹⁰ descreveram que a remoção de albumina e IgG não aumentou o número de proteínas identificadas ou aprofundou a cobertura do proteoma da urina tanto de indivíduos saudáveis quanto de pacientes com diabetes. Portanto, a remoção de proteínas majoritárias em amostras biológicas permanece um desafio e ainda requer atenção por parte dos pesquisadores, e é uma oportunidade de pesquisa para bioanalíticos.

4.2 Análises de Indivíduos Controle vs. Pacientes com Câncer de Bexiga

Para a avaliação de proteínas diferencialmente expressas entre indivíduos controle e pacientes com câncer de bexiga foram utilizadas duas abordagens, a eletroforese 2-DE e análises por OFFGEL. Porém, antes de qualquer análise proteômica, o *pool* de amostras de ambas as amostras foi quantificado pelo método de Bradford, conforme mostrado na Tabela 2.3.

Tabela 2.3 - Concentração de proteínas totais obtidas a partir do *pool* de amostras de indivíduos controle e pacientes com câncer de bexiga

<i>Amostra</i>	<i>Concentração ($\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$)</i>
Controle	$0,889 \pm 0,023$
Paciente	$17,08 \pm 0,06$

Como a concentração de proteínas dos pacientes com o tumor foi cerca de 20 vezes maior que aquela obtida para os indivíduos controle foi feito um gel 1-DE (Figura 2.8) para confirmar essa tendência. Para isso, foram utilizadas amostras dos pacientes sem diluição e com diluição, sendo que a diluída possuía a mesma concentração da amostra controle.

Figura 2.8 – Gel 1-DE para comparação de *pool* de amostras de indivíduos controle, pacientes com câncer de bexiga sem diluição e pacientes com câncer de bexiga com diluição de 20 vezes. As condições eletroforéticas utilizadas foram descritas no item 3.3.

Verificamos na Figura 2.8 que o *pool* de amostras de indivíduos controle e de doentes diluído na mesma concentração estão coerentes e que o *pool* dos pacientes com o tumor está

bastante concentrado, a considerar principalmente pelas bandas em 66,0 e 14,4 kDa, conforme valores de concentração encontrados pelo método de Bradford. Dessa forma, procedeu-se com as análises proteômicas por eletroforese 2-DE e OFFGEL.

Na Figura 2.9 são exibidos os géis de eletroforese 2-DE para indivíduos controle e doentes. Nota-se um perfil bastante distinto para as amostras com relação ao número de *spots* (332 para controle e 168 para doentes), intensidade e distribuição dos mesmos. As análises de *spot matching* resultaram em uma porcentagem de *matching* entre os géis de 25%.

Figura 2.9 – Géis de eletroforese 2-DE do *pool* de amostras de (A) indivíduos controle e (B) pacientes com câncer de bexiga, utilizando 150 µg de proteínas e condições eletroforéticas descritas no item 3.3.

O gel de indivíduos controle (Figura 2.9 - A) mostra uma predominância de *spots* na região de pH entre 4,0 e 8,0; enquanto o gel de doentes (Figura 2.9 - B) exibe poucos *spots* os quais se concentram na faixa de pH ente 7,0 e 10,0.

Com o intuito de avaliar quais desses *spots* são mais importantes e estatisticamente significativos na separação das classes (controle vs. doente), construiu-se um modelo em PCA utilizando os valores de *ratio* atribuídos pelo *software Image Master 2D Platinum* para as replicatas de cada um dos grupos, o qual é mostrado na Figura 2.10. O modelo foi capaz de

separar as classes com um valor de R^2 de 0,983, como era esperado uma vez que as amostras (C1, C2, C3 ou D1, D2, D3) são replicatas do *pool* de indivíduos de sua classe. Portanto, em um mesmo grupo (controle ou doente) a variabilidade entre indivíduos é minimizada, restando apenas a variabilidade da técnica e do preparo de amostra. Assim, não houve a necessidade do uso de um método estatístico supervisionado para a separação das classes.

Figura 2.10 – (A) *Score* e (B) *loading plot* do modelo construído com PCA a partir dos dados obtidos por eletroforese 2-DE para comparação de indivíduos controle (●C) e doentes com câncer de bexiga (●D). $R^2 = 0,983$; $Q^2 = 0,960$. ● Variáveis de ambas as classes.

O *loading plot* apresentado na Figura 2.10 B permitiu distinguir quais as variáveis têm mais importância na separação dos grupos, as quais estão localizadas nas extremidades do gráfico. Assim, considerando-se $p < 0,05$, foram encontrados 216 *spots* estatisticamente significativos e que mais contribuem para a separação das classes. Desses foram escolhidos 96 *spots*, com base na sua intensidade, para serem analisados por MS.

Alternativamente à eletroforese 2-DE, foi utilizada a focalização das proteínas por OFFGEL seguida de digestão destas frações com tripsina e análises por LC-MS. A Figura 2.11 mostra os cromatogramas das mesmas frações de controle e doente após a focalização.

Figura 2.11 – Cromatogramas das frações (A) CF5 (controle - fração 5) e (B) DF5 (doente - fração 5) após focalização no OFFGEL. As condições cromatográficas utilizadas foram descritas no item 3.8.

A partir dos cromatogramas obtidos para cada fração isolada no OFFGEL foi realizado o tratamento dos dados utilizando a plataforma da *Agilent Technologies* para desconvolução, alinhamento e obtenção das massas diferencialmente expressas. Com esses dados foram construídos modelos em PCA (Figura 2.12) para avaliar a separação dos grupos e quais variáveis implicam em tal separação.

Figura 2.12 – (A) *Score* e (B) *loading plot* do modelo construído com PCA a partir dos dados obtidos por OFFGEL e LC-MS para comparação das frações de indivíduos controle (●CF) e doentes com câncer de bexiga (●DF). $R^2 = 0,997$; $Q^2 = 0,513$.
● Variáveis de ambas as classes.

A maior parte dos *spots* recortados dos géis e analisados por MS não tiveram sua identidade proteica identificada. Uma das causas disso pode ser o fato da presença de prata residual nos *spots*, uma vez que os géis foram corados com nitrato de prata e esta interfere nas análises por MS. Além disso, pode ter ocorrido reticulações nas proteínas devido à formação de pontes de metileno entre cadeias laterais reativas de alguns aminoácidos como lisina e cisteína. Tal reação é altamente favorecida pela presença de formaldeído o qual foi utilizado na coloração do gel com nitrato de prata. Ainda, uma baixa concentração de proteínas presentes nos *spots* pode ter contribuído para a ineficiência na identificação.

No entanto, diversas proteínas foram identificadas utilizando o método de fracionamento pelo OFFGEL seguido de análises por LC-MS. Todas as proteínas identificadas por 2-DE e MS foram também identificadas com OFFGEL e LC-MS a qual mostrou ser mais eficiente para esse trabalho, uma vez que elimina a etapa da segunda dimensão e os problemas relacionados com a coloração dos géis, permitindo, portanto uma análise mais vantajosa por MS.

Os critérios utilizados para uma identificação confiável das proteínas foram: $XCorr > 3,75$ para peptídeos com carga +3; $XCorr > 2,20$ para peptídeos com carga +2 e $XCorr > 1,90$ para peptídeos com carga +1 e, para todos os casos, $\Delta Cn > 0,1$.⁹¹ Segundo os critérios acima, foram identificadas 47 proteínas apenas no grupo de indivíduos controle, 20 proteínas somente no grupo de doentes e outras 18 apresentaram-se em ambos os grupos com diferenças na expressão. As Tabelas 2.4, 2.5 e 2.6 mostram as proteínas identificadas no grupo controle, grupo doente e em ambos, respectivamente.

Tabela 2.4 – Proteínas identificadas apenas na urina do grupo controle

<i>Proteína</i>	<i>Nome de entrada (UniProtKB)</i>	<i>MM (kDa)</i>	<i>pI</i>	<i>Cobertura da sequência peptídica</i>	<i>Nº de peptídeos encontrados</i>
α -Amilase pancreática (AMYP)	P04746	57,7	7,05	10,18 %	4
Antígeno CD14 (CD14)	P08571	40,1	6,23	5,07 %	1
Apolipoproteína H (APOH)	P02749	38,3	7,97	4,06 %	1
Butirofilina subfamília 2 (BT2A1)	Q7KYR7	59,6	6,68	4,55 %	2
Calicreína-1 (KLK1)	P06870	28,9	4,83	10,31 %	2
CMRF35 molécula 9 (CLM9)	Q6UXG3	36,0	5,92	7,83 %	2
Cubilina (CUBN)	O60494	398,5	5,35	1,49 %	3
Epicana (CD44)	P16070	81,5	5,33	6,33 %	5
Glicoproteína CD59 (CD59)	P13987	14,2	6,48	28,13 %	7
Glicoproteína 6 (GPVI)	Q9HCN6	36,8	9,20	5,01 %	2
α -Glicosidase lisossomal (LYAG)	P10253	105,3	6,00	10,89 %	4
Hemicentina-1 (HMCN1)	Q96RW7	613,0	6,49	18,7 %	3
α -Ig cadeia 2 região C (IGHA2)	P01877	36,5	6,10	10,59 %	2
λ -Ig cadeia 1 região C (LAC1)	P0CG04	11,3	7,87	40,57 %	4

Tabela 2.4 (continuação) – Proteínas identificadas apenas na urina do grupo controle

<i>Proteína</i>	<i>Nome de entrada (UniProtKB)</i>	<i>MM (kDa)</i>	<i>pI</i>	<i>Cobertura da sequência peptídica</i>	<i>Nº de peptídeos encontrados</i>
γ -Ig cadeia 3 região C (IGHG3)	P01860	41,3	7,90	18,30 %	3
κ -Ig cadeia 2 região C (IGKC)	P01834	11,6	5,87	16,98 %	3
κ -Ig cadeia V-I região AU (KV102)	P01594	11,9	5,33	16,67 %	3
κ -Ig cadeia V-II região TEW (KV204)	P01617	12,3	6,00	21,24 %	6
κ -Ig cadeia V-III região HIC (KV305)	P01623	14,1	6,60	24,03 %	2
κ -Ig cadeia V-III região SIE (KV302)	P01620	11,8	8,48	30,28 %	3
λ -Ig lambda cadeia V-IV região Hil (LV403)	P01717	11,5	6,51	17,76 %	5
Ig de cadeia pesada V-III região TIL (HV304)	P01765	12,3	9,13	16,52 %	2
Inibidor de α -tripsina H4 (ITIH4)	Q14624	103,3	6,98	6,13 %	3
Kunitz inibidor de protease (SPIT1)	O43278	28,2	8,29	5,56 %	1
Ligante ICOS (ICOSL)	O75144	33,3	5,31	8,94 %	2
Osteopontina (OSTP)	P10451	35,4	4,58	9,55 %	2
Properdina (PROP)	P27918	51,2	7,90	5,54 %	2
Prostasina (PRSS8)	Q16651	36,4	5,85	5,54 %	1

Tabela 2.4 (continuação) – Proteínas identificadas apenas na urina do grupo controle

<i>Proteína</i>	<i>Nome de entrada (UniProtKB)</i>	<i>MM (kDa)</i>	<i>pI</i>	<i>Cobertura da sequência peptídica</i>	<i>Nº de peptídeos encontrados</i>
Proteína da membrana vitelina 1 (VMO1)	Q7Z5L0	21,5	5,07	13,86 %	3
Proteína de ligação do fator IGF (IBP7)	Q16270	29,1	7,90	14,18 %	2
Proteína de reconhecimento da peptidoglicana 1 (PGRP1)	O75594	21,7	8,59	8,16 %	2
Proteína S100-A7 (S10A7)	P31151	11,5	6,77	13,86 %	3
Proteína S100-A8 (S10A8)	P05109	10,8	7,03	11,83 %	2
Proteína S100-A9 (S10A9)	P06702	13,2	6,13	13,16 %	4
Proteína secretada e transmembrana 1 (SCTM1)	Q8WVN6	27,0	7,43	15,73 %	3
Protrombina (THRB)	P00734	70,0	5,90	4,82 %	2
Putativo zinco- α -2-glicoproteína-1 (ZAGL1)	A8MT79	23,0	6,30	8,33 %	3
Quininigênio-1 (KNG1)	P01042	71,9	6,81	11,49 %	6
α -Receptor de Folato (FOLR1)	P15328	29,8	7,97	5,84 %	1
Receptor endotelial da proteína C (EPCR)	Q9UNN8	26,7	7,18	10,92 %	2

Tabela 2.4 (continuação) – Proteínas identificadas apenas na urina do grupo controle

<i>Proteína</i>	<i>Nome de entrada (UniProtKB)</i>	<i>MM (kDa)</i>	<i>pI</i>	<i>Cobertura da sequência peptídica</i>	<i>Nº de peptídeos encontrados</i>
Receptor do tipo imunoglobulina associado a leucócitos (LAIR1)	Q6GTX8	31,4	5,63	9,41 %	2
Ribonuclease não-secretora (RNAS2)	P10153	18,3	8,73	22,98 %	4
Ribonuclease pancreática (RNAS1)	P07998	17,6	8,79	43,59 %	3
Trefoil fator 2 (TFF2)	Q03403	14,3	5,81	11,63 %	4
Tripeptidil-peptidase 1 (TPP1)	O14773	61,2	6,48	9,49 %	3
Uromodulina (UROM)	P07911	69,7	5,24	34,53 %	26
Vasorina (VASN)	Q6EMK4	71,7	7,39	9,21 %	3

Tabela 2.5 – Proteínas identificadas apenas na urina do grupo doente

<i>Proteína</i>	<i>Nome de entrada (UniProtKB)</i>	<i>MM (kDa)</i>	<i>pI</i>	<i>Cobertura da sequência peptídica</i>	<i>Nº de peptídeos encontrados</i>
Anidrase carbônica 1 (CAH1)	P00915	28,9	7,12	9,58 %	2
Catepsina B (CATB)	P07858	37,8	6,30	5,31 %	1
Endosialina (CD248)	Q9HCU0	80,8	5,35	7,79 %	4
Fibrilina-1 (FBN1)	P35555	312,0	4,93	2,37 %	4
Fosducina-3 (PDCL3)	Q9H2J4	27,6	4,84	7,95 %	2
Galectina-3 (LEG3)	P17931	65,3	5,27	8,89 %	2
Hemoglobina subunidade α (HBA)	P69905	15,2	8,68	34,51 %	4
Hemoglobina subunidade β (HBB)	P68871	16,0	7,28	14,97 %	3
Hemoglobina subunidade δ (HBD)	P02042	16,0	8,05	17,69 %	2
Hemopexina (HEMO)	P02790	51,6	7,02	6,93 %	2
Histona H2B (H2B1A)	Q96A08	14,0	10,32	19,84 %	2
Ig mu cadeia C região (IGHM)	P01871	49,3	6,77	8,43 %	2
Ig mu de cadeia pesada (MUCB)	P04220	43,0	5,24	9,81 %	3
Proteína receptora do fator de necrose tumoral (TNFR14)	Q92956	30,4	7,15	7,77 %	2

Tabela 2.5 (continuação) – Proteínas identificadas apenas na urina do grupo doente

<i>Proteína</i>	<i>Nome de entrada (UniProtKB)</i>	<i>MM (kDa)</i>	<i>pI</i>	<i>Cobertura da sequência peptídica</i>	<i>Nº de peptídeos encontrados</i>
Putativo inibidor de protease WAP5 (WFDC2)	Q14508	13,0	4,84	21,77 %	2
Receptor da proteína tirosina-quinase (AXL)	P30530	98,3	5,43	2,57 %	2
Receptor IgG Fc III-2 (FCG3A)	P08637	29,1	8,07	8,27 %	2
Robo-4 (ROBO4)	Q8WZ75	107,4	6,64	14,49 %	3
Taxina-1 (TACC1)	O75410	87,8	4,97	16,94%	3
Tirosina-fosfatase G1 (PTN12)	Q05209	88,1	5,62	4,87 %	2

Tabela 2.6 – Proteínas diferencialmente expressas identificadas na urina de ambos os grupos (controle e doente)

<i>Proteína</i>	<i>Nome de entrada (UniProtKB)</i>	<i>MM (kDa)</i>	<i>pI</i>	<i>Cobertura da sequência peptídica</i>	<i>Nº de peptídeos encontrados</i>	<i>Regulação em pacientes com câncer de bexiga</i>
α -amilase-1 (AMY1)	P04745	57,7	6,93	10,18 %	4	↓
α -1B-glicoproteína (A1BG)	P04217	54,2	5,86	6,87 %	2	↑
Apolipoproteína A (APO)	P08519	21,3	5,15	17,46 %	2	↑
Caderina-1 (CADH1)	P12830	97,4	4,73	14,47 %	3	↓
Cistatina C (CYTC)	P01034	15,8	8,75	26,71 %	2	↓
Fetúina (FETUA)	P02765	39,3	5,72	5,72 %	1	↑
Gelsolina (GELS)	P06396	85,6	6,28	5,37 %	2	↑
Haptoglobina (HPT)	P00738	45,2	6,58	7,88 %	2	↑
Orosmucóide (ORM1)	P02763	23,5	5,02	8,96%	2	↑
Perlecana (PGBM)	P98160	468,5	6,51	2,60 %	8	↓
Peroxirredoxina-2 (PRDX2)	P32119	21,9	5,97	20,71 %	4	↑
Prostaglandina-H2 D-isomerase (PTGDS)	P41222	21,0	7,80	32,63 %	6	↑
Proteína AMBP (AMBP)	P02760	39,0	6,25	42,05 %	20	↓

Tabela 2.6 (continuação) – Proteínas diferencialmente expressas identificadas na urina de ambos os grupos (controle e doente)

<i>Proteína</i>	<i>Nome de entrada (UniProtKB)</i>	<i>MM (kDa)</i>	<i>pI</i>	<i>Cobertura da sequência peptídica</i>	<i>Nº de peptídeos encontrados</i>	<i>Regulação em pacientes com câncer de bexiga</i>
Receptor de imunoglobulina polimérica (PIGR)	P01833	83,2	5,74	20,09 %	3	↑
Proteína de ligação do retinol (RET4)	P02753	23,0	6,07	23,88 %	3	↑
Receptor do fator de crescimento epidérmico (EGF)	P01133	133,9	5,85	6,88 %	8	↑
Receptor poliovírus (PVR)	P15151	45,3	6,52	6,00 %	2	↑
Zinco- α -2-glicoproteína (ZA2G)	P25311	34,2	6,05	16,44 %	4	↑

Diversas proteínas diferencialmente expressas entre controle e doentes ou encontradas apenas no grupo de doentes já foram anteriormente relatadas como potenciais biomarcadores para o câncer de bexiga. Dentre essas estão anidrase carbônica-1,⁹²⁻⁹⁴ cathepsina B,² fibrilina-1,⁷³ galectina-3,² orosomucoide,⁹⁵ α -1-amilase,⁷² apolipoproteína A,⁶² E-caderina,⁷³ cistatina-C,⁷² gelsolina,⁹⁶ haptaglobina,⁹⁷ perlecana,⁷² prostraglandina H2D,⁹⁶ peroxirredoxina-2,³ receptor poliovírus,⁶¹ receptor de imunoglobulina polimérica,⁷³ receptor do fator de crescimento epidérmico,² proteína AMBP,⁹⁶ proteína de ligação do retinol⁵⁸ e zinco- α -2-glicoproteína.⁹⁵ Entretanto, algumas proteínas diferencialmente expressas entre os grupos ou expressas apenas em doentes não foram antes relacionadas ao câncer de bexiga, entre elas fetuína A, endosialina, hemopexina, histona H2B, receptor IgG Fc III-2, fosducina-3, Robo-4, proteína receptora do fator de necrose tumoral, receptor da proteína tirosina-quinase, tirosina-fosfatase G1, putativo inibidor de protease WAP5 e taxina-1.

Algumas proteínas encontradas apenas na urina de pacientes com câncer de bexiga ou aumentadas nessa matriz, tais como endosialina, fosducina-3, Robo-4 e orosmucoide, estão relacionadas à angiogênese. A angiogênese consiste da proliferação de vasos e capilares e é um fenômeno essencial para o crescimento de um tumor e das metástases dele originadas.⁹⁸ Os capilares e vasos sanguíneos penetram os tecidos e suprem as células mais próximas, incluindo células tumorais. Endosialina, fosducina-3 e Robo-4 estão relacionadas a vários tipos de câncer como mama,⁹⁹⁻¹⁰¹ pulmão,^{99,102,103} endométrio,¹⁰⁴ reto,¹⁰⁵ ovário,^{106,107} entre outros, porém, nunca antes foram encontrados—ou pelo menos relatados—na urina de pacientes com câncer de bexiga. O elevado nível da proteína orosmucoide na urina de pacientes com tumor de bexiga encontrado nesse trabalho está de acordo com o trabalho de Irmak *et al.*⁹⁵ Os autores propõem que além de células cancerosas, algumas células endoteliais dos vasos sanguíneos ativados pela angiogênese servem como fonte para o aumento desta proteína na urina de pacientes com o tumor.

Apolipoproteína A, receptor da proteína tirosina-quinase e gelsolina, proteínas encontradas aumentadas ou, apenas na urina de doentes são relatadas inibirem a apoptose. A apoptose, ou morte celular programada, é um tipo de “auto-destruição celular” que ocorre de maneira ordenada e é importante para eliminar células supérfluas ou defeituosas. Esse fenômeno biológico, além de desempenhar um papel importante no controle de diversos processos vitais, está associado a inúmeras doenças, como o câncer.¹⁰⁸ De maneira

simplificada, ao detectar uma célula defeituosa cancerígena o organismo envia um sinal e proteínas pró-apoptóticas começam a ser produzidas a fim de eliminar tais células. No entanto, algumas proteínas chamadas de anti-apoptóticas são capazes de impedir ou prevenir a morte celular programada promovendo, assim, a sobrevivência da célula cancerígena. De fato, resistência à apoptose é uma das características mais marcantes da maioria dos tumores malignos.¹⁰⁸ O receptor da proteína tirosina-quinase (AXL), encontrada apenas em doentes, é uma proteína que previne a apoptose, pois juntamente com a proteína GAS6 ativa a chamada via Akt, conhecida como via reguladora anti-apoptótica. O esquema da Figura 2.13 mostra o funcionamento da ativação desta via.

Figura 2.13 – Esquema de ativação da via reguladora anti-apoptótica (via Akt).

O complexo GAS6-AXL ativa a enzima fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) que por sua vez ativa a proteína quinase B (Akt-1). A ativação dessa via promove a fosforilação da proteína BAD e consequente sobrevivência das células já que esta proteína fosforilada é incapaz de produzir as demais proteínas pró-apoptóticas que podem destruir as células defeituosas.

A apolipoproteína A foi relatada ser útil no diagnóstico de câncer de bexiga, sendo encontrada em diversos trabalhos aumentada na urina de pacientes com o tumor.^{3,62,109} Ela promove indiretamente a sobrevivência do tumor e especula-se que isso ocorra através da ativação da quinase a qual participa na sinalização da cascata que influencia o processo de apoptose. Gelsolina, outra proteína encontrada nesse trabalho incrementada na urina de pacientes com tumor de bexiga, também inibe a apoptose através da estabilização das mitocôndrias.¹⁰⁹ Antes da morte celular, as mitocôndrias normalmente perdem o potencial de membrana e se tornam mais permeáveis. A gelsolina pode impedir a liberação do citocromo-C, obstruindo a amplificação de sinal que conduziria à apoptose.¹¹⁰

A glicoproteína denominada fetuína A apareceu aumentada na urina de pacientes com câncer de bexiga. Essa proteína está relacionada à proteína receptora do fator de necrose tumoral (TNR14), a qual foi expressa apenas em pacientes com o tumor. A fetuína A é sintetizada no fígado e secretada para o sangue e desempenha um papel anti-inflamatório ao suprimir a liberação do fator de necrose tumoral alfa (TNFA) o qual, por sua vez, tem o papel de induzir a apoptose em células tumorais.¹¹¹ Ainda, a proteína TNR14, a qual apareceu expressa apenas nos doentes, tem como função evitar a TNFA, impedindo assim que ocorra a apoptose nas células tumorais, como mostra o esquema da Figura 2.14.

Figura 2.14 - Esquema de inibição da proteína pró-apoptótica TNFA pela fetuína A e TNR14.

Taxina-1 e galectina-3 foram encontradas somente na urina de pacientes doentes e ambas estão relacionadas à carcinogênese. A carcinogênese é, literalmente, a criação do câncer. É um processo pelo qual as células normais são transformadas em células cancerosas e caracteriza-se por uma sucessão de mudanças a nível celular, genético e epigenético, reprogramando uma célula para sofrer divisão descontrolada, formando assim uma massa maligna. Evidências sugerem que a galectina-3 desempenha um papel importante nos processos associados à carcinogênese, incluindo a metástase e aumento das propriedades invasivas das células tumorais.^{112,113} Alguns estudos propõem que a galectina-3 está envolvida no câncer uma vez que interage com os oncogenes, como Ras, e ativa a sinalização que promove a sua proliferação. Também pode regular algumas das proteínas do ciclo celular, tal como a E-ciclina e proto-oncogene myc (myc-c), o que pode dar propriedades tumorigênicas adicionais.¹¹² Os níveis de galectina-3 estiveram elevados na circulação de pacientes com alguns tipos de câncer como de mama e na urina de pacientes com câncer de bexiga.² Em pacientes com câncer com metástase, galectina-3 é ainda maior, sugerindo que pode estar relacionada com a metástase.^{58,114} A proteína taxina-1 é codificada pelo gene TACC1 que encontra-se dentro de uma região cromossômica associada à tumorigênese. A maneira como essa proteína age na carcinogênese ainda não é conhecida, mas sua relação com diversos tipos de câncer é relatada em vários trabalhos.^{115,116}

A anidrase carbônica é um membro da família das α -anidrases carbônica de zinco, metaloenzimas que catalisam a hidratação reversível do dióxido de carbono para ácido carbônico. Ultimamente, esta enzima tem se tornado um alvo de pesquisa em carcinogênese, progressão e invasão de tumores.^{92,117} A relação entre a anidrase carbônica e o câncer de bexiga tem sido investigada em vários estudos.^{92-94,113} Ela é proposta ser expressa como uma consequência direta da hipóxia em vários tipos de câncer.¹¹⁸ A hipóxia relacionada a tumores é a situação onde as células tumorais têm sido privadas de oxigênio. Como um tumor cresce de maneira rápida e descontrolada, supera rapidamente o fornecimento de sangue, deixando partes do tumor com regiões em que a concentração de oxigênio é significativamente mais baixa do que em tecidos normais. Sabe-se que a proliferação mitótica se faz em meio levemente alcalino e que o intenso metabolismo anaeróbico das células malignas com aumento exagerado da produção de ácido lático acidifica o meio intracelular e impede a proliferação celular. Como mecanismo de sobrevivência as células malignas aumentam a expressão das anidrases carbônicas, as quais transportam para o meio extracelular o excesso de íons H^+ e alcalinizam o intracelular, isto é propiciam um pH ideal para proliferação mitótica.¹¹⁹

Os níveis das proteínas peroxirredoxina-2, receptor poliovírus e receptor de imunoglobulina polimérica estão aumentados na urina de pacientes com câncer de bexiga. Todas foram descritas estarem relacionadas a algum tipo de câncer (incluindo o de bexiga) desempenhando um papel no desenvolvimento ou progressão do mesmo.^{3,61,73} Entretanto, pouco é conhecido a respeito da maneira como tais proteínas atuam nessa doença. Peroxirredoxina-2, por exemplo, é conhecida por atuar nas cascatas de fatores de crescimento e fator de necrose tumoral, regulando as concentrações intracelulares de H_2O_2 , fato que pode estar relacionado ao desenvolvimento ou progressão de tumores.

A catepsina B, encontrada apenas na urina de doentes nesse trabalho, foi relatada ter níveis elevados em muitos tumores, incluindo mama, colo do útero, ovários, cólon, estômago, glioma, pulmão, tireoide e bexiga.^{67,120} Uma razão para esse fato pode ser que a redistribuição da catepsina B na superfície celular em células cancerosas ocorre com a degradação da matriz extracelular. A catepsina B pode afetar a matriz extracelular diretamente causando a sua degradação proteolítica ou indiretamente através da ativação de outras proteases que a degradam. A degradação direta da matriz extracelular ocorre porque a catepsina B degrada algumas proteínas da matriz como laminina, fibronectina e colágeno IV, facilitando assim a

invasão e progressão das células tumorais.¹²⁰ Cistatinas são proteínas inibidoras da proteinase de cistina, como por exemplo, a catepsina B. A cistatina C foi encontrada nesse trabalho estar diminuída na urina de pacientes com câncer de bexiga, dado que concorda com a relação entre esta proteína e a catepsina B. Uma vez que a catepsina B encontra-se aumentada, a função de inibição da cistatina está sendo cumprida e sua expressão é diminuída com relação a indivíduos controle. Desta forma, o balanço entre catepsina/cistatina na urina de pacientes com câncer de bexiga mostra ser importante e pode funcionar como biomarcador para o diagnóstico da doença.⁶⁷

E-caderina, cujo nível foi encontrado ser menor em pacientes com câncer de bexiga, é uma glicoproteína responsável pela adesão célula-célula e está relacionado com a progressão, aumento da capacidade de invasão e metástases de tumores.¹²¹⁻¹²³ Células de carcinoma maligno são caracterizadas, em geral, por uma fraca adesão intercelular, perda da morfologia epitelial diferenciada e aumento da motilidade celular.¹²¹ Assim, a expressão desta proteína na urina pode indicar a presença do tumor e portanto, potencial para funcionar como um marcador para o câncer de bexiga.

Histona H2B foi encontrada apenas na urina de pacientes com câncer de bexiga. Esse dado está de acordo com outros trabalhos que também encontraram essa histona na mesma matriz.^{74,124,125} As histonas desempenham um papel central na regulação dos genes, reparo e replicação do DNA e estabilidade cromossômica. Porém, desequilíbrios dessas proteínas contribuem para a desregulação gênica e tem sido associado à carcinogênese.¹²⁶ A desregulação epigenética parece estar envolvida no ciclo celular da célula tumoral, incluindo o crescimento celular, diferenciação, progressão tumoral e morte celular. As histonas desempenham um papel importante em epigenética e qualquer perturbação pode levar ao desenvolvimento de uma disfunção ou patologia.

Outras proteínas como perlecana, haptoglobina, prostralandina H2D, proteína AMBP, proteína de ligação do retinol e zinco- α -2-glicoproteína encontradas na urina de doentes também foram relatadas estarem aumentadas em pacientes com câncer de bexiga,^{72,73,96} porém para nenhuma delas foi apontada uma relação com a doença que seja embasada em vias bioquímicas. Apesar disso, tais proteínas, e as demais que não foram anteriormente relacionadas à doença, podem também ser apontados como potenciais biomarcadores para o

diagnóstico do câncer de bexiga uma vez que aparecem diferencialmente expressas entre pacientes com o tumor e indivíduos controle.

Assim, nesse trabalho indicamos um grupo de proteínas diferencialmente expressas entre pacientes com câncer de bexiga e indivíduos controle, as quais podem ser consideradas potenciais marcadores para a doença. As referidas proteínas são: anidrase carbônica-1, cathepsina-B, endosialina, fibrilina-1, galectina-3, hemopexina, histona H2B, receptor IgG Fc III-2, fosducina-3, taxina-1, Robo-4, receptor do fator de necrose tumoral, receptor da proteína tirosina-quinase, tirosina-fosfatase G1, putativo inibidor de protease WAP5, orosomucóide, fetuína-A, α -1-amilase, apolipoproteína, perlecana, E-caderina, cistatina C, gelsolina, haptaglobina, prostraglandina H2D, peroxirredoxina-2, receptor poliovírus, receptor de imunoglobulina polimérica, receptor do fator de crescimento epidérmico, proteína AMBP, proteína de ligação do retinol e zinco- α -2-glicoproteína.

Para isso, utilizou-se um *pool* com 15 amostras de urina de pacientes com câncer de bexiga de baixo risco não invasivo (Ta/G1/2) e comparou-se com um *pool* de amostras de urina de indivíduos controle (sem patologias do trato gênito urinário).

Sabe-se que quanto maior o número de indivíduos estudados, mais representativo de uma população será esse grupo e mais confiáveis são os resultados. Porém, este trabalho compreendeu apenas uma busca exploratória inicial de biomarcadores, correspondente à fase II do sistema de busca de biomarcadores proposto pelo EDRN-NCI, o qual sugere ensaios preliminares em grupos reduzidos.^{10,13} Ensaios para a busca de biomarcadores para câncer de bexiga nesta mesma fase foram realizados com diferentes números de amostras variando de 3 até 20 indivíduos,^{3,20,73,96,127,128} concordando com o número de pacientes utilizado nesse trabalho. As fases posteriores (III e IV) em estudos de busca de biomarcadores requerem ensaios em grupos de pacientes maiores, o que deve ser realizado futuramente.

5 Conclusões

Com o trabalho desenvolvido nesse capítulo foi possível encontrar biomarcadores em potencial para o diagnóstico do câncer de bexiga utilizando uma abordagem proteômica. A pesquisa foi relevante já que foram utilizadas duas metodologias prévias de separação de proteínas, eletroforese 2-DE e OFFGEL, sendo que não há relatos na literatura da utilização da última para a busca de marcadores para câncer de bexiga em urina.

O perfil proteico dos grupos controle e doente mostraram-se bastante distintos, com excelente separação dos modelos estatísticos utilizados para ambas as técnicas, 2-DE e OFFGEL. A identificação de proteínas das frações obtidas com OFFGEL seguida de análises por MS mostrou-se adequada e mais eficiente que 2-DE. As análises de LC-MS posterior à eletroforese 2-DE não foram eficazes o suficiente para a identificação das proteínas, devido principalmente à coloração com prata realizada nos géis.

A partir das análises por OFFGEL seguida por nano LC-MS foi possível identificar 47 proteínas apenas no grupo de indivíduos controle, 20 proteínas somente no grupo de doentes e outras 18 em ambos os grupos com diferenças na expressão. Muitas das proteínas encontradas nos doentes já foram apontadas como biomarcadores para o diagnóstico do câncer de bexiga, no entanto, as proteínas fetuína A, endosialina, hemopexina, histona H2B, receptor IgG Fc III-2, fosducina-3, Robo-4, proteína receptora do fator de necrose tumoral, receptor da proteína tirosina-quinase, tirosina-fosfatase G1, putativo inibidor de protease WAP5 e taxina-1 nunca antes foram relacionadas à doença, abrindo um potencial enorme de estudos avançados.

A maioria das proteínas identificadas têm função relacionada à angiogênese, inibição da apoptose, carcinogênese e progressão e crescimento do tumor. Outras proteínas, entretanto, não apresentam função bioquímica evidente, mas igualmente podem ser indicadas como biomarcadores em potencial para o câncer de bexiga.

Concluimos, portanto, que o grupo de proteínas encontradas em urina e propostas como biomarcadores podem potencialmente auxiliar no diagnóstico, e algumas no prognóstico, do câncer de bexiga.

Capítulo 3

Análise Metabolômica

1 Introdução

1.1 Metabolômica

Metabólitos são pequenas moléculas as quais provém de moléculas quimicamente modificadas durante o metabolismo e, portanto podem fornecer uma leitura funcional do estado celular. Ao contrário de genes e proteínas, cujas funções estão sujeitas a regulação epigenética e modificações pós- traducionais, respectivamente, metabólitos servem como assinaturas diretas de atividade bioquímica e são, por conseguinte, mais fáceis de correlacionar com o fenótipo.

Assim, o metaboloma, tipicamente definido como a coleção de pequenas moléculas presentes em um fluido biológico, célula ou organismo em dadas condições fisiológicas (as quais abrangem perturbações como variações genéticas, estados patológicos ou respostas a estímulos externos),¹²⁹ oferece uma janela para interrogar como a bioquímica mecanicista se relaciona com o fenótipo celular. O termo metaboloma foi citado pela primeira vez na literatura científica em 1998, por Oliver e colaboradores.¹³⁰ Já o termo metabolômica foi cunhado em analogia à transcriptômica e proteômica.

A metabolômica é considerada a mais recente das grandes ‘ômicas’ e pode ser definida como uma disciplina genérica dedicada ao estudo qualitativo e quantitativo de todas as espécies de baixo peso molecular (tipicamente < 1500 Da) presentes em um dado sistema biológico.¹³¹ Por ser a última das grandes ‘ômicas’, a metabolômica baseou seu desenvolvimento nas outras disciplinas congêneres, mas ainda apresenta um desenvolvimento menor quando comparada as demais. No entanto, o aumento de estudos em análises metabolômicas e o apoio inquestionável que esta confere a outras ‘ômicas’ torna previsível sua consolidação em um futuro breve.

Alguns aspectos que diferem a metabolômica de outras ômicas compreendem: *i)* o número de metabólitos é menor que o de genes e proteínas, o que reduz a complexidade de seu estudo (algumas publicações sugerem que o número de metabólitos no ser humano é de aproximadamente 7800);¹³¹ *ii)* a obtenção de um perfil metabolômico é mais barato e rápido que as análises em proteômica ou transcriptômica; *iii)* a tecnologia implicada na

metabolômica é mais genérica. Entretanto, tais características não desmerecem a utilidade e complexidade de análises metabolômicas.

A metabolômica tem demonstrado recentemente seu potencial em muitas áreas, tais como resposta a estresse ambiental,^{132,133} toxicologia,¹³⁴ nutrição,¹³⁵⁻¹³⁷ efeitos em manipulação genética,¹³⁸ medicina tradicional,¹³⁹ comparação de diferentes etapas de crescimento,¹⁴⁰ descobrimento de novos produtos naturais,¹⁴¹ entre outras. A grande aplicabilidade da metabolômica em vários domínios decorre, em parte, da estreita associação do metaboloma à fisiologia celular.

Particularmente na área médica, a metabolômica vem demonstrando um papel promissor à medida que pode proporcionar biomarcadores para o diagnóstico e prognóstico de doenças,¹⁴²⁻¹⁴⁷ promover a predição da eficácia e segurança de intervenções farmacêuticas e fornecer *insights* sobre os mecanismos bioquímicos de doenças e a modulação por drogas.¹²⁹

Avanços tecnológicos em instrumentação, especialmente em espectrometria de massas, renovaram o interesse em perfis metabólicos. Atualmente, é possível medir rapidamente centenas de metabólitos simultaneamente, a partir de apenas quantidades mínimas de amostra. Considerando o grande número de metabólitos presentes em uma amostra, sua diversidade química e a grande faixa dinâmica, não existe uma técnica analítica única que pode atingir uma cobertura completa de todo o metaboloma, sendo as mais utilizadas a cromatografia líquida, gasosa e eletroforese capilar acopladas a espectrometria de massas (LC-MS, GC-MS, CE-MS) e ressonância magnética nuclear (RMN). Em especial, as técnicas acopladas à espectrometria de massas vêm ganhando campo pela sensibilidade que tais técnicas podem oferecer, além do menor custo quando comparado a um equipamento de RMN de alta resolução.

1.2 Técnicas Analíticas para Análises Metabolômicas

A origem da metabolômica pode ser atribuída à evolução da ciência de separação bem como à hipótese de "bioquímica individualizada" que associam padrões de metabólitos presentes com traços fenotípicos associados com a saúde e susceptibilidade a doenças.¹⁴⁸

Desde o início das pesquisas em metabolômica *untarget*, RMN desempenha um papel importante como ferramenta analítica para tais análises. De fato, entre os anos 2000 e 2002 tal técnica pode ser considerada a única utilizada para esta finalidade.¹⁴⁸ Nos anos seguintes as técnicas acopladas a espectrometria de massas (LC-MS, GC-MS, CE-MS) ganham espaço nesse cenário, sendo que, atualmente, LC-MS consolidou-se como a técnica mais utilizada em estudos metabolômicos *untarget*. Entretanto, o emprego de RMN em estudos metabolômicos segue sendo expressivo, seguido pelas técnicas de GC-MS e CE-MS, respectivamente.

1.2.1 Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas

Espectrometria de massas e cromatografia são técnicas analíticas bastante estudadas e desenvolvidas ao longo das últimas décadas e, por isso, detêm papel de destaque nas ciências de separação. O avanço de ambas, HPLC e MS contribuíram significativamente para as análises metabolômicas. Estas técnicas são comumente utilizadas para a caracterização e obtenção de informação estrutural de compostos; no campo da metabolômica, estas duas técnicas analíticas podem ser combinadas para caracterizar metabólitos endógenos ou exógenos desconhecidos presentes em amostras biológicas complexas. Separações por HPLC são mais adequadas para a análise de compostos lábeis e não voláteis, polares ou não polares (dependendo da coluna utilizada) em sua forma nativa. A técnica de LC-MS utilizando técnicas de ionização brandas, principalmente ESI, tornam MS mais robusta para análises de rotina e, por isso, tem sido extensivamente empregada em metabolômica.¹⁴⁹⁻¹⁵⁴ Além disso, a alta resolução e reprodutibilidade de LC-MS estabelece uma excelente base para o posterior processamento e análise de dados multivariados. Por isso, análises baseadas em LC-MS vêm sendo cada vez mais utilizadas no diagnóstico de doenças humanas.¹⁵⁵

A ampla utilização de LC-MS em análises metabolômicas deve-se, além das vantagens analíticas como robustez, reprodutibilidade e alta resolução, à versatilidade do método de separação intrínseco do método de HPLC. Esta permite a separação de compostos de uma vasta gama de polaridade, através de eluição isocrática ou de gradiente de eluição. Acetonitrila e metanol são os solventes orgânicos mais comumente empregados. A eluição isocrática é preferida para amostras simples (ou seja, menos de 10 componentes), enquanto o gradiente de eluição proporciona um conjunto mais rápido de análises.¹⁵³

Frequentemente, utiliza-se LC-ESI-MS de fase reversa com coluna C18 como ponto de partida para análises metabolômicas *untarget*. Com esta coluna é possível separar compostos semi-polares tais como ácidos fenólicos, flavonoides, esteroides glicosilados, alcaloides e outras espécies glicosiladas. Utilizando cromatografia líquida de interação hidrofílica (*Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*, HILIC) é possível separar compostos polares como açúcares, amino açúcares, vitaminas, ácidos carboxílicos, nucleotídeos, etc.¹⁵³ Assim, a combinação de diferentes colunas cromatográficas e modos de ionização permite à técnica de LC-MS cobrir uma vasta gama de metabólitos, justificando seu extenso emprego em metabolômica.

1.2.2 Eletroforese Capilar acoplada à Espectrometria de Massas

A eletroforese capilar acoplada à espectrometria de massas (CE-MS) é uma técnica de separação poderosa e promissora para metabólitos carregados, capaz de oferecer alta resolução de separação e fornecer informações, principalmente de compostos polares e iônicos, em amostras biológicas.¹⁵⁶ Como plataforma analítica, CE-MS tem contribuído significativamente para o avanço das pesquisas em metabolômica.

Os metabólitos são primeiramente separados por CE com relação às suas cargas e tamanhos, e então, analogamente a outras técnicas hifenadas a MS, eles são detectados seletivamente usando o MS por monitoramento de íons ao longo de um grande intervalo de valores de m/z . CE-MS foi utilizado pela primeira vez em metabolômica por Soga e Heiger em 2000,¹⁵⁷ os quais desenvolveram um método para a detecção de aminoácidos sem derivação, bem como um sistema para análise de intermediários do sistema glicolítico, via das pentoses e ciclo de ácido cítrico.

CE-MS oferece inúmeras vantagens sobre outras técnicas de separação. Uma das vantagens expressivas de CE-MS é o curto tempo de análise e os pequenos volumes de amostra exigidos para injeção que variam de 1 a 20 nL.¹⁵⁸ Esta característica faz com que CE-MS seja uma técnica analítica muito promissora para metabolômica. Por isso, CE-MS vem sendo aplicada para análises de metabólitos *target* e *untarget*, possibilitando a identificação principalmente de íons inorgânicos, ácidos orgânicos, aminoácidos, nucleotídeos e

nucleosídeos, vitaminas, carboidratos, tióis e peptídeos.¹⁵⁵ A principal desvantagem da técnica de CE-MS é sua baixa repetibilidade observada na variação do tempo de migração dos compostos o que pode ser influenciado, por exemplo, por alterações de temperatura, e principalmente pelo teor salino das amostras. Além disso, CE-MS não é tão robusta e estável como GC-MS ou LC-MS, devido à necessidade de completar o circuito elétrico do CE para que a separação ocorra, e simultaneamente proporcionar um potencial elétrico para a ponta do *spray*. Isto é geralmente realizado com uma interface ESI *sheath-liquid* devido à sua maior robustez comparadas a outras interfaces ESI (*sheathless* ou *liquid junction*).¹⁵⁹ No entanto, a diluição da amostra produzida por *sheath-liquid* compromete a sensibilidade.

1.3 Análise Metabolômica Aplicada ao Câncer de Bexiga

O metaboloma urinário de humanos foi alvo de alguns estudos, os quais identificaram metabólitos de diversas classes químicas conforme listado na Tabela 3.1. Segundo Bouatra *et al.*¹⁶⁰ os metabólitos mais abundantes na urina de indivíduos “normais” obtidas por RMN são ureia ($12,3 \pm 14,5 \text{ mmol L}^{-1} / \text{mmol L}^{-1} \text{ creatinina}$), creatinina ($14,7 \pm 9,8 \text{ mmol L}^{-1}$), ácido hipúrico ($229 \pm 160 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1} / \text{mmol L}^{-1} \text{ creatinina}$) e ácido cítrico ($203 \pm 129 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1} / \text{mmol L}^{-1} \text{ creatinina}$). Entre os menos abundantes estão ácido trans ferúlico ($1,2 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1} / \text{mmol L}^{-1} \text{ creatinina}$), fosforilcolina ($1,1 \pm 0,7 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1} / \text{mmol L}^{-1} \text{ creatinina}$), 4-etilfenol ($0,9 \pm 0,1 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1} / \text{mmol L}^{-1} \text{ creatinina}$), ácido 2-metil-glutárico ($0,8 \pm 0,4 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1} / \text{mmol L}^{-1} \text{ creatinina}$).

Tabela 3.1 - Principais classes químicas de metabólitos presentes na urina de humanos

<i>Classe Química</i>	<i>No. Compostos</i>
Ácidos orgânicos e derivados	108
Alcaloides e derivados	45
Amino ácidos e peptídeos	286
Carboidratos	116
Compostos alifáticos acíclicos	93
Compostos aromáticos homomonocíclicos	432
Compostos aromáticos heteropolicíclicos	728
Compostos heteromonocíclicos alifáticos	43
Compostos heteropolicíclicos alifáticos	40
Compostos heteromonocíclicos aromáticos	67
Lipídeos	866
Nucleotídeos e nucleosídeos	49

Fonte: Adaptado de BOUATRA, S.; AZIAT, F.; MANDAL, R.; GUO, A. C.; WILSON, M. R.; KNOX, C.; BJORNDahl, T. C.; KRISNAMURTHY, R.; SALEEM, F.; LIU, P.; DAME, Z. T.; POELZER, J.; HUYNH, J.; YALLOU, F. S.; PSYCHOGIOS, N.; DONG, E.; BOGUMIL, R.; ROEHRING, C.; WISHART, D. S. **The Human Urine Metabolome. PLoS ONE**, v. 8, p. 1-28, 2013.¹⁶⁰

Diversos trabalhos em metabolômica têm se dedicado à busca de biomarcadores para o câncer de bexiga utilizando tanto abordagem *target*¹⁶⁰⁻¹⁶³ quanto *untarget*.^{1,164-169} A urina é utilizada como matriz alvo em alguns estudos de busca de biomarcadores para o diagnóstico da doença.^{161,164,167-169} Entre os metabólitos apontados como potenciais marcadores para o câncer de bexiga destacam-se, por estarem presentes em mais de um dos trabalhos citados, tirosina, triptofano, uridina, glicina, frutose, vanilina, ácido cítrico, dodecanal e leucina/isoleucina. Com relação à progressão do câncer de bexiga, foi encontrado apenas um trabalho na literatura, o qual utilizou tecidos cancerígenos como matriz para a busca dos

biomarcadores. Os autores encontraram 50 metabólitos diferencialmente expressos entre tecidos cancerígenos benignos e malignos.¹⁷⁰

Entre as técnicas empregadas em estudos metabolômicos para câncer de bexiga, LC-MS é a mais utilizada, seguida por GC-MS e RMN. Já a técnica de eletroforese capilar tem sido aplicada em estudos metabolômicos para câncer de bexiga utilizando a abordagem *target*. Entretanto, na maioria dos estudos a detecção não é realizada por espectrometria de massas, mas por detectores de ultravioleta com arranjo de diodo (DAD-UV).^{163, 171}

2 Objetivos

Objetivos Gerais

O objetivo geral do trabalho descrito nesse capítulo foi buscar por metabólitos diferencialmente expressos em urina que poderiam ser apontados como potenciais biomarcadores para progressão e recorrência do câncer de bexiga.

Objetivos Específicos

- ✓ Análise comparativa do perfil metabólico de urina de pacientes com câncer de bexiga com o tumor estável e recorrente e de alto e baixo risco utilizando LC-MS;
- ✓ Análise comparativa do perfil metabólico de urina de pacientes com câncer de bexiga com o tumor estável e recorrente e de alto e baixo risco utilizando CE-MS;
- ✓ Análise comparativa entre as técnicas analíticas de alta resolução;
- ✓ Identificação e confirmação dos potenciais biomarcadores por MS/MS ou adição de padrão.

3 Materiais e Métodos

3.1 Amostras Biológicas

Amostras de urina foram coletadas de 48 pacientes diagnosticados com câncer de bexiga urotelial no *Hospital Del Mar* em Barcelona durante o período de 2010 a 2012. Todas as amostras foram coletadas de pacientes antes dos mesmos receberem qualquer tratamento. Os pacientes foram diagnosticados com câncer de bexiga por um patologista especialista de acordo com a classificação da Organização Mundial da Saúde - Sociedade Internacional de Patologistas Urológicos (*World Health Organisation - International Society of Urological Pathology*, WHO-ISUP) de 2004.⁸¹ Os pacientes foram acompanhados durante dois anos para identificar se e quando o câncer progrediria ou reincidiria. Posteriormente, eles foram classificados como estável ou recorrente, para caso de reincidência do tumor e/ou como de alto (tumores TaG3 e T1G2/3) ou baixo risco (tumores Ta/G1/2) para caso de progressão do tumor. Desse modo, as amostras foram definidas em quatro grupos: *i*) pacientes com tumor estável e de baixo risco (EB); *ii*) pacientes com tumor recorrente e de baixo risco (RB); *iii*) pacientes com tumor estável e alto risco (EA) e *iv*) pacientes com tumor recorrente e de alto risco (RA). O grupo EB inclui 16 pacientes, sendo 15 homens e 1 mulher; o grupo RB inclui 10 pacientes, sendo 8 homens e 2 mulheres; o grupo EA compreende 11 pacientes, sendo 10 homens e 1 mulher e, finalmente, o grupo RA inclui 11 pacientes, sendo 10 homens e 1 mulher. Como mencionado anteriormente, o câncer de bexiga é mais prevalente em homens que em mulheres e, o balanço entre os pacientes reflete isso. Assim, foi decidido que amostras dos pacientes do sexo feminino deveriam ser incluídas no estudo, uma vez que não houve diferença evidente de acordo com o gênero, mas o número de amostras aumentou o poder nas análises estatísticas. A faixa etária dos pacientes foi entre 60 e 70 anos.

3.2 Tratamento das amostras

Para as análises de CE-MS as amostras de urina de pacientes com câncer de bexiga foram diluídas com água ultrapura (1/5 v/v), centrifugadas e transferidas para os *vials* para serem analisadas. Os *Quality Controls* (QC) foram preparados misturando iguais volumes de urina de cada amostra, de todos os grupos, previamente preparada como descrito

anteriormente. As amostras de QC foram analisadas ao longo da sequência, a cada seis injeções de amostras, para fornecer uma medida da estabilidade e do desempenho do sistema.¹⁷² A normalização das amostras pelo teor de creatinina foi realizada com *software Mass Profiler Professional P7+* (Agilent Technologies). Para as análises com LC-MS, a urina de pacientes com câncer foram diluídas com água ultrapura de acordo com o cálculo realizado para normaliza-las com creatinina, utilizando os dados anteriormente obtidos por CE-MS. Em seguida, as amostras foram centrifugadas, transferidas para *vials* e os QCs foram preparados e analisados como mencionado acima.

3.3 Fingerprint de urina utilizando CE-MS

As análises da urina por CE-MS foram realizadas utilizando um método previamente desenvolvido para *fingerprinting* metabólico de urina.¹⁷³ Para isso foi utilizado um equipamento de eletroforese capilar Agilent 7100 acoplado a um espectrômetro de massas Agilent 6224 (Agilent Technologies, Wilmington, USA) equipado com uma fonte de ionização por *electrospray* (ESI) e analisador por tempo de voo (TOF). A aquisição dos dados no CE foi obtida utilizando ChemStation B.04.02 e no MS utilizando MassHunter WorkStation B.05.00. Para a separação dos metabólitos foi utilizado um capilar de sílica fundido (G1600-67311 Agilent Technologies) com 50 μm de diâmetro interno e 110 cm de comprimento. Capilares novos foram condicionados por 40 min a 25 °C com NaOH 1 mol L⁻¹ e água ultrapura por 30 min. Antes de cada análise, o capilar foi condicionado com tampão de corrida por 4 min a 550 mbar. O eletrólito utilizado foi ácido fórmico 0,8 mol L⁻¹ (pH 1,9) e metanol 10% (v/v). O *sheath liquid* utilizado foi ácido fórmico 1 mmol L⁻¹ e metanol 50% (v/v) infundido a vazão de 4 $\mu\text{L min}^{-1}$. As condições do *spray* incluíram razão de gás seco de 12 L min⁻¹ à 200 °C e pressão de nebulização de 22 psi. Os dados foram adquiridos na faixa de massa *m/z* de 80 a 1000. Para todos os experimentos de CE-MS as amostras foram hidrodinamicamente injetadas a 100 mbar por 10 s, a voltagem de separação foi de 30 kV e a corrente de 21 μA . A voltagem do *electrospray* foi de 3,5 kV.

3.4 Fingerprint de urina utilizando LC-MS

As análises da urina por LC-MS foram realizadas utilizando um método previamente desenvolvido para *fingerprinting* metabólico de urina.¹⁷⁴ O sistema HPLC consistiu de um desgaseificador, duas bombas binárias e um amostrador automático (1200 series, *Agilent*). A urina, tratada como descrita acima, foi injetada a um volume de 5 µL em uma coluna de separação em fase reversa à 30 °C (*Supelco Ascentis Express C18*; 5 cm × 2,1 mm; 2,7 µm; 90 Å). O sistema foi operado a um fluxo de 0,5 mL min⁻¹ de fase móvel consistindo de A: água com 0,5% de ácido fórmico e B: acetonitrila. O tempo total por análise foi de 20 min. O gradiente iniciou com 0% de B durante os primeiros 0,5 min, aumentou para 9% nos 2 min seguintes, seguiu para 20% em 5 min e depois para 45% em 8 min e finalmente alcançou 100% em 9,5 min. O gradiente foi mantido a 100% de B até 11 min, e voltou as condições iniciais em 0,5 min, mantendo-se o reequilíbrio até 20 min. Os dados foram coletados em modo positivo utilizando uma fonte de ionização ESI e um analisador qTOF (*Agilent 6520*) operado em modo *full scan* na faixa de *m/z* de 50 a 1000. A voltagem do capilar foi de 4000 V com uma razão de *scan* de 1,02 *scans* por segundo, vazão de gás nebulizador de 11 L min⁻¹, sob pressão de 50 *psi* e temperatura de 325 °C. Durante as análises, duas massas de referência foram utilizadas: *m/z* 121.0509 (C₅H₄N₄) e *m/z* 922.0098 (C₁₈H₁₈O₆N₃P₃F₂₄). Essas massas foram continuamente infundidas no sistema para permitir correção de massa constante. Durante as análises as amostras foram mantidas no amostrador a 4 °C.

3.5 Tratamento dos dados

Os dados resultantes foram “limpos” de ruídos e íons não correlacionados utilizando a ferramenta *Molecular Feature Extraction* no *software MassHunter Qualitative Analysis* (*Agilent Technologies*). Esta ferramenta foi usada para criar uma lista de todos os possíveis compostos como representado pelos dados do *full scan* TOF-MS. O alinhamento e o filtro de dados foram realizados com o *software Mass Profiler Professional* B.02.00. Os *features* foram filtrados escolhendo os dados que estavam presentes em 90% de todas as amostras de qualquer grupo experimental (EB, EA, RB, e RA). As diferenças entre metabolitos da urina de todos os quatro grupos foram avaliadas utilizando os testes: *i*) *t-test* (com *p* < 0,05),

calculado no *Mass Profiler Professional* e ii) *S-plot* e *Jack knife* obtidos pelos modelos de OPLS-DA construídos no *software* SIMCA-P (*Umetrics*). As massas precisas dos *features* que representaram diferenças significativas entre os conjuntos foram pesquisadas nos bancos de dados METLIN, HMDB, LIPIDO mapas, MASSTRIX e um mediador *house-built* desenvolvido na *Universidad San Pablo* CEU, onde as análises foram realizadas.

3.6 Identificação de Compostos

A identidade de compostos que foram significantes na separação das classes nas análises por LC-MS foram confirmados por LC-MS/MS utilizando um analisador qTOF (modelo 6520, *Agilent*). Os experimentos foram repetidos em condições cromatográficas idênticas àquelas descritas para as análises iniciais. Os íons alvo foram fragmentados por CID (*Collision Induced Dissociation*) com base na massa exata e tempo de retenção previamente determinados. A comparação da estrutura do composto proposto com os fragmentos obtidos confirmou sua identidade. Dados de massa exata e distribuições isotópicas para os íons precursores e produtos foram analisados e comparados com os dados espectrais de compostos de referência, se disponível, obtida em condições semelhantes para a confirmação final (HMDB, METLIN). Para os compostos que foram significantes na separação das classes nas análises por CE-MS, a identificação foi feita utilizando as mesmas condições eletroforéticas das análises iniciais, sendo que padrões foram adicionados às amostras e a área total dos picos foram então comparadas com e sem o padrão.

4 Resultados e Discussão

A Figura 3.1 mostra um cromatograma e um eletroferograma com o perfil das amostras obtidas com LC-MS e CE-MS, respectivamente. Os perfis incluem todas as amostras dos quatro grupos avaliados antes de qualquer etapa de processamento, incluindo o alinhamento.

Figura 3.1 – Perfil de todas as amostras obtidas com A) LC-MS e B) CE-MS antes do alinhamento

Inicialmente, foram construídos modelos de PCA com os dados obtidos para os quatro grupos (EB - estável e baixo risco; RB - recorrente e baixo risco; EA - estável e alto risco; RA - recorrente e alto risco) com ambas as técnicas analíticas, CE-MS e LC-MS, como mostrado na Figura 3.2. Os modelos com PCA são usados a princípio porque a partir deles é possível obter um resumo geral dos dados multivariados. Tal resumo revela agrupamentos, tendências de separações, *outliers*, relação entre variáveis e amostras.

Figura 3.2 – Modelos construídos com PCA a partir dos dados obtidos com (A) LC-MS e (B) CE-MS. $\pm$ QC, ● EB, ◆ RB, ■ EA, ▲ RA.

Como esperado, as amostras biológicas de urina de humanos não foram bem separadas com esse método estatístico. Amostras de urina humana são matrizes extremamente complexas e um método não supervisionado como PCA dificilmente seria capaz de separá-los. No entanto, é possível visualizar em ambos os modelos que os QCs encontram-se agrupados indicando, portanto, a estabilidade e bom desempenho do sistema analítico e fornecendo dados confiáveis para posteriores análises estatísticas. A avaliação do sistema analítico utilizando QCs tem sido uma prática recorrente em análises ‘ômicas’ devido não somente aos custos de tais análises, mas também à quantidade de amostra que, muitas vezes, é um fator limitante.

Como com o modelo não supervisionado (PCA) não foi obtido sucesso, utilizou-se PLS-DA para avaliar se houve separação entre os grupos estudados. Como já descrito anteriormente, métodos supervisionados como PLS-DA tentam encontrar componentes que separem as observações levando em consideração as classes previamente conhecidas. A Figura 3.3 mostra os modelos construídos utilizando PLS-DA para os dados obtidos com LC-MS e CE-MS.

Com o modelo construído com dados obtidos por LC-MS (Figura 3.3 - A), observamos uma separação bastante clara entre os grupos RB e RA, e a formação de um terceiro grupo composto por EB e EA, o qual demonstra uma leve tendência de separação entre eles. Neste modelo, nota-se que a primeira componente separa os grupos entre pacientes com tumor estável e recorrente, enquanto a segunda componente separa os grupos entre pacientes com tumor de alto e baixo risco. Já o modelo construído com dados obtidos por CE-MS (Figura 3.3 - B) mostra uma separação bem evidente entre os grupos EB e RB, e a formação de um terceiro grupo composto por EA e RA, com uma leve tendência de separação entre eles. De fato, o grupo EA aparece muito próximo aos QCs, o que indica que as variáveis desse grupo não contribuem muito nessa separação e, dessa forma, poucas informações podem ser extraídas. Entretanto, é nítido que a primeira componente separa os grupos entre pacientes com tumor de baixo e alto risco.

Vale ressaltar ainda que os QCs em ambos os modelos foram preditos, ou seja, foram incluídos nos modelos após a construção dos mesmos para avaliar se eles se agrupariam, como visto na Figura 3.3.

Figura 3.3 – Modelos construídos com PLS-DA a partir dos dados obtidos com (A) LC-MS e (B) CE-MS. $\pm$ QC, ● EB, ◆ RB, ■ EA, ▲ RA.

A fim de facilitar a interpretação e obter mais informações sobre os metabólitos mais relevantes na separação, os grupos foram separados e avaliados de acordo com as seguintes comparações: RB vs. RA; EA vs. RA; EB vs. RB; RB vs. EA. Ainda, foi utilizado como análise multivariada OPLS-DA, pois ao contrário de PLS-DA, utiliza uma única componente como um preditor para a classe, enquanto as demais componentes descrevem a variação ortogonal para a primeira componente preditiva. Assim, a componente preditiva descreve

realmente a direção da diferença entre os grupos e, em seguida, todas as amostras são projetados sobre esta componente para estimar os *scores*.¹⁷⁵ Por isso, estes modelos são comumente utilizados para encontrar marcadores. Os modelos construídos com OPLS-DA para as comparações descritas acima e para ambas as técnicas analíticas são mostrados nas Figuras 3.4 e 3.5. Os parâmetros de qualidade para os modelos foram altos para R^2 (próximo a 1,000) e satisfatório para Q^2 (variando de 0,242 a 0,744).

Figura 3.4 – Modelos construídos com OPLS-DA a partir dos dados obtidos com LC-MS para as seguintes comparações: (A) EB vs. RB; (B) EA vs. RA; (C) EB vs. EA; (D) RB vs. RA. $\pm$ QC, ● EB, ◆ RB, ■ EA, ▲ RA. A: $R^2 = 1,000$, $Q^2 = 0,448$; B: $R^2 = 1,000$, $Q^2 = 0,607$; C: $R^2 = 1,000$, $Q^2 = 0,414$; D: $R^2 = 1,000$, $Q^2 = 0,744$.

Figura 3.5 – Modelos construídos com OPLS-DA a partir dos dados obtidos com CE-MS para as seguintes comparações: (A) EB vs. RB; (B) EA vs. RA; (C) EB vs. EA; (D) RB vs. RA. $\pm$ QC, ● EB, ◆ RB, ■ EA, ▲ RA. A: $R^2 = 0,867$, $Q^2 = 0,242$; B: $R^2 = 0,974$, $Q^2 = 0,449$; C: $R^2 = 1,000$, $Q^2 = 0,572$; D: $R^2 = 0,971$, $Q^2 = 0,402$.

Durante o processamento os dados passam por diversas etapas para que apenas aqueles que sejam significativos sejam encontrados. A Tabela 3.2 mostra o número final de compostos obtidos após as etapas de alinhamento dos picos, filtro a 90% e análise estatística para cada uma das técnicas analíticas utilizadas.

Tabela 3.2 – Número de compostos obtidos após as referidas etapas do tratamento de dados

<i>Técnica analítica</i>	<i>Alinhamento</i>	<i>Filtro 90%</i>	<i>Análise estatística</i>
LC-MS	79.112	1.398	684
CE-MS	4.780	180	75

O filtro utilizado, realizado no *software Mass Profile Professional*, permitiu a busca de metabólitos presentes em 90% das amostras de um mesmo grupo. Assim, apenas os compostos que estavam presentes em 90% dos indivíduos de um mesmo grupo foram considerados válidos. Com relação às análises estatísticas utilizadas (*t-test*, *S-plot* e *Jack knife*) somente resultados com $p < 0,05$, porcentagem de variação acima de 15% e coeficiente de variação (CV) abaixo de 30% foram considerados. As porcentagens de câmbio foram calculadas para um grupo (X) em relação ao outro (Y) subtraindo a média de Y da média de X, dividindo pela média de Y e multiplicando por 100 ($(Y-X)/Y \times 100$). Como mencionado anteriormente, os metabólitos identificados por LC-MS foram confirmados por MS/MS e aqueles identificados por CE-MS foram confirmados por adição de padrão.

Como esperado, com LC-MS mais compostos foram encontrados quando comparado a CE-MS, devido à maior gama de compostos que a técnica pode abranger. Entretanto, como pode ser visto na Tabela 3.3, a maior parte dos metabólitos foi encontrada com apenas uma das técnicas utilizadas, o que confirma a complementaridade de ambas.

Deve-se destacar a predominância da classe dos aminoácidos e seus derivados como metabólitos diferencialmente expressos entre os grupos estudados, o que revela sua importância como biomarcadores em potencial para o câncer de bexiga.

Tabela 3.3 - Metabólitos identificados e estatisticamente significativos que mostraram diferenças entre os grupos

<i>Compostos</i>	<i>TR^a/TM^b</i> (min)	<i>m/z</i>	<i>MM</i>	<i>Erro</i> (ppm)	<i>CV</i> (%)	<i>Identificação</i>	<i>p-valor</i>	% <i>Variação</i>			
								<i>EB/RB</i>	<i>EA/RA</i>	<i>EB/EA</i>	<i>RB/RA</i>
Acetilcarnitina	13,11 ^b	203,1159	203,1158	0,49	0,91	Padrão	0,030	-	-	16,7	-
N-acetiltryptofano	5,69 ^a	246,1002	246,1004	-0,81	24,2	83,0596; 130,0626; 132,0767; 201,1027; 229,1143; 274,1027	0,003	-	-63,4	72,7	-42,6
Ácido 3-amino-2-naftóico	3,18 ^a	187,0621	187,0633	-6,41	2,47	118,0635; 144,0779; 146,0578; 147,0599; 188,0679	0,040	-	-	59,3	42,6
Ácido 13S-hidroxiocadecadienóico	10,57 ^a	296,2338	296,2351	-4,39	13,2	57,0700; 69,0697; 81,0693; 83,0847; 95,0849; 256,2618	0,012	28,8	46,3	-19,7	-
Ácido 2,6,10-trimetilundecanóico	10,94 ^a	228,2078	228,2089	-4,82	9,55	57,0799; 88,0745; 89,0776; 102,0895; 152,0688; 229,2342	0,003	-35,8	-15,4	-	19,9
Ácido úrico	35,39 ^b	168,0287	168,0283	2,38	0,40	Padrão	0,010	92,0	-	-	-
Amida palmítica	9,89 ^a	255,2501	255,2562	-23,9	19,9	56,0698; 88,0746; 102,0899; 116,1045; 256,2616	0,038	-	-	-	25,0
Betaina	17,40 ^b	117,0790	117,0790	0,00	1,18	Padrão	0,042	-	59,3	-89,4	-
Carnosina	9,81 ^b	226,1073	226,1066	3,10	0,90	Padrão	0,015	27,9	-15,1	33,4	-

Tabela 3.3 (continuação) – Metabólitos identificados e estatisticamente significativos que mostraram diferenças entre os grupos

<i>Compostos</i>	<i>TR^a/TM^b</i> (<i>min</i>)	<i>m/z</i>	<i>MM</i>	<i>Erro</i> (<i>ppm</i>)	<i>CV</i> (%)	<i>Identificação</i>	<i>p-valor</i>	% <i>Variação</i>			
								<i>EB/RB</i>	<i>EA/RA</i>	<i>EB/EA</i>	<i>RB/RA</i>
6-Ceto-decanoilcarnitina	6,94 ^a 15,78 ^b	329,2198	329,2202	-1,21	6,03	Encontrado com ambas as técnicas	0,012	-84,8	38,4	-98,0	-48,2
Cistina	16,82 ^b	240,0240	240,0238	0,83	0,80	Padrão	0,043	-	47,0	-	-
Decanoilcarnitina	8,29 ^a	315,2391	315,2410	-6,03	7,72	60,0811; 71,0846; 85,0281; 85,0925; 86,0318; 257,1720; 316,2433	0,021	30,2	-	54,4	-
Dopaquinona	2,54 ^a	195,0524	195,0532	-4,10	5,66	93,0331; 121,0279; 122,0310; 123,0332; 196,1145	0,043	-	-36,3	-32,3	114,7
Fenilalanina	16,57 ^b	165,0793	165,0790	1,82	1,13	Padrão	0,015	-	-	-25,4	-
Galactitol/ Sorbitol/ Manitol	10,28 ^a	182,0760	182,0790	-16,5	5,97	61,0392; 69,0334, 84,9586; 97,9673; 99,9678; 126,0893; 141,9560	0,034	-22,6	-	-48,8	-25,7
Nε,Nε- Dimetilisina	10,44 ^b	174,1353	174,1368	-8,61	2,34	Padrão	0,030	-	-	-90,6	-
Galbeta1-4(NeuAalfa2-3)Galbeta1-4Glcbeta- Cer(d18:1/18:0)/ GalNAcbeta1-4 (KDNalfa2-3)Galbeta1-4Glcbeta-Cer(d18:1/18:0)	7,39 ^a	1342,7976	1342,7973	0,22	13,8	136,0395; 204,0776; 828,9074; 1344,7013	0,028	29,6	-	-43,5	-52,9

Tabela 3.3 (continuação) – Metabólitos identificados e estatisticamente significativos que mostraram diferenças entre os grupos

<i>Compostos</i>	<i>TR^a/TM^b</i> (min)	<i>m/z</i>	<i>MM</i>	<i>Erro</i> (ppm)	<i>CV</i> (%)	<i>Identificação</i>	<i>p-valor</i>	% <i>Variação</i>			
								<i>EB/RB</i>	<i>EA/RA</i>	<i>EB/EA</i>	<i>RB/RA</i>
Heptanoilcarnitina	5,77 ^a	273,1945	273,1940	1,83	0,36	60,0802; 85,0282; 113,0944; 213,1276; 215,1280; 230,0707; 274,1822	0,037	24,4	87,6	-20,9	-60,0
Hipoxantina	18,51 ^b	136,0380	136,0372	5,88	1,33	Padrão	0,037	-49,2	-	-	74,2
Histidina	10,76 ^b	155,0697	155,0695	1,29	4,50	Padrão	0,044	-	28,4	-47,4	-35,4
Leucina	15,16 ^b	131,0946	131,0946	0,00	19,5	Padrão	0,019	-29,0	-63,8	-	63,5
1-Metilhistidina	12,65 ^b	169,0852	169,0851	0,59	0,36	Padrão	0,016	-	-	-	-88,7
MG(0:0/16:1(9Z)/0:0)/ MG(16:1(9Z)/0:0/0:0)	10,83 ^a	328,2587	328,2613	-7,92	28,8	67,0534; 81,0708; 83,0843; 105,0693; 149,0180; 166,1235; 314,2523	0,036	-	-16,2	30,2	20,6
Tirosina	17,41 ^b	181,0740	181,0739	0,55	0,36	Padrão	0,016	-	28,4	-18,4	-16,5
Ne,Ne,Ne-Trimetil lisina	10,46 ^b	188,1525	188,1525	0,00	0,53	Padrão	0,028	-	-30,6	-	-
Triptofano	3,18 ^a 16,49 ^b	204,0897	204,0899	-0,98	3,34	Encontrado com ambas as técnicas	0,006	-	-	62,8	56,5

Os aminoácidos histidina, fenilalanina, tirosina e triptofano foram anteriormente relatados estarem aumentados em tecidos de pacientes com tumor de bexiga em relação a tecidos de indivíduos sem a doença.¹⁷⁰ Os autores sugeriram tais compostos como potenciais biomarcadores para o diagnóstico da doença. No presente estudo, os aminoácidos acima descritos mostraram diferenças na expressão entre pacientes com diferente grau do tumor ou recorrência. Portanto, é evidente que esses compostos são relevantes para o diagnóstico de câncer de bexiga, mas nossos dados fornecem uma extensão para o conhecimento sobre a doença, à medida que mostram a relevância de cada um com relação à progressão e/ou recorrência da doença.

Histidina e tirosina foram encontradas aumentadas na urina de pacientes com tumor de alto risco quando comparada a pacientes com tumor de baixo risco (EB vs. EA; RB vs. RA). Ainda, a concentração de ambas apresentou-se aumentada em pacientes com tumor estável e de alto risco (EA vs. RA). Embora estes aminoácidos não estejam diretamente relacionados a uma via metabólica, a expressão de ambos no mesmo sentido, ou seja, ambos aumentados para pacientes de alto risco e para pacientes estáveis com tumor de alto risco, pode funcionar como indicativos para progressão e recorrência da doença, respectivamente.

O aminoácido fenilalanina revelou ser significativamente diferente apenas para tumores de alto e baixo grau em pacientes considerados com a doença estável (EB vs. EA). Se aliado aos demais metabólitos também diferencialmente expressos para esse grupo (como histidina e tirosina, por exemplo), fortalece o diagnóstico de progressão da doença para pacientes com o tumor estável.

Um composto metabolicamente relacionado à tirosina e que também revelou diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados foi a dopaquinona. Esta está diretamente associada à tirosina através da enzima tirosinase (KEGG: EC 1.14.18.1, Figura 3.6), a qual desempenha um papel de equilíbrio entre esses dois metabólitos. Se considerarmos tumores de alto risco, a tirosina aparece aumentada em pacientes estáveis com relação aos recorrentes (EA vs. RA), enquanto a dopaquinona aparece diminuída em pacientes estáveis. Assim, é possível que a recorrência da doença favoreça a reação no sentido da conversão de tirosina à dopaquinona, enquanto o aumento da concentração de tirosina é favorecido em pacientes estáveis.

Figura 3.6 – Esquema simbolizando parte do metabolismo da tirosina, com destaque para formação de tirosina e dopaquinona pela enzima tirosinase.

Fonte: Adaptado de KEGG. **Tyrosine Metabolism** – Reference Pathway. Disponível em http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map00350 Acesso em: 30 dez 2013.¹⁷⁶

O aminoácido triptofano foi descrito anteriormente em outros trabalhos como um biomarcador para o câncer de bexiga.¹⁷⁷⁻¹⁷⁹ No presente estudo, o triptofano foi demonstrado ser particularmente significativo em pacientes com tumor de baixo risco (tanto em pacientes estáveis quanto recorrentes) e, portanto, destaca-se por sua relevância nas fases iniciais da doença. Desta forma, podemos apontar o triptofano como um biomarcador em potencial para a progressão da doença. Um metabólito relacionado ao triptofano, o N-acetil triptofano apareceu significativamente aumentado em pacientes com tumor estável de baixo risco (EB vs. EA), mas não em pacientes com tumor recorrente de alto risco (RB vs. RA). Juntos esses dados podem confirmar a ideia de que o triptofano pode ser usado como um biomarcador para a progressão da doença e, é particularmente confiável na detecção da doença em estágios iniciais.

Além dos aminoácidos e seus derivados discutidos anteriormente, outros metabólitos que se destacaram nesse trabalho foram leucina, os derivados metilados da lisina (N_ε,N_ε-dimetil lisina e N_ε,N_ε,N_ε-trimetil lisina) e da histidina (metil histidina).

A leucina apareceu aumentada na urina de pacientes com o tumor recorrente (para ambas as comparações EB vs. RB e EA vs. RA) e também em pacientes com tumor de baixo risco em pacientes recorrentes (RB vs. RA). Foi sugerido previamente no trabalho de Nishio

*et al.*¹⁸⁰ que a leucina pode promover o câncer de bexiga. Assim, indivíduos com recorrência da doença que tenham sofrido câncer ao menos uma vez anteriormente podem sofrer um acúmulo de leucina desde o início da doença, já que a concentração desse aminoácido é mais prevalente em pacientes no início da doença.

Os derivados metilados da lisina, Nε,Nε-dimetil lisina e Nε,Nε,Nε-trimetil lisina são componentes das histonas as quais são as principais proteínas que compõem o nucleossomo e têm um papel importante na regulação dos genes. Ambos os metabólitos também estão envolvidos na degradação da lisina e biossíntese da carnitina. Uma vez que tais metabólitos foram observados em urina em diferentes concentrações para os grupos avaliados, acreditamos ser mais provável que a diferença nas concentrações seja devido a alterações na degradação da lisina e biossíntese da carnitina, e não à regulação da histona. Além disso, Nε,Nε,Nε-trimetil lisina foi observada ter maior concentração em pacientes com a recorrência da doença do que pacientes com tumor estável de alto risco (EA vs. RA); tendência oposta àquela observada para os derivados da carnitina (heptanoil carnitina e 6-keto-decanoilcarnitina). Deste modo, podemos sugerir que embora a biossíntese da carnitina seja elevada em pacientes com a reincidência do câncer quando comparada a pacientes com tumor estável e de alto risco, mais carnitina é utilizada e assim, menos é excretada na urina. Ademais, Nε,Nε,Nε-trimetil lisina poderia tornar-se presente em uma concentração demasiadamente alta para a demanda da biossíntese carnitina e, conseqüentemente, o excesso seria excretado na urina desses doentes.

Nε,Nε- dimetil lisina destacou-se na comparação entre pacientes com tumor estável de alto e baixo risco (EB vs. EA) onde a concentração foi significativamente maior em pacientes com tumor de alto risco. Esta tendência foi a mesma que a encontrada para 6-ceto-decanoil carnitina, além das percentagens de câmbio serem semelhantes, -90,6 para Nε,Nε-dimetil lisina e -98,0 para 6-ceto-decanoil carnitina. Isto pode sugerir que esses metabólitos estão diretamente relacionados, por exemplo, se ambos são excretados em concentrações mais elevadas, pode ser que esta via não é mais utilizada e que todos os metabólitos acumulados de atividade anterior são excretados. Este seria o caso dos pacientes de alto risco.

Outros metabólitos com destaque foram hipoxantina e ácido úrico, os quais são relacionados ao metabolismo da purina por meio da xantina oxidoreductase (XOR, KEGG: EC 1.17.1.4, Figura 3.7), a qual catalisa a conversão de hipoxantina e xantina a ácido úrico.

Figura 3.7 – Esquema simbolizando parte do metabolismo da purina, com destaque para os metabólitos hipoxantina e ácido úrico e atuação da xantina oxidoreductase.

Fonte: Adaptado de KEGG. **Purine Metabolism** – Reference Pathway. Disponível em http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map00230 Acesso em: 03 jan 2014.¹⁸¹

A XOR foi descrita ter associações com imunidade e stress do oxigênio,^{182,183} os quais são características chave no câncer. Esses metabólitos, hipoxantina e ácido úrico, foram significativamente elevados em pacientes de baixo risco, sendo que a hipoxantina foi maior em pacientes com recorrência da doença e ácido úrico foi maior em pacientes estáveis. Com isso, podemos sugerir que XOR é responsável por controlar o equilíbrio entre estes dois metabólitos e que o regulamento é alterado com a recorrência da doença.

Com relação aos demais metabólitos diferencialmente expressos encontrados nesse trabalho, ainda que não pudemos apontar as vias metabólicas associadas ou sua relação com o câncer de bexiga, eles podem funcionar como biomarcadores para a doença. Assim, os possíveis marcadores para a estabilidade/reincidência da doença, bem como para a progressão do tumor encontrados nesse trabalho são exibidos na Tabela 3.4.

Tabela 3.4 – Metabólitos apontados como biomarcadores em potencial para o câncer de bexiga

<i>Estabilidade/Reincidência</i>		<i>Progressão</i>	
<i>Baixo Grau</i>	<i>Alto Grau</i>	<i>Estável</i>	<i>Reincidente</i>
Ácido 13S-hidroxiocetadecadienóico	N-acetil triptofano	Acetilcarnitina	N-acetil triptofano
Ácido 2,6,10-trimetil undecanóico	Ácido 13S-hidroxiocetadecadienóico	N-acetil triptofano	Ácido 3-amino-2-naftóico
Ácido úrico	Ácido 2,6,10-trimetil undecanóico	Ácido 3-amino-2-naftóico	Ácido 2,6,10-trimetil undecanóico
Carnosina	Betaína	Ácido 13S-hidroxiocetadecadienóico	Amida palmítica
6-Ceto-decanoilcarnitina	Carnosina	Betaína	6-Ceto-decanoilcarnitina
Decanoilcarnitina	6-Ceto-decanoilcarnitina	Carnosina	Dopaquinona
Galbeta1-4(NeuAcalfa2-3)Galbeta1-4Glcbeta-Cer(d18:1/18:0)/ GalNAcbeta1-4 (KDNalfa2-3)Galbeta1-4Glcbeta-Cer(d18:1/18:0)	Cistina	6-Ceto-decanoilcarnitina	Galbeta1-4(NeuAcalfa2-3)Galbeta1-4Glcbeta-Cer(d18:1/18:0)/ GalNAcbeta1-4 (KDNalfa2-3)Galbeta1-4Glcbeta-Cer(d18:1/18:0)
Galactol/Sorbitol/Manitol	Dopaquinona	Decanoilcarnitina	Galactol/Sorbitol/Manitol
Hepatanoil carntina	Hepatanoil carntina	Nε,Nε - Dimetil lisina	Hepatanoil carntina
Hipoxantina	Histidina	Dopaquinona	Hipoxantina
Leucina	Leucina	Fenilalanina	Histidina
	MG(0:0/16:1(9Z)/0:0)/ MG(16:1(9Z)/0:0/0:0)	Galactol/Sorbitol/Manitol	Leucina
	Tirosina	Galbeta1-4(NeuAcalfa2-3)Galbeta1-4Glcbeta-Cer(d18:1/18:0)/ GalNAcbeta1-4 (KDNalfa2-3)Galbeta1-4Glcbeta-Cer(d18:1/18:0)	Metilhistidina
	Nε,Nε,Nε-Trimetil lisina	Hepatanoil carntina	MG(0:0/16:1(9Z)/0:0)/ MG(16:1(9Z)/0:0/0:0)
		Histidina	Tirosina
		MG(0:0/16:1(9Z)/0:0)/ MG(16:1(9Z)/0:0/0:0)	Triptofano
		Tirosina	
		Triptofano	

5 Conclusões

Com o trabalho desenvolvido nesse capítulo foi possível encontrar biomarcadores em potencial para a reincidência e progressão do câncer de bexiga utilizando uma abordagem metabolômica. Esta pesquisa foi pioneira e relevante visto que utilizou uma abordagem metabolômica *untarget* realizada através de ferramentas analíticas de alta precisão e em urina. Além disso, poucos trabalhos relataram a busca de biomarcadores para a reincidência e progressão do câncer de bexiga. Ainda, a pesquisa forneceu um exemplo de como metabólitos obtidos em urina, uma matriz não invasiva, podem potencialmente auxiliar no prognóstico baseado na probabilidade da recorrência da doença, uma vez que as amostras foram coletadas antes da sua reincidência e foi possível discriminar entre pacientes com e sem a recorrência da doença.

Os modelos estatísticos supervisionados utilizados mostraram boa separação entre os grupos analisados para ambas as técnicas analíticas utilizadas, LC-MS e CE-MS, as quais demonstraram ser adequadas para o estudo realizado. Tais técnicas analíticas revelaram ser complementares, já que a grande maioria dos metabólitos foi encontrada com apenas uma delas. Deve-se ressaltar ainda o êxito na utilização de CE-MS nesse estudo, pois tal técnica na busca por biomarcadores para câncer de bexiga utilizando a abordagem metabolômica não foi relatada na literatura anteriormente.

Após o processamento dos dados foram obtidos 684 metabólitos por LC-MS e 75 por CE-MS, totalizando 759 compostos. O maior número de metabólitos obtidos por LC-MS deve-se à natureza inerente da cromatografia líquida, a qual pode abranger uma maior gama de compostos quando comparada à eletroforese.

Dos 759 compostos significativos encontrados, 26 deles foram confirmados e revelaram metabólitos de classes químicas distintas, com destaque para os aminoácidos e seus derivados. Considerando os diferentes grupos estudados sugerimos que dos 26 metabólitos confirmados 19 deles podem servir como possíveis marcadores para a reincidência do câncer de bexiga e 23 para a progressão do tumor.

Diversos dos metabólitos encontrados nesse estudo e sugeridos como possíveis marcadores não haviam sido antes relacionados ao câncer de bexiga. Outros, como histidina,

fenilalanina, tirosina e triptofano, já foram anteriormente apontados como biomarcadores para o diagnóstico da doença, entretanto, à medida que nossos dados mostram a relevância de cada um com relação à progressão e/ou recorrência do tumor, uma extensão para o conhecimento sobre a doença foi gerado nesse estudo.

Concluimos, portanto, que os metabólitos encontrados em urina e propostos como biomarcadores podem potencialmente auxiliar no prognóstico de reincidência da doença, bem como a forma de tratamentos personalizados no futuro.

Capítulo 4

Conclusões Gerais e Perspectivas Futuras

Este trabalho compreendeu um estudo de investigação analítica de potenciais biomarcadores para câncer de bexiga presentes em urina empregando duas abordagens ‘ômicas’: proteômica e metabolômica. A pesquisa forneceu um exemplo de como esta ciência, a qual abrange técnicas analíticas de *high-throughput*, estatística multivariada e ferramentas de bioinformática, auxiliam na descoberta dos possíveis marcadores não invasivos para o diagnóstico, reincidência e progressão da doença.

As técnicas analíticas utilizadas, em especial LC-MS, CE-MS e OFFGEL, mostraram-se adequadas e eficientes para a proposta apresentada. Utilizando eletroforese 2-DE e OFFGEL aliada à análise estatística multivariada demonstrou-se um perfil proteico distinto entre indivíduos controle e pacientes com câncer de bexiga. Igualmente, utilizando LC-MS e CE-MS e análise estatística multivariada, demonstrou-se padrões metabólicos distintos entre quatro diferentes grupos de pacientes com câncer de bexiga: *i*) pacientes com tumor estável e de baixo risco (EB); *ii*) pacientes com tumor recorrente e de baixo risco (RB); *iii*) pacientes com tumor estável e alto risco (EA) e *iv*) pacientes com tumor recorrente e de alto risco (RA). As técnicas LC-MS e CE-MS revelaram ser complementares, já que a grande maioria dos metabólitos foi encontrada com apenas uma delas. Deve-se ressaltar ainda o êxito na utilização de CE-MS nesse estudo, pois tal técnica não foi relatada anteriormente na literatura com uma abordagem metabolômica para a busca de biomarcadores para câncer de bexiga.

Deve ser destacada a importância da espectrometria de massas de alta resolução e precisão para identificação dos compostos, a qual foi imprescindível em todo o trabalho. As análises de proteínas realizadas por LC-MS e previamente fracionadas por eletroforese no OFFGEL permitiram a identificação de 47 proteínas no grupo de indivíduos controle, 20 proteínas no grupo de doentes e outras 18 em ambos os grupos com diferenças na expressão, totalizando 87 proteínas. Já com as técnicas de LC-MS e CE-MS empregadas na abordagem metabolômica foi possível identificar 19 metabólitos para reincidência e 23 metabólitos para progressão do câncer de bexiga.

Analogamente às técnicas analíticas de *high-throughput*, estatística multivariada e ferramentas de bioinformática desempenharam papéis importantes, pois permitiram que a grande quantidade de dados gerados pelas referidas técnicas fossem analisados. Com a utilização de métodos estatísticos não supervisionados (PCA) e supervisionados (PLS-DA e

OPLS-DA) foi possível discriminar entre diferentes grupos de indivíduos, avaliar a presença de *outliers* e determinar com confiança estatística quais variáveis influenciam nessa discriminação. Ainda, o emprego de banco de dados, como METLIN, HMDB, Uniprot e KEGG, para acesso de sequências e informações já relatadas permitiu o avanço do trabalho à medida que promoveu uma conexão entre os dados gerados por técnicas analíticas e sistemas biológicos (por exemplo, vias metabólicas).

Podemos considerar que esta pesquisa foi pioneira e relevante em muitos aspectos. Inicialmente, por empregar abordagens *untarget* e ferramentas analíticas nunca antes relatadas para a busca de biomarcadores para câncer de bexiga em urina, como eletroforese com OFFGEL em proteômica e CE-MS em metabolômica. Além disso, diversas das proteínas ou metabólitos encontrados nesse trabalho não foram relacionados ao câncer de bexiga, ou ainda, alguns compostos como histidina, fenilalanina, tirosina e triptofano, foram apenas relacionados ao diagnóstico da doença e, à medida que apontamos sua relevância com relação à progressão e/ou recorrência do tumor, uma extensão do conhecimento foi proporcionada. Outro ponto relevante a considerar é o fato de poucos trabalhos relatarem a busca de biomarcadores para a reincidência e progressão do câncer de bexiga e, especialmente para a recorrência do tumor, este trabalho apresentou grande êxito uma vez que foi capaz de discriminar entre pacientes com e sem a reincidência da doença antes que a mesma ocorresse, o que indica a possibilidade de prognóstico para a recorrência. Finalmente, o caráter não invasivo dos marcadores encontrados merece destaque visto que esses foram encontrados em urina, uma matriz que além de sua natureza não invasiva é de fácil acessibilidade, não expõe o paciente a procedimentos desconfortáveis o qual não tem sua rotina de tratamento alterada.

Assim, os resultados encontrados nesse trabalho são promissores uma vez que foi possível identificar diversos compostos que podem servir como biomarcadores. O presente estudo ilustrou como as ciências ‘ômicas’ podem potencialmente auxiliar no diagnóstico e prognóstico de doenças e contribuir para tratamentos personalizados no futuro.

Como mencionado anteriormente, a pesquisa realizada é promissora e abre perspectivas de trabalhos futuros. Uma possibilidade de extensão da pesquisa é estabelecer uma correlação entre as proteínas e os metabólitos diferencialmente expressos e as rotas bioquímicas envolvidas com tais moléculas. Desta forma, um entendimento maior da

bioquímica da doença poderá ser alcançado e, portanto, uma proposição mais contundente de potenciais biomarcadores para o câncer de bexiga poderá ser feita. No entanto, para isso devem ser utilizadas as mesmas amostras para obter o perfil proteico e metabólico dos indivíduos e, assim, estabelecer uma conexão entre os compostos.

Além disso, antes da implementação de um biomarcador, o mesmo necessita ser validado o que implica que o composto deve ser testado em uma população relevante para determinação da sua funcionalidade.

Enfim, outra possibilidade de pesquisa derivada do estudo realizado nessa tese é a construção de biosensores utilizando como alvo os biomarcadores propostos encontrados na urina. Com a utilização de sistemas microfluídicos de baixo custo, construídos com poliéster-toner ou papel hidrofílico (papel cromatográfico) e delimitado por barreiras hidrofóbicas (cera), tecnologia da qual o grupo BioMicS detém vasto conhecimento, é possível desenvolver dispositivos para diagnóstico e prognóstico do câncer de bexiga. Além da vantagem do baixo custo, o caráter não invasivo do teste o torna uma ferramenta extremamente útil e promissora.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 ISSAQ, H. J.; NATIVE, O.; WAYBRIGHT, T.; LUKE, B.; VEENSTRA, T. D.; ISSAQ, E. J.; KRAVSTOV, A.; MULLERAD, M. Detection of bladder cancer in human urine by metabolomic profiling using high performance liquid chromatography/mass spectrometry. **Journal of Urology**, v.179, p. 2422-2426, 2008.
- 2 WELTON, J. L.; KHANNA, S.; GILES, P. J.; BRENNAN, P.; BREWIS, I. A.; STAFFURTH, J.; MASON, M. D.; CLAYTON, A. Proteomics analysis of bladder cancer exosomes. **Molecular and Cellular Proteomics**, v. 9, p. 1324-1338, 2010.
- 3 CHEN, Y. T.; CHEN, C. L.; CHEN, H. W.; CHUNG, T.; WU, C. C.; CHEN, C. D.; HSU, C. W.; CHEN, M. C.; TSUI, K. H.; CHANG, P. L.; CHANG, Y. S.; YU, J. S. Discovery of novel bladder cancer biomarkers by comparative urine proteomics using iTRAQ technology. **Journal of Proteome Research**, v. 9, p. 5803-5815, 2010.
- 4 LIMA, C. L. M.; ALVES, P. M. C. **Tumor de Bexiga**. ABC da Saúde.2001. Disponível em: <<http://www.abcdasaude.com.br/artigo.php?433>>. Acesso em: 14 set. 2013.
- 5 INSTITUTO ONCOGUIA. **Câncer de Bexiga**. Oncoguia. 2012. Disponível em: <<http://www.oncoguia.org.br/cancer-home/cancer-de-bexiga/2/120>>. Acesso em: 14 set. 2013.
- 6 POMPEO, A. C. L.; CARRERETTE, F. B.; GLINA, S.; ORTIZ, V.; FERREIRA, U.; FONSECA, C. E. C.; WROCLAWSKI, E. R.; BRETAS, F. F. H.; SNITCOVSKY, I.; COELHO, J. M. C.; FONSECA, F. L. L.; BERGER, M.; MONTI, P. R.; MATHEUS, W. E.; CLARCK, O.; FREITAS, L. A. R. Câncer de bexiga – diagnóstico. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 54, p. 95-104, 2008.
- 7 BRASIL MINISTÉRIO DA SAÚDE. **TNM: classificação de tumores malignos**. Rio de Janeiro: INCA, 2004. p. 209.
- 8 NAT PERNICK, M.D. **Bladder Staging**. Pathology Outlines.com. 2011. Disponível em: <<http://www.pathologyoutlines.com/topic/bladderstaging.html>>. Acesso em: 21 set. 2013.
- 9 THOMPSON, E. G.; SEIFERT, A. L. **Cystoscopy of the Bladder**. Urology WebMD. 2010. Disponível em: <<http://www.webmd.com/cancer/bladder-cancer/cystoscopy-of-the-bladder>>. Acesso em: 18 set. 2013.

- 10 SHARIAT, S. F.; LOTAN, Y.; VICKERS, A.; KARAKIEWICZ, P. I.; SCHMITZ-DRÄGER, B. J.; GOEBELL, P. J.; MALATS, N. Statistical consideration for clinical biomarker research in bladder cancer. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, v. 28, p. 389-400, 2010.
- 11 RIFAI, N.; GILLETTE, M. A.; CARR, S. A. Protein biomarker discovery and validation: the long and uncertain path to clinical utility. **Nature Biotechnology**, v. 24, p. 971-983, 2006.
- 12 PEJCIC, M.; STOJNEV, S.; STEFANOVIC, V. Urinary proteomics – a tool for biomarker discovery. **Renal Failure**, v. 32, p. 259–268, 2010.
- 13 PEPE, M. S.; FENG, R. E. Z.; POTTER, J. D.; THOMPSON, M. L.; THORNQUIST, M.; WINGET, M.; YASUI, Y. Phases of Biomarker Development for Early Detection of Cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 93, p. 1054-1061, 2001.
- 14 ISSAQ, H. J.; FOX, S. D.; CHAN, K. C.; VEENSTRA, T. D. Global proteomics and metabolomics in cancer biomarker discovery. **Journal of Separation Science**, v. 34, p. 3484-3492, 2011.
- 15 HORVATOVICH, P.; GOVORUKHINA, N.; BISCHOFF, R. Biomarker discovery by proteomics: challenges not only for the analytical chemist. **Analyst**, v. 131, p. 1193–1196, 2006.
- 16 ATKINSON, A. J.; COLBURN, W. A.; DEGRUTTOLA, V. G.; DEMETS, D. L.; DOWNING, G. J.; HOTH, D. F.; OATES, J. A.; PECK, C. C.; SCHOOLEY, R. T.; SPILKER, B. A.; WOODCOCK, J.; ZEGGER, S. L. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. **Clinical pharmacology and Therapeutics**, v. 69, p. 89-95, 2001.
- 17 ZEFEROS, P. G.; VOUGAS, K.; DIMITRAKI, P.; KOSSIDA, S.; PETROLEKAS, A.; STRAVODIMOS, K.; GIANNOPOULOS, A.; FOUNTOULAKIS, M.; VLAHOU, A. Characterization of the human urine proteome by preparative electrophoresis in combination with 2-DE. **Proteomics**, v. 6, p. 4346-4355, 2006.
- 18 PIEPER, R.; GATLIN, C. L.; McGRATH, A. M.; MAKUSKY, A. J.; MONDAL, M.; SEONARAIN, M.; FIELD, E.; SCHATZ, C. R.; ESTOCK, M. A.; AHMED, N.; ANDERSON, N. G.; STEINER, S. Characterization of the human urinary proteome: A method for high-resolution display of urinary proteins on two-dimensional electrophoresis gels with a yield of nearly 1400 distinct protein spots. **Proteomics**, v. 4, p. 1159-1174, 2004.

- 19 ORENES-PIÑERO, E.; CORTÓN, M.; GONZÁLEZ-PERAMATO, P.; ALGABA, F.; CASAL, I.; SERRANO, A.; SÁNCHEZ-CARBAYO, M. Searching urinary tumor markers for bladder cancer using a two-dimensional differential gel electrophoresis (2D-DIGE) approach. **Journal of Proteome Research**, v. 6, p. 4440-4448, 2007.
- 20 PISITKUN, T.; JOHNSTONE, R.; KNEPPER, M. A. Discovery of urinary biomarkers. **Molecular and Cellular Proteomics**, v.5, p. 1760-1771, 2006.
- 21 DECRAMER, S.; DE PEREDO, A. G.; BREUIL, B.; MISCHAK, H.; MONSARRAT, B.; BASCANDS, J. L.; SCHANSTRAA, J. P. Urine in clinical proteomics. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 7, p. 1850 –1862, 2008.
- 22 BINNECK, E. As ômicas: Integrando a bioinformação. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 32, p. 28-37, 2004.
- 23 BARALLOBRE-BARREIRO, J.; CHUNG, Y.; MAYR, M. Proteomics and metabolomics for mechanistic insights and biomarker discovery in cardiovascular disease. **Revista Española de Cardiología**, v. 66, p. 657–661, 2013.
- 24 IOANNIDIS, J. P. A. Expectations, validity, and reality in omics. **Journal of Clinical Epidemiology**, v. 63, p.945-949, 2010.
- 25 ROSENBLUM, D.; PEER, D. Omics-based nanomedicine: The future of personalized oncology. **Cancer Letters**, Article in press, 2013.
- 26 LAY JR, J. O.; BORGMANN, S.; LIYANAGE, R.; WILKIN, C. L. Problems with the “omics”. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 25, p. 1046-1056, 2006.
- 27 SEMMES, O. J. The “omics” haystack: defining sources of sample bias in expression profiling. **Clinical Chemistry**, v. 51, p. 1571-1572, 2005.
- 28 SCHNEIDER, M. V.; ORCHARD, S. Omics technologies, data and bioinformatics principles. In: MAYER, B. (Ed.) **Bioinformatics for omics data: methods and protocols**, Methods in Molecular Biology. Vienna: Springer Science and Business Media, 2011. v. 719, p. 3-30.
- 29 KARAS, M.; HILLENKAMP, F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. **Analytical Chemistry**, v. 60, p. 2299-2301, 1988.

- 30 FENN, J. B.; MANN, M.; MENG, C. K.; WONG, S. F. WHITEHOUSE, C. M.;
Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. **Science**, v. 246,
p. 64-71, 1989.
 - 31 HOFFMANN, E.; STROOBANT, V. **Mass spectrometry: principles and**
Applications. New York: Wiley, 2007a, 43 p.
 - 32 GATES, P. **Electrospray ionisation (ESI)**. The University of Bristol, School of
Chemistry. 2004. Disponível em: <[http://www.chm.bris.ac.uk/ms/theory/esi-](http://www.chm.bris.ac.uk/ms/theory/esi-ionisation.html)
[ionisation.html](http://www.chm.bris.ac.uk/ms/theory/esi-ionisation.html)>. Acesso em: 10 out. 2013.
 - 33 HOFFMANN, E.; STROOBANT, V. **Mass spectrometry - principles and**
Applications. New York: Wiley, 2007b, 33 p.
 - 34 HENDRICKSON, C. **Matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI)**.
Magnet lab. 2004. Disponível em <
http://www.magnet.fsu.edu/education/tutorials/tools/ionization_maldi.html>. Acesso
em: 10 out. 2013.B(34)
 - 35 BAINS, W. Company strategies for using bioinformatics. **Trends in biotechnology**,
v. 14, p. 312-317, 1996.
 - 36 TAULE, R. “OMICS” special issue for chemistry and intelligent laboratory systems.
Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, v. 104, p. 1-1, 2010.
 - 37 ERIKSSON, L.; ANTTI, H.; GOTTFRIES, J.; HOLMES, E.; JOHANSSON, E.,
LINDGREN, F.; LONG, I; LUNDSTEDT, T.; TRYGG, J.; WOLD, S. Using
chemometrics for navigating in the large data sets of genomics, proteomics, and
metabonomics (gpm). **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 380, p. 419–429,
2004.
 - 38 KUSSMANN. M.; RAYMOND, F.; AFFOLTER, M. OMICS-driven biomarker
discovery in nutrition and health. **Journal of Biotechnology**, v. 124, p. 758–787,
2006.
 - 39 ERIKSSON, L.; JOHANSSON, E.; Kettaneh-Wold, N.; Wold, S. **Multi- and**
megavariate data analysis: principles and applications. Umeå: Umetrics, 2001, 425
p.
 - 40 LINDON, J. C.; NICHOLSON, J. K. Spectroscopic and statistical techniques for
information recovery in metabonomics and metabolomics. **Annual Review of**
Analytical Chemistry, v. 1, p. 45-69, 2008.
-

- 41 WESTERHUIS, J. A.; van VELZEN, E. J. J.; HOEFSLOOT, H. C. J, SMILDE, A. K., Multivariate paired data analysis: multilevel PLSDA versus OPLSDA. **Metabolomics**, v. 6, p. 119-128, 2010.
 - 42 BOCCARD, J.; RUTLEDGE, D. N. A consensus orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) strategy for multiblock omics data fusion. **Analytica Chimica Acta**, v. 769, p. 30-39, 2013.
 - 43 NING, Z.; ZHOU, H.; WANG, F.; ABU-FARHA, M.; FIGEYS, D. Analytical aspects of proteomics: 2009_2010. **Analytical Chemistry**, v. 83, p. 4407–4426, 2011.
 - 44 LÓPEZ, J.L. Two-dimensional electrophoresis in proteome expression analysis. **Journal of Chromatography B**, v. 849, p.190-202, 2007.
 - 45 WESTERMEIER, R.; NAVEN, T. **Electrophoresis in Practice**: a laboratory manual of proteome analysis: Freiburg, Wiley-Blackwell, 2005, p. 27-32.
 - 46 KEIDEL, E. M.; DOSCH, D.; BRUNNER, A.; KELLERMANN, J.; LOTTSPREICH, F. Evaluation of protein loading techniques and improved separation in OFFGEL isoelectric focusing. **Electrophoresis**. v. 32, p. 1659–1666, 2011.
 - 47 PRECKEL, T. **Novel prefractionation technology enables more protein identifications**. Agilent Technologies. 2000. Disponível em: http://www.chem.agilent.com/cag/Pharmanews/Pharma18/newsletter.asp?page=PN_18_F4_OFFGEL.html>. Acesso em: 21 nov. 2013.
 - 48 KELLEHER, N. L.; LIN, H. Y.; VALASKOVIC, G. A.; AASERUD, D. J.; FRIDRIKSSON, E. K.; MCCLAFFERTY, F. W. Top down *versus* bottom up protein characterization by tandem high-resolution mass spectrometry. **Journal of the American Chemical Society**, v. 121, p. 806-812, 1999.
 - 49 BOGDANOV, B.; SMITH, R. Proteomics by FTICR mass spectrometry: Top down and Bottom up. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 24, p. 168-200, 2005.
 - 50 ANDERSON, N. G.; ANDERSON, N. L; TOLLAKSEN, S. L. Proteins of human urine. I. Concentration and analysis by two-dimensional electrophoresis. **Clinical Chemistry**, v. 25, p. 1199-1210, 1979.
 - 51 LAFITTE, D.; DUSSOL, BERTRAND.; ANDERSEN, S.; VAZI, A.; DUPUY, P.; JENSEN, O. N.; BERLAND, Y.; VERDIER, J.-M. Optimized preparation of urine samples for two-dimensional electrophoresis and initial application to patient samples. **Clinical Biochemistry**, v. 35, p. 581–589, 2002.
-

- 52 BARBORO, P.; RUBAGOTTI, A.; ORECCHIA, P.; SPINA, B.; TRUININ M.; REPACI, E.; CARMIGNANI, G.; ROMAGNOLI, A.; INTROINI, C.; BOCCARDO, F.; CARNEMOLLA, B.; BALBI, C. Differential proteomic analysis of nuclear matrix in muscle-invasive bladder cancer: potential to improve diagnosis and prognosis. **Cellular Oncology**, v. 30, p.13-26, 2008.
- 53 GROSSMAN, H. B.; MESSING, E.; SOLOWAY, M.; TOMERA, K.; KATZ, G.; BERGER, Y.; SHEN, Y.; Detection of bladder cancer using a point-of-care proteomic assay. **Journal of the American Medical Association**, v. 293, p. 810-816, 2005.
- 54 HIDEAKI, I.; SUSUMU, K.; TAKAHIRO, I.; YOSHIHIKO, W.; YUSAKU, O.; KOJI, Y.; AKITO, T.; YOICHI, A.; HIROSHI, I.; MUTSUSHI, K.; TATSUHIRO, Y. Diagnostic potential in bladder cancer of a panel of tumor markers (calreticulin, γ -synuclein, and catechol-o-methyltransferase) identified by proteomic analysis. **Cancer Science**, v. 95, p. 955-961, 2004.
- 55 SUSUMU, K.; TAKAHIRO, I.; HIDEAKI, I.; YOSHIHIKO, W.; YUSAKU, O.; KEIICHI, K.; KOJI, Y.; AKITO, T.; YOICHI, A.; TATSUHIRO, Y. Identification by proteomic analysis of calreticulin as a marker for bladder cancer and evaluation of the diagnostic accuracy of its detection in urine. **Clinical Chemistry**, v. 50, p. 857-866, 2004.
- 56 SAITO, M.; KIMOTO, M.; ARAKI, T.; SHIMADA, Y.; FUJII, R.; OOFUSA, K.; HIDE, M.; USUI, T.; YOSHIZATO, K. Proteome analysis of gelatin-bound urinary proteins from patients with bladder cancers. **European Urology**, v. 48, p. 865-71, 2005.
- 57 CUI, L.; WANG, Y.; SHI, Y.; ZHANG, Z.; XIA, Y.; SUN, H.; WANG, S.; CHEN, J.; ZHANG, W.; LU, Q.; SONG, L.; WEI, Q.; ZHANG, R.; WANG, X. Overexpression of annexin a1 induced by terephthalic acid calculi in rat bladder cancer. **Proteomics**, v. 7, p. 4192-4202, 2007.
- 58 SMALLEY, D. M.; SHEMAN, N. E.; NELSON, K.; THEODORESCU, D. Isolation and identification of potential urinary microparticle biomarkers of bladder cancer. **Journal of Proteome Research**, v. 7, p. 2088-2096, 2008.
- 59 SCHWAMBORN, K.; KRIEG, R. C.; GROSSE, J.; REULEN, N.; WEISKIRCHEN, R.; KNUECHEL, R.; JAKSE, G.; HENKEL, C. Serum proteomic profiling in patients with bladder cancer. **European Urology**, v. 56, p. 989-997, 2009.

- 60 MINAMI, S.; SATO, Y.; MATSUMOTO, T.; KAGEYAMA, T.; KAWASHIMA, Y.; YOSHIO, K.; ISHII, J.; MATSUMOTO, K.; NAGASHIO, R.; OKAYASU, I. Proteomic study of sera from patients with bladder cancer: usefulness of S100A8 and S100A9 proteins. **Cancer Genomics and Proteomics**, v. 7, p. 181-190, 2010.
- 61 LINDÉN, M.; LIND, S. B.; MAYRHOFFER, C.; SEGERSTEN, U.; WESTER, K.; LYUTVINSKIY, Y.; ZUBAREV, R.; MALMSTRÖM, P.-U.; PETTERSSON, U. Proteomic analysis of urinary biomarker candidates for nonmuscle invasive bladder cancer. **Proteomics**, v. 12, p. 135-144, 2012.
- 62 CHEN, C.-L.; LIN, T.-S.; TSAI, C.-H.; WUE, C.-C.; CHUNG, T.; CHIEN, K.-Y.; WU, M.; CHANG, Y.-S.; YU, J.-S. Identification of potential bladder cancer markers in urine by abundant-protein depletion coupled with quantitative proteomics. **Journal of Proteomics**, v. 85, p. 28-43, 2013.
- 63 WU, T.-F.; WU, H.; CHOW, N.-H.; LIAO, C.-F.; LIU, H.-S. Proteomic analysis of bladder cancer cells reveals potential candidates of biomarkers in bladder tumorigenesis. **Cancer Genomics and Proteomics**, v. 2, p. 151-157, 2005.
- 64 MEMON, A. A.; CHANG, J. W.; OH, B. R.; YOO, Y. J.; Identification of differentially expressed proteins during human urinary bladder cancer progression. **Cancer Detection and Prevention**, v. 29, p. 249-255, 2005.
- 65 KAWANISHI, H.; MATSUI, Y.; ITO, M.; WATANABE, J.; TAKAHASHI, T.; NISHIZAWA, K.; NISHIYAMA, H.; KAMOTO, T.; MIKAMI, Y.; TANAKA, Y.; JUNG, G.; AKIYAMA, H.; NOBUMASA, H.; GUILFORD, P.; REEVE, A.; OKUNO, Y.; TSUJIMOTO, G.; NAKAMURA, E.; OGAWA, O. Secreted CXCL1 is a potential mediator and marker of the tumor invasion of bladder cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 14, p. 2579-2587, 2008.
- 66 GRAU, L.; LUQYE-GARCIA, J. L.; GONZÁLEZ-PERAMATO, P.; THEODORESCU, D.; PALOU, J.; FERNANDEZ-GOMEZ, J. M.; SÁNCHEZ-CARBAYO, M. A Quantitative proteomic analysis uncovers the relevance of CUL3 in bladder cancer aggressiveness. **PLoS ONE**, v. 8, p. 1-13, 2014.
- 67 FELDMAN, A. S.; BANYARD, J.; WU, C.-L.; MCDUGAL, W. S.; ZETTER, B. R. Cystatin B as a tissue and urinary biomarker of bladder cancer recurrence and disease progression. **Clinical Cancer Research**, v. 15, p. 1024-1031, 2009.

- 68 CHEN, Y.-T.; CHEN, H.-W.; DOMANSKI, D.; SMITH, D. S.; Liang, K.-H.; WU, C.-C.; CHEN, C.-L.; CHUNG, T.; CHEN, M.-C.; CHANG, Y.-S.; PARKER, C. E. BORCHERS, C. H. Multiplexed quantification of 63 proteins in human urine by multiple reaction monitoring-based mass spectrometry for discovery of potential bladder cancer biomarkers. **Journal of Proteomics**, v. 75, p. 3529-3545, 2012.
- 69 GUNES, M.; GECIT, I.; PIRINCCI, N.; KEMIK, A. S.; PURISA, S.; CEYLAN, K.; ASLAN, M. Plasma human neutrophil proteins-1, -2, and -3 levels in patients with bladder cancer. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 139, p. 195-199, 2013.
- 70 HOLTEN-ANDERSEN, M. N.; BRÜNNER, N.; NIELSEN, H. J.; CHRISTENSEN, I. J.; MOLLER SORENSEN, N.; SCHROHL RASMUSSEN, A.-S.; PRIMDAL, H.; ØRNTTOFT, T. Levels of tissue inhibitor of metalloproteinases 1 in plasma and urine from patients with bladder cancer. **International Journal of Biological Markers**, v. 21, p. 6-11, 2006.
- 71 BERENDSEN, C. L.; MULDER, T. P. J.; PETERS, W. H. M. Plasma glutathione S-transferase π 1-1 and α 1-1 levels in patients with bladder cancer. **Journal of Urology**, v. 164, p. 2126-2128, 2000.
- 72 LI, F.; CHEN, D.-N.; HE, C.-W.; ZHOU, Y.; OLKKONEN, V. M.; HE, N.; CHEN, W.; WAN, P.; CHEN, S.-S.; ZHU, Y.-T.; LAN, K.-J.; TAN, W.-L. Identification of urinary Gc-globulin as a novel biomarker for bladder cancer by two-dimensional fluorescent differential gel electrophoresis (2D-DIGE). **Journal of Proteomics**, v. 77, p. 225-236, 2012.
- 73 KREUNIN, P.; ZHAO, J.; ROSSER, C.; URQUIDI, V.; LUBMAN, D.M.; GOODISON, S. Bladder cancer associated glycoprotein signatures revealed by urinary proteomic profiling. **Journal of Proteome Research**, v. 6, p. 2631-2639, 2007.
- 74 CHEN, C.-L.; LA, Y.-F.; TANG, P.; CHIEN, K.-Y.; YU, J.-S.; TSAI, C.-H.; CHEN, H.-W.; WU, C.-C.; CHUNG, T.; HSU, C.-W.; CHEN, C.-D.; CHANG, Y.-S.; CHANG, P.-L.; CHEN, Y.-T. Comparative and targeted proteomic analyses of urinary microparticles from bladder cancer and hernia patients. **Journal of Proteome Research**, v. 11, p. 5611-5629, 2012.
- 75 RUPPEN, I.; GRAU, L.; ORENES-PIÑERO, E.; ASHMAN, K.; GIL, M.; ALGABA, F.; BELLMUNT, J.; SÁNCHEZ-CARBAYO, M. Differential protein expression profiling by iTRAQ-two-dimensional LC-MS/MS of human bladder cancer EJ138 cells transfected with the metastasis suppressor KiSS-1 gene. **Molecular and Cellular Proteomics**, v. 9, p. 2276-2291, 2010.
-

- 76 ZHANG, M.; MENG, Q.; LEI, T.; ZHANG, M.; ZHAO, J.; ZHAO, X.-H., Identification of proteins differentially expressed in adriamycin-resistant (pumc-91/ADM) and parental (pumc-91) human bladder cancer cell lines by proteome analysis. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 139, p. 509-519, 2013.
- 77 ZHANG, H.-H.; QI, F.; ZU, X.-B.; CAO, Y.-H.; MIAO, J.-G.; XU, L.; QI, L.; A proteomic study of potential VEGF-C-associated proteins in bladder cancer T24 cells. **Medical Science Monitor**, v. 18, p. BR441-BR449, 2012.
- 78 JIN, B. Y.; FU, G. H.; JIANG, X.; PAN, H.; ZHOU, D. K.; WEI, X. Y.; ZHOU, L.; CHUNG, L.; ZHENG, S. S. CRABP2 and FABP5 identified by 2D DIGE profiling are upregulated in human bladder cancer. **Chinese Medical Journal**, v. 126, p. 3787-3789, 2013.
- 79 KONETY, B. R.; NGUYEN, T. S.; DHIR, R.; DAY, R. S.; BECICH, M. J.; STADLER, W. M.; GETZENBERG, R. H. Detection of bladder cancer using a novel nuclear matrix protein, BLCA-4. **Clinical Cancer Research**, v. 6, p. 2618-2625, 2000.
- 80 MORGAN, R.; BRYAN, R. T.; JAVED, S.; LAUNCHBURY, F.; ZEEGERS, M. P.; CHENG, K. K.; JAMES, N. D.; WALLACE, D. M.; HURST, C. D.; WARD, D. G.; KNOWLES, M. A.; PANDHA, H. Expression of Engrailed-2 (EN2) protein in bladder cancer and its potential utility as a urinary diagnostic biomarker. **European Journal of Cancer**, v. 49, p.2214-2222, 2013.
- 81 MIYMOTO,H.; MILLER, J. S.; FAJARDO, D.; LEE, T. K.; NETTO,G. J.; EPSTEIN, J. I. Non-invasive papillary urothelial neoplasms: The 2004 WHO/ISUP classification system. **Pathology International**, v. 60, p. 1-8, 2010.
- 82 SUN, L.; ZHU, G.; DOVICH, N. J. Comparison of the LTQ-Orbitrap velos and the Q-Exactive for proteomic analysis of 1-1000 ng RAW 264.7 cell lysate digests. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 27, p. 157-162, 2012.
- 83 JACOBS, D.; VAN RIJSSEN, M.; VAN DER HEIJDEN, R.; VERPOORTE, R. Sequential solubilization of proteins precipitated with trichloroacetic acid in acetone from cultured *Catharanthus roseus* cells yields 52% more spots after two-Dimensional electrophoresis. **Proteomics**, v. 1, p. 1345-1350, 2001.
- 84 NANDAKUMAR, M. P.; SHEN, J.; RAMAN, B.; MARTEN, M. Solubilization of trichloroacetic acid (TCA) arecipitated microbial proteins via NaOH for two-dimensional electrophoresis. **Journal of Proteome Research**, v. 2, p. 89-93, 2003.
-

- 85 YVON, M.; CHABANET, C.; PÉLISSIER, J. P. Solubility of peptides in trichloroacetic acid (TCA) solutions. Hypothesis on the precipitation mechanism. **International Journal of Peptide and Protein Research**, v. 34, p. 166-176, 1989.
- 86 THONGBOONKERD, V.; CHUTIPONGTANATE, S.; KANLAYA, R. Systematic evaluation of sample preparation methods for gel-based human urinary proteomics: quantity, quality, and variability. **Journal of Proteome Research**, v. 5, p. 183-191, 2006.
- 87 MAGISTRONI, R.; LIGABUE, G.; LUPO, V.; FURCI, L.; LEONELLI, M.; MAGANELLI, L.; MASELLIS, M.; GATTI, V.; CAVAZZINI, F.; TIZZANINI, W.; ALBERTAZZI, A. Proteomic analysis of urine from proteinuric patients shows a proteolytic activity directed against albumin. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 24, p. 1672–1681, 2009.
- 88 KOBAYASHI, Cláudia Ayumi. **Análise proteômica em urina e rim de ratos submetidos a tratamento crônico com flúor**. 2008. 143 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Oral) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2008.
- 89 SUZUKI, M.; WIERS, K.; BROOKS, E. B.; GREIS, K. D.; HAINES, K.; KLEINGITELMAN, M. S.; OLSON, J.; ONEL, K.; O'NEIL, K. M.; SILVERMAN, E. D.; TUCKER, L.; YING, J.; DEVARAJAN, P.; BRUNNER, H. I. Initial validation of a novel protein biomarker panel for active pediatric lupus nephritis. **Pediatric Research**, v. 65, p. 530-536, 2009.
- 90 AFKARIAN, M.; BHASIN, M.; DILLON, S. T.; GUERRERO, M. C.; NELSON, R. G.; KNOWLER, W. C.; THADHANI, R. LIBERMANN, T. A. Optimizing a proteomics platform for urine biomarker discovery. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 9, p. 2195-2204, 2010.¶
- 91 CANTÚ, M. D.; CARRILHO, E. Sequenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático. **Química Nova**, v. 31, p. 669-675, 2008.
- 92 PIRINÇCI, N.; GEÇIT, I.; GÜNEŞ, M.; YÜKSEL, M. B.; KABA, M.; TANIK, S.; DEMIR, H.; ASLAN, M. Serum adenosine deaminase, catalase and carbonic anhydrase activities in patients with bladder cancer. **Clinics**, v. 67, p. 1443-1446, 2012.
-

- 93 MALENTACCHI, F.; VINCI, S.; MELINA, A. D.; KUNCOVA, J.; VILLARI, D.; GIANNARINI, G.; NESI, G.; ORLANDO, C. Splicing variants of carbonic anhydrase IX in bladder cancer and urine sediments. **Urologic Oncology**, v. 3, p. 278-284, 2012.
- 94 KLATTE, T.; SELIGSON, D. B.; RAO, J. Y.; YU, H.; DE MARTINO, M.; KAWAOKA, K.; WONG, S. G.; BELLDEGRUN, A. S.; PANTUCK, A. J. Carbonic anhydrase IX in bladder cancer: a diagnostic, prognostic, and therapeutic molecular marker. **Cancer**, v. 115, p. 1448-1458, 2009.
- 95 IRMAK, S.; TILKI, D.; HEUKESHOVEN, J.; OLIVEIRA-FERRER, L.; FRIEDRICH, M.; HULAND, H.; ERGÜN, S. Stage-dependent increase of orosomucoid and zinc-alpha2-glycoprotein in urinary bladder cancer. **Proteomics**, v. 5, p. 4296-4304, 2005.
- 96 LEI, T.; ZHAO, X.; JIN, S.; MENG, Q.; ZHOU, H.; ZHANG, M. Discovery of potential bladder cancer biomarkers by comparative urine proteomics and analysis. **Clinical Genitourinary Cancer**, v. 11, p. 56-62, 2013.
- 97 RASMUSSEN, H. H.; ØRNTØFT, T. F.; WOLF, H.; CELIS, J. E. Towards a comprehensive database of proteins from the urine of patients with bladder cancer. **The Journal of Urology**, v. 155, p. 2113-2119, 1996.
- 98 RAYSON, D.; VANTYGHM, S. A.; CHAMBERS, A. F. Angiogenesis as a target for breast cancer therapy. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 4, p. 415-423, 1999.
- 99 BOUDIAF-BENMAMMAR, C.; CRESTEIL, T.; ELKI, R. The cytosolic chaperonin CCT/TRiC and cancer cell proliferation. **Plos One**, v. 8, p. 1-10, 2013.
- 100 BERTOLINI, F. Adipose tissue and breast cancer progression: A link between metabolism and cancer. **Breast**, v. 22, p. S48-S49, 2013.
- 101 ZARUBIN, T.; JING, Q.; NEW, L.; HAN, J. Identification of eight genes that are potentially involved in tamoxifen sensitivity in breast cancer cells. **Cell Research**, v. 15, p. 439-446, 2005.
- 102 PIRCHER, A.; FIEGL, M.; UNTERGASSER, I.; MEDINGER, M.; KERN, J.; HILBE, W. Favorable prognosis of operable non-small cell lung cancer (NSCLC) patients harboring an increased expression of tumor endothelial markers (TEMs). **Lung Cancer**, v. 81, p. 252-258, 2013.

- 103 GÖRN, M.; ANIGE, M.; BURKHOLDER, I.; MÜLLER, B.; SCHEFFLER, A.; EDLER, L.; BOETERS, I.; PANSE, J.; SCHUCH, G.; HOSSFELD, D. K.; LAACK, E.; Serum levels of Magic Roundabout protein in patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). **Lung Cancer**, v. 49, p. 71-76, 2005.
- 104 BERSINGER, N.A.; SCHNEIDER, B.; VORBURGER, S.A.; JOHANN, S.; CANDINAS, D.; MUELLER, M.D. Prognostic value of tumour endothelial markers in patients with endometrial cancer. **Oncology Letters**, v. 1, p. 203-207, 2010.
- 105 ZHANG, Z.-Y.; ZHANG, H.; ADELL, G.; SUN, X.-F. Endosialin expression in relation to clinicopathological and biological variables in rectal cancers with a Swedish clinical trial of preoperative radiotherapy. **BMC Cancer**, v. 11, p. 1-9, 2011.
- 106 SASAROLI, D.; COUKOS, G.; SCHOLLER, N. Beyond CA125: The coming of age of ovarian cancer biomarkers. **Biomarkers in Medicine**, v. 3, p. 275-288, 2009.
- 107 DAI, C. F.; JIANG, Y. Z.; LI, Y.; WANG, K.; LIU, P. S.; PATANKAR, M. S.; ZHENG, J. Expression and roles of Slit/Robo in human ovarian cancer. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 135, p. 475-485, 2011.
- 108 GRIVIVIVH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. Morte celular por apoptose (Apoptosis: Programmed Cell Death). **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, p. 335-343, 2007.
- 109 KOYA, R. C.; FUJITA, H.; SHIMIZU, S.; OHTSU, M.; TAKIMOTO, M.; TSUJIMOTO, Y.; KUZUMAKI, N. Gelsolin inhibits apoptosis by blocking mitochondrial membrane potential loss and cytochrome c release. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 15343-9, 2000.
- 110 KUSANO, H.; SHIMIZU, S.; KOYA, R. C.; FUJITA, H.; KAMADA, S.; KUZUMAKI, N.; TSUJIMOTO, Y. Human gelsolin prevents apoptosis by inhibiting apoptotic mitochondrial changes via closing VDAC. **Oncogene**, v. 19, p. 4807-14, 2000.
- 111 ZHOU, H.; PISITKUN, T.; APONTE, A.; YUEN, P. S. T.; HOFFERT, J. D.; YASUDA, H.; HU, X.; CHAWLA, L.; SHEN, R-F.; KNEPPER, M. A. STAR, R. A. Exosomal fetuin-A identified by proteomics: A novel urinary biomarker for detecting acute kidney injury. **Kidney International**, v. 70, p. 1847-1857, 2006.

- 112 RADOSAVLJEVIC, G.; VOLAREVIC, V.; JOVANOVIĆ, I.; MILOVANOVIC, M.; PEJNOVIC, N.; ARSENIJEVIC, N.; HSU, D. K.; LUKIC, M. L. The roles of Galectin-3 in autoimmunity and tumor progression. **Immunologic Research**, v. 52, p. 100–110, 2012.
- 113 RETICKER-FLYNN, N. E.; MALTA, D. F.; WINSOL, M. M.; LAMAR, J. M.; XU, M. J.; UNDERHILL, G. H.; HYNES, R. O.; JACKS, T. E.; BHATIA, S. N. A combinatorial extracellular matrix platform identifies cell-extracellular matrix interactions that correlate with metastasis. **Nature Communications**, v. 3, p. 1-12, 2012.
- 114 ZHAO, Q.; GUO, X.; NASH, G. B.; STONE, P. C.; HILKENS, J.; RHODES, J. M.; YU, L. G. Circulating galectin-3 promotes metastasis by modifying MUC1 localization on cancer cell surface. **Cancer Research**, v. 69, p. 6799–6806, 2009.
- 115 CULLY, M.; SHIU, J.; PIEKORZ, R. P.; MULLER, W. J.; DONE, S. J.; MAK, T. W. Transforming acidic coiled coil 1 promotes transformation and mammary tumorigenesis. **Cancer Research**, v. 65, p. 10363-10370, 2005.
- 116 HA, G.-H.; KIM, J.-L.; BREUER, E.-K. Y. Transforming acidic coiled-coil proteins (TACCs) in human cancer. **Cancer Letters**, v. 336, p. 24–33, 2013.
- 117 DEMIR, C.; DEMIR, H.; ESEN, R.; ATMACA, M.; TAGDEMIR, E. Erythrocyte catalase and carbonic anhydrase activities in acute leukemias. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 11, p. 247-250, 2010.
- 118 IVANOV, S.; LIAO, S. Y.; IVANOVA, A.; DANILKOVITCH-MIAGKOVA, A.; TARASOVA, N.; WEIRICH, G.; MERRILL, M. J.; PROESCHOLDT, M.A.; OLDFIELD, E. H.; LEE, J.; ZAVADA, J.; WAHEED, A.; SLY, W.; LERMAN, M. I.; STANBRIDGE. Expression of hypoxia-inducible cell surface transmembrane carbonic anhydrases in human cancer. **American Journal of Pathology**, v. 158, p. 905-919, 2001.
- 119 FELIPPE JUNIOR, J. **Câncer e acetazolamida**: inibe a proliferação celular maligna, aumenta a apoptose, inibe a neoangiogênese e diminui a invasão tumoral e as metástases. Associação Brasileira de Medicina Complementar. 2008. Disponível em: < <http://www.medicinacomplementar.com.br/tema070108.asp>>. Acesso em 27 jan. 2014.
- 120 JEVNIKAR, Z.; KOS, J. **CTSB (cathepsin B)**. Atlas of genetics and cytogenetics in oncology and haematology. 2009. Disponível em < <http://AtlasGeneticsOncology.org/Genes/CTSBID40202ch8p23.html>>. Acesso em 27 jan. 2014.
-

- 121 HALACHMI, S.; LINN, J. F.; AMIEL, G. E.; MOSKOVITZ, B.; NATIV, O. Urine cytology, tumor markers and bladder cancer. **British Journal of Urology**, v. 82, p. 647-654, 1998.
- 122 PEĆINA-ŠLAUS, N Tumor suppressor gene E-cadherin and its role in normal and malignant cells. **Cancer Cell International**, v. 3, p. 1-7, 2003.
- 123 SEMB, H.; CHRISTOFORI, G. The tumor-suppressor function of E-cadherin. **American Journal of Human Genetics**, v. 63, p. 1588-1593, 1998.
- 124 FRANTZI, M.; ZOIDAKIS, J.; PAPADOPOULOS, T.; ZÜRBIG, P.; KATAFIGIOTIS, I.; STRAVODIMOS, K.; LAZARIS, A.; GIANNOPOULPU, I.; PLOUMIDIS, A.; MISCHAK, H.; MULLEN, W.; VLAHOU, A. IMAC. Fractionation in combination with LC-MS reveals H2B and NIF-1 as potential bladder cancer biomarkers. **Journal of Proteomic Research**, v. 12, p. 3969-3979, 2013.
- 125 PORTELA, A.; ESTELLER, M. Epigenetic modifications and human disease. **Nature Biotechnology**, v. 28, p. 1057-1068, 2010.
- 126 MENDITI, K. B. C.; KANG, H. C. O papel das proteínas histonas nas neoplasias hematológicas (The role of histones proteins in hematological neoplasias). **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, p. 453-460, 2007.
- 127 CASTAGNA, A.; CECCONI, D.; SENNELS, L.; RAPPSILBER, J.; GUERRIER, L.; FORTIS, F.; BOSCHETTI, E.; LOMAS, L.; RIGHETTI, P. G. Exploring the hidden human urinary proteome via ligand library beads. **Journal of Proteome Research**, v. 4, 1917-1930, 2005.
- 128 PISITKUN, T.; SHEN, R.-F.; KNEPPER, M. A. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. **PNAS**, v. 101, p. 13368-13373, 2004.
- 129 PATTI, G. J.; YANES, O.; SIUZDAK, G. Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 13, p. 263-269, 2012.
- 130 OLIVER, S. G.; WINSON, M. K.; KELL, D. B.; BAGANZ, F. Systematic functional analysis of the yeast genome. **Trends in Biotechnology**, v. 16, p. 373-378, 1998.
- 131 RAMAUTAR, R.; BERGER, R.; VAN DER GREEF, J.; HANKEMEIER, T. Human metabolomics: strategies to understand biology. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 17, p. 841-846, 2013.
-

- 132 BUNDY, J. G.; DAVEY, M. P.; VIAN, M. R. Environmental metabolomics: A critical review and future perspectives. **Metabolomics**, v. 5, p. 3-21, 2009.
- 133 LANKADURAI, B. P. NAGATO, E. G.; SIMPSON, M. J. Environmental metabolomics: An emerging approach to study organism responses to environmental stressors. **Environmental Reviews**, v. 21, p. 180-205, 2013.
- 134 ROBERTSON, D.G.; WATKINS, P. B.; REILY, M. D. Metabolomics in toxicology: Preclinical and clinical applications. **Toxicological Sciences**, v. 120, p. S146-S170, 2011.
- 135 LLORACH, R.; GARCIA-ALOY, M.; TULIPANI, S.; VAZQUEZ-FRESNO, R.; ANDRES-LACUEVA, C. Nutrimetabolomic strategies to develop new biomarkers of intake and health effects. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 8797-8808, 2012.
- 136 BRENNAN, L. Metabolomics in nutrition research: Current status and perspectives. **Biochemical Society Transactions**, v. 41, p. 670-673, 2013.
- 137 OREŠIČ, M. Metabolomics, a novel tool for studies of nutrition, metabolism and lipid dysfunction. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 19, p. 816-824, 2009.
- 138 ISHIHARA, A.; MATSUDA, F.; MIYAGAWA, H.; WAKASA, K. Metabolomics for metabolically manipulated plants: effects of tryptophan overproduction. **Metabolomics**, v. 3, p. 319-334, 2007.
- 139 WU, T.; YANG, M.; WEI, H.-F.; HE, S.-H.; WANG, S.-C.; JI, G. Application of metabolomics in traditional chinese medicine differentiation of deficiency and excess syndromes in patients with diabetes mellitus. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p. 1-11, 2012.
- 140 SUMNER, L.W.; MENDES, P.; DIXON, R. A. Plant metabolomics: Large-scale phytochemistry in the functional genomics era. **Phytochemistry**, v. 62, p. 817-836, 2003.
- 141 YULIANA, N. D.; KHATIB, A.; VERPOORTE, R.; CHOI, Y. H. Comprehensive extraction method integrated with NMR metabolomics: A new bioactivity screening methods for plants, adenosine a1 receptor binding compounds in orthosiphon stamineus benth. **Analytical Chemistry**, v. 83, p. 6902-6906, 2011.
-

- 142 ALBERICE, J. V.; AMARAL, A. F.S.; ARMITAGE, E. G.; LORENTE, J. A.; ALGABA, F.; CARRILHO, E.; MÁRQUEZ, M.; GARCÍA, A.; MALATS, N.; BARBAS, C. Searching for urine biomarkers of bladder cancer recurrence using a liquid chromatography–mass spectrometry and capillary electrophoresis–mass spectrometry metabolomics approach. **Journal of Chromatography A**, v. 1318, p. 163–170, 2013.
- 143 ZHERNAKOVA, A.; WITHOFF, S.; WIJMENG, C.; ZHERNAKOVA, A.; WITHOFF, S.; WIJMENG, C. Clinical implications of shared genetics and pathogenesis in autoimmune diseases. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 9, p. 646–659, 2013.
- 144 BARALLOBRE-BARREIRO, J.; CHUNG, Y.; MAYRA, M. Proteomics and metabolomics for mechanistic insights and biomarker discovery in cardiovascular disease. **Revista Española de Cardiología**, v. 66, p. 657–661, 2013.
- 145 SHAH, S. H.; KRAUS, W. E.; NEWGARD, C. B.; Metabolomic profiling for the identification of novel biomarkers and mechanisms related to common cardiovascular diseases: form and function. **Circulation**, v. 126, p. 1110–1120, 2012.
- 146 WANG-SATTLER, R.; YU, Z.; HERDER, C.; MESSIAS, A. C.; FLOEGEL, A.; HE, Y.; HEIM, K.; CAMPILLOS, M.; HOLZAPFEL, C.; THORAND, B.; GRALLERT, H.; XU, T.; BADER, E.; HUTH, C.; MITTELSTRASS, K.; DÖRING, A.; MEISINGER, C.; GIEGER, C.; PREHN, C.; ROEMISCH-MARGL, W.; CARTENSEN, M.; XIE, L.; YAMANAKA-OKUMURA, H.; XING, G.; CEGLAREK, U.; THIERY, J.; GIANI, G.; LICKERT, H.; LIN, X.; LI, Y.; BOEING, H.; JOOST, H. G.; DE ANGELIS, M. H.; RATHMANN, W.; SUHRE, K.; PROKISCH, H.; PETERS, A.; MEITINGER, T.; RODEN, M.; WICHMANN, H. E.; PISCHON, T.; ADAMSKI, J.; ILLIG, T. Novel biomarkers for pre-diabetes identified by metabolomics. **Molecular Systems Biology**, v. 8, p. 1–11, 2012.
- 147 SAMPEY, B. P.; FREEMERMAN, A. J.; ZHANG, J.; KUAN, P. F.; GALANKO, J. A.; O'CONNELL, T. M.; ILKAYEVA, O. R.; MUEHLBAUER, M. J.; STEVENS, R. D.; NEWGARD, C. B.; BRAUER, H. A.; TROESTER, M. A.; MAKOWSKI, L. Metabolomic profiling reveals mitochondrial-derived lipid biomarkers that drive obesity-associated inflammation. **PLoS ONE**, v. 7, p. 388–392, 2012.
- 148 KUEHNBAUM, N. L.; BRITZ-MCKIBBIN, P. New Advances in Separation Science for Metabolomics: Resolving Chemical Diversity in a Post-Genomic Era. **Chemical Reviews**, v. 113, p. 2437–2468, 2013.
- 149 RAGO, D.; METTE, K.; GÜRDENİZ, G.; MARINI, F.; POULSEN, M.; DRAGSTED, L. O. A LC-MS metabolomics approach to investigate the effect of raw apple intake in the rat plasma metabolome. **Metabolomics**, v. 9, p. 1202–1215, 2013.
-

- 150 KNEE, J. M.; RZEZNICZAK, T. Z.; BARSCH, A.; GUO, K. Z.; MERRITT, T. J. S. A novel ion pairing LC/MS metabolomics protocol for study of a variety of biologically relevant polar metabolites. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 936, p. 63-73, 2013.
- 151 ROJO, D.; BARBAS, C.; RUPÉREZ, F. J. LC-MS metabolomics of polar compounds. **Bioanalysis**, v. 4, p. 1235-1243, 2012.
- 152 BECKER, S.; KORTZ, L.; HELMSCHRODT, C.; THIERY, J.; CEGLAREK, U. LC-MS-based metabolomics in the clinical laboratory. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 883-884, p. 68-75, 2012.
- 153 ZHOU, B.; XIAO, J. F.; TULI, L.; RESSOM, H. W. LC-MS-based metabolomics. **Molecular BioSystems**, v. 8, p. 470-481, 2012.
- 154 THEODORIDIS, G.; GIKA, H. G.; WILSON, I. D. LC-MS-based methodology for global metabolite profiling in metabonomics/metabolomics. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 27, p. 251-260, 2008.
- 155 ZHANG, A.; SUN, H.; WANG, P.; HAN, Y.; WANG, X. Modern analytical techniques in metabolomics analysis. **Analyst**, v. 137, p. 293-300, 2012.
- 156 BARBAS, C.; MORAES, E. P.; VILLASEÑOR, A. Capillary electrophoresis as a metabolomics tool for non-targeted fingerprinting of biological samples. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 55, p. 823-831, 2011.
- 157 SOGA, T.; HEIGER, D. N. Amino acid analysis by capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 72, p. 1236-1241, 2000.
- 158 PUTRI, S. P.; YAMAMOTO, S.; TSUGAWA, H.; FUKUSAKI, E. Current metabolomics: Technological advances. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 116, p. 9-16, 2013.
- 159 IBÁÑEZ, C.; GARCÍA-CAÑAS, V.; VALDÉS, A.; SIMÓ, C. Novel MS-based approaches and applications in food metabolomics. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 52, p. 100-111, 2013.
-

- 160 BOUATRA, S.; AZIAT, F.; MANDAL, R.; GUO, A. C.; WILSON, M. R.; KNOX, C.; BJORND AHL, T. C.; KRISNAMURTHY, R.; SALEEM, F.; LIU, P.; DAME, Z. T.; POELZER, J.; HUYNH, J.; YALLOU, F. S.; PSYCHOGIOS, N.; DONG, E.; BOGUMIL, R.; ROEHRING, C.; WISHART, D. S. The human urine metabolome. **PLoS ONE**, v. 8, p. 1-28, 2013.
- 161 STRUCK, W.; SILUK, D.; YUMBA-MPANGA, A.; MARKUSZEWSKI, M.; KALISZAN, R.; MARKUSZEWSKI, M. J. Liquid chromatography tandem mass spectrometry study of urinary nucleosides as potential cancer markers. **Journal of Chromatography A**, v. 1283, p. 122-131, 2013.
- 162 SZYMAŃSKA, E.; MARKUSZEWSKI, M. J.; MARKUSZEWSKI, M.; KALISZAN, R. Altered levels of nucleoside metabolite profiles in urogenital tract cancer measured by capillary electrophoresis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 53, p. 1305-1312, 2010.
- 163 SZYMAŃSKA, E.; MARKUSZEWSKI, M. J.; CAPRON, X.; VAN NEDERKASSEL, A.-M.; HEYDEN, Y.V.; MARKUSZEWSKI, M.; KRAJKA, K.; KALISZAN, R. Evaluation of different warping methods for the analysis of CE profiles of urinary nucleosides. **Electrophoresis**, v. 28, p. 2861-2873, 2007.
- 164 PASIKANTI, K. K.; ESUVARANATHAN, K.; HO, P.C.; MAHENDRAN, R.; KAMARAJ, R.; WU, Q. H.; CHIONG, E.; CHAN, E. C. Y. Noninvasive urinary metabonomic diagnosis of human bladder cancer. **Journal of Proteome Research**, v. 9, p. 2988-2995, 2010.
- 165 PASIKANTI, K. K.; NORASMARA, J.; CAI, S.; MAHENDRAN, R.; ESUVARANATHAN, K.; HO, P.C.; CHAN, E. C. Y. Metabolic footprinting of tumorigenic and nontumorigenic uroepithelial cells using two-dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 398, p. 1285-1293, 2010.
- 166 VAN, Q. N.; VEENSTRA, T. D.; ISSAQ, H. J. Metabolic profiling for the detection of bladder cancer. **Current Urology Reports**, v. 12, p. 34-40, 2011.
- 167 DANIELSSON, R.; ALLARD, E.; SJÖBERG, P. J. R.; BERGQUIST, J. Exploring liquid chromatography-mass spectrometry fingerprints of urine samples from patients with prostate or urinary bladder cancer. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 108, p. 33-48, 2011.

- 168 JOBUI, K.; SUN, C.; YOSHIOKA, S.; YOKOTA, J.; ONOGAWA, M.; KAWADA, C.; INOUE, K.; SHUIN, T.; SENDO, T.; MIYAMURA, M. Metabolomics study on the biochemical profiles of odor elements in urine of human with bladder cancer. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 35, p. 639-642, 2012 .
- 169 CAO, M.; ZHAO, L.; CHEN, H.; XUE, W.; LIN, D. NMR-based metabolomic analysis of human bladder cancer. **Analytical Sciences**, v. 28, p. 451-456, 2012.
- 170 PUTLURI, N.; SHOJAIE, A.; VASU, V. T.; VAREED, S. K.; NALLURI, S.; PUTLURI, V.; THANGJAM, G. S.; SREEKUMAR, A. Metabolomic Profiling reveals potential markers and bioprocesses altered in bladder cancer progression. **Cancer Research**, v. 71, p. 7376-7386, 2011.
- 171 MARKUSZEWSKI, M.; KALISZAN, R.; Altered levels of nucleoside metabolite profiles in urogenital tract cancer measured by capillary electrophoresis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 53, p. 1305-1312, 2010.
- 172 GIKA, H. G.; MACPHERSON, E.; THEODORIDIS, G. A.; WILSON, I. D. Evaluation of the repeatability of ultra-performance liquid chromatography-TOF-MS for global metabolic profiling of human urine samples. **Journal of Chromatography B**, v. 871, p. 299-305, 2008.
- 173 MORAES, E. P.; RUPEREZ, J. F.; PLAZA, M.; HERRERO, M.; BARBAS, C. Metabolomic assessment with CE-MS of the nutraceutical effect of *Cystoseira spp.* extracts in an animal model. **Electrophoresis**, v. 32, 2055-2062, 2011.
- 174 GODZEN, J.; CIBOROWSKI, M.; ANGULO, S.; RUPEREZ, F. J.; PAZ MARTÍNEZ, M.; SEÑORANS, F. J.; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E.; BARBAS, C. Metabolomic approach with LC-qTOF to study the effect of a nutraceutical treatment on urine of diabetic rats. **Journal of Proteome Research**, v. 10, P. 837-844, 2011.
- 175 WESTERHUIS, J. A.; VAN VELZEN, E. J. J.; HOEFSLOOT, H. C. J.; SMILDE, A. K. Multivariate paired data analysis: multilevel PLS-DA versus OPLS-DA. **Metabolomics**, v. 6, p. 119-128, 2010.
- 176 KEGG. **Tyrosine Metabolism** – Reference Pathway. 2013. Disponível em <http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map00350>. Acesso em: 30 dez 2013.
- 177 BRYAN, G. T. The role of urinary tryptophan metabolites in the etiology of bladder cancer. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 24, p. 841-847, 1971.
-

- 178 GAILANI, S.; MURPHY, G.; KENNY, G.; NUSSBAUM, A.; SILVERNAIL, P. **Cancer Research**, v. 33, p. 1071-1077, 1973.
- 179 ROSE, D. P. Aspects of tryptophan metabolism in health and disease: a review. **Journal of Clinical Pathology**, v. 25, p. 17-25, 1972.
- 180 NISHIO, Y.; KAKIZOE, T.; OHTANI, M.; SATO, S.; SUGIMURA, T.; FUKUSHIMA, S. L-isoleucine and L-leucine: tumor promoters of bladder cancer in rats. **Science**, v. 231, p. 843-845, 1986.
- 181 KEGG. **Purine Metabolism** – Reference Pathway. 2013. Disponível em <http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map00230>. Acesso em: 03 jan 2014.
- 182 BERRY, C. E.; HARE, J. M. Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. **The Journal of Physiology**, v. 16, p. 589-606, 2004.
- 183 VORBACH, C.; HARRISON, R.; CAPECCHI, M. R. Xanthine oxidoreductase is central to the evolution and function of the innate immune system. **Trends in Immunology**, v. 24, p. 512-517, 2003.