AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

# Determinação dos níveis de porfirinas fecais por espectroscopia de fluorescência em indivíduos com câncer de próstata

DANIEL RIANI GOTARDELO

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Doutor em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Aplicações

Orientador:
Prof. Dr. Carlos Roberto Jorge Soares

Coorientador:
Prof. Dr. Júlio Takehiro Marumo

São Paulo
2019

**INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES**
**Autarquia associada à Universidade de São Paulo**

# Determinação dos níveis de porfirinas fecais por espectroscopia de fluorescência em indivíduos com câncer de próstata

**DANIEL RIANI GOTARDELO**

**Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Doutor em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Aplicações**

**Orientador:**
**Prof. Dr. Carlos Roberto Jorge Soares**

**Coorientador:**
**Prof. Dr. Júlio Takehiro Marumo**

**Versão Corrigida**
**Versão Original disponível no IPEN**

**São Paulo**
**2019**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho,
para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte

Como citar:
GOTARDELO, D. R. ***Determinação dos níveis de porfirinas fecais por espectroscopia de fluorescência em indivíduos com câncer de próstata***. 2019. 78 p. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, São Paulo. Disponível em: <www.teses.usp.br> (data de consulta no formato: dd/mm/aaaa)

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de geração automática da Biblioteca IPEN/USP, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Gotardelo, Daniel Riani
Determinação dos níveis de porfirinas fecais por espectroscopia de fluorescência em indivíduos com câncer de próstata / Daniel Riani Gotardelo; orientador Carlos Roberto Jorge Soares; co-orientador Júlio Takehiro Marumo. -- São Paulo, 2019.
78 p.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Nuclear (Aplicações) -- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2019.

1. Porfirinas. 2. Fezes. 3. Espectroscopia de Fluorescência. 4. Câncer de Próstata. I. Soares, Carlos Roberto Jorge, orient. II. Takehiro Marumo, Júlio , co-orient. III. Título.

## DEDICATÓRIA

Ao Único Deus, Dono de toda ciência, sabedoria e poder.

Às eternizadas em meu coração, Marcele, Marina e Carol.

Aos meus pais, Júnior e Marilene e aos meus irmãos, Juliana e Davi.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, o Grande Autor da Vida, por ter me dado a oportunidade de realizar mais um sonho.

À Marcele, minha esposa amada, por ter me incentivado e me dado forças para continuar, quando a desesperança, a decepção e o desânimo me bateram à porta.

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Jorge Soares, pelo voto de confiança que me deu, pela empatia, pela liderança, pela experiência, pelos ensinamentos e pela sabedoria com que me orientou.

À Profa. Dra. Lilia Coronato Courrol, pela receptividade, pela paciência, pelos ensinamentos e por ter aberto as portas de seu laboratório para que pudéssemos realizar a pesquisa.

Ao Prof. Dr. Fernando J. Firmino Moreira e ao Prof. Dr. André Machado de Senna, pela seriedade e pelo apoio humano e gerencial na condução de cada etapa do trabalho.

Ao Prof. Msc. Davi Riani Gotardelo, meu irmão, pelas inúmeras contribuições na área de estatística.

Aos meus alunos de graduação do Instituto Metropolitano de Ensino Superior (IMES)/Univaço, Ipatinga, MG, pela valiosa ajuda no recrutamento e nas entrevistas dos pacientes.

À NRE Educacional S/A, empresa que me abriu as portas para o magistério, nas figuras do Dr. Nicolau Esteves e do Dr. Flávio de Carvalho, pelo reconhecimento profissional.

Aos pacientes, funcionários e médicos do Centro de Oncologia do Hospital Márcio Cunha de Ipatinga, MG, especialmente Prof. Dr. Luciano de Souza Viana, Dr. Pedro Paulo Lopes de Oliveira Júnior e Dra. Andréia Macedo, pela colaboração na seleção e recrutamento dos pacientes.

À Dra. Márcia Salles e Fabiana Ferreira do Laboratório São Lucas, em Ipatinga, MG, pelo suporte na coleta, armazenamento e processamento das amostras.

**Determinação dos níveis de porfirinas fecais por espectroscopia de fluorescência em indivíduos com câncer de próstata**

**Daniel Riani Gotardelo**

## RESUMO

Modelos experimentais de câncer de próstata demonstraram níveis aumentados de protoporfirina IX (PpIX) no sangue e nas fezes de camundongos, fazendo com que a quantificação dessa molécula pudesse ser aventada para a identificação desse tipo de tumor. Nesse estudo do tipo caso-controle, a autofluorescência de porfirinas em fezes humanas foi analisada usando espectroscopia de fluorescência em pacientes com câncer de próstata e controles. Dados sociodemográficos, amostras sanguíneas para determinação dos níveis de PSA (antígeno prostático específico) e amostras de fezes para quantificação de porfirinas foram obtidas após consentimento dos pacientes. Recrutaram-se 18 pacientes em amostra calculada a partir dos estudos de referência. Realizou-se varredura para encontrar o melhor pico espectrofotométrico a partir de diversas diluições acetona/fezes. Primeiramente, 3 mililitros de acetona de grau analítico foram adicionados a 0,3 gramas de fezes e a mistura foi macerada e centrifugada a 4.000 rotações por minuto durante 15 minutos. O sobrenadante foi analisado espectroscopicamente. Os espectros de emissão a 550-750 nm foram obtidos excitando as amostras a 405 nm. Variáveis sociodemográficas foram analisadas e evidenciaram homogeneidade entre os grupos estudados. Um contraste significativo entre as amostras de indivíduos normais e oncológicos foi estabelecido na região espectral de 670-675 nm ($p = 0,000127$), o que corresponde a um aumento significativo de porfirinas fecais em pacientes com câncer. Não houve correlação estatisticamente significativa entre os níveis de PSA e as porfirinas fecais ($R = -0,0221$). Neste estudo preliminar realizado em seres humanos, os resultados mostram um método simples e não invasivo para avaliar as porfirinas fecais, que têm o potencial de funcionar como um biomarcador tumoral em pacientes com câncer de próstata. Essa abordagem poderia aumentar a sensibilidade e a especificidade do teste de PSA.

Palavras-chave: Porfirinas, Fezes, Câncer de Próstata, Espectroscopia de Fluorescência.

**Determination of faecal porphyrin levels by fluorescence spectroscopy in individuals with prostate cancer**

**Daniel Riani Gotardelo**

## ABSTRACT

Experimental models of prostate cancer have demonstrated increased levels of protoporphyrin IX (PpIX) in the blood and faeces of mice. Hence, the quantification of these autofluorescent molecules could be hypothesized to be a potential marker for this type of tumour. In this case-control study, the autofluorescence of porphyrins in human faeces from patients with prostate cancer and control subjects was analysed using fluorescence spectroscopy. Socio-demographic data, blood samples for determination of PSA levels and faeces samples for quantification of porphyrins were obtained after consent of the patients. Eighteen patients were recruited in a sample calculated from the reference studies. Scanning was performed to determine the best spectrophotometric peak from various acetone/faecal dilutions. First, 3 mL of analytical-grade acetone was added to 0.3 g of faeces, and the mixture was macerated and centrifuged at 4000 rpm for 15 min. The supernatant was analysed spectroscopically. The emission spectra from 550 to 750 nm were obtained by exciting the samples at 405 nm. Socio-demographic variables were analyzed and showed homogeneity among the groups studied. A significant difference between the samples from control and cancer subjects was established in the spectral region of 670–675 nm ($p = 0.000127$), which corresponds to a significant increase in faecal porphyrins in patients with cancer. There was no statistically significant correlation between PSA levels and faecal porphyrins ($R = -0,0221$). In this preliminary study conducted in humans, the results show a simple and non-invasive method to assess faecal porphyrins, which have the potential to function as a tumour biomarker in patients with prostate cancer. This approach has improved sensitivity and specificity over PSA testing.

Keywords: Porphyrins, Faeces, Prostate Cancer, Fluorescence spectroscopy.

## LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1 – PSA ajustado à idade .....17

Tabela 2 – Nova classificação para o Escore de Gleason
proposta pela Sociedade Internacional de Patologia Urológica .....19

Tabela 3 – Classificação de risco para recidiva do câncer de
próstata proposta por D'Amico .....24

Tabela 4 – Comprimentos de onda de excitação e emissão de
fluoróforos endógenos .....32

Tabela 5 – Autores, ano, tipo de estudo, tipo de câncer e amostra
utilizada (n) em estudos de referência que evidenciaram aumento
de porfirinas, principalmente a PpIX, em doenças neoplásicas..... 37

Tabela 6 – Variáveis sociodemográficas, dados clínicos e
laboratoriais analisados .....40

Tabela 7 – Volumes de fezes e acetona utilizados em cada diluição ..... 41

Tabela 8 – Média de idade ± DP dos casos e dos controles ..... 43

Tabela 9 – Frequência das variáveis estudadas nos casos e
controles .....44

Tabela 10 – Média e DP dos valores dos picos espectrofotométricos
em CPS da área sob a curva (671 nm) extraídas das fezes de
pacientes com e sem câncer..... 48

Tabela 11 – Níveis de PSA total e concentrações de porfirinas
fecais obtidas em pacientes com câncer ..... 48

Tabela 12 – Correlação entre os níveis de porfirinas fecais e
os níveis de PSA no grupo com câncer ..... 49

Tabela 13 – Níveis de PSA total e concentrações de porfirinas
fecais obtidas em pacientes do grupo controle .....49

Tabela 14 – Correlação entre os níveis de porfirinas fecais e os níveis de PSA total em ambos os grupos ..... 49

Tabela 15 – Glicemia em jejum, controle glicêmico e tipo de diabetes dos pacientes ..... 50

Tabela 16 – Níveis de lípides e controle dos pacientes que relataram possuir dislipidemia ..... 50

## LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1 – Classificação TNM, 7ª Edição ..... 20

Figura 2 – Biossíntese do heme ..... 28

Figura 3 – Fenômeno da fluorescência ..... 31

Figura 4 – Esquema geral de funcionamento de um espectrofotômetro de fluorescência ..... 33

Figura 5 – Espectro de emissão de um fluoróforo endógeno e sua representação numérica ..... 34

Figura 6 – Diferença entre os picos espectrofotométricos obtidos em cada diluição utilizada para varredura do melhor espectro de emissão ..... 46

Figura 7 – Picos espectrofotométricos obtidos de pacientes do grupo com câncer *versus* grupo controle (média ± DP) ..... 47

Figura 8 – Média ± DP dos valores dos picos espectrofotométricos em CPS da área sob a curva (671 nm) extraídas das fezes dos casos *versus* controles (Box Plot)..... 47

## LISTA DE QUADROS

Página

Quadro 1 – Amostra calculada a partir da quantidade de porfirinas encontrada (média ± DP) em estudos de referência ..... 38

**SUMÁRIO**

**Página**

**1 INTRODUÇÃO ..... 12**

**1.1 Câncer de próstata ..... 12**

1.1.1 Epidemiologia e fatores de risco ..... 12

1.1.2 Patogênese ..... 14

1.1.3 Diagnóstico ..... 16

1.1.4 Tratamento ..... 21

1.1.5 Complicações e prognóstico ..... 22

1.1.6 Rastreamento ..... 25

**1.2 Porfirinas ..... 27**

**1.3 Espectroscopia de fluorescência ..... 30**

**2 OBJETIVOS ..... 36**

**2.1 Objetivo geral ..... 36**

**2.2 Objetivos específicos ..... 36**

**3 CASUÍSTICA E MÉTODOS ..... 37**

**3.1 Cálculo amostral ..... 37**

**3.2 Recrutamento dos indivíduos com e sem câncer de próstata ..... 38**

**3.3 Variáveis sociodemográficas, dados clínicos e laboratoriais ..... 39**

**3.4 Coleta e armazenamento das amostras ..... 40**

**3.5 Processamento das amostras ..... 41**

**3.6 Análise espectroscópica das amostras ..... 41**

**3.7 Análise estatística ..... 42**

**4 RESULTADOS ..... 43**

**4.1 Variáveis sociodemográficas e dados clínicos..... 43**

**4.2 Diluição acetona/fezes para identificação do melhor pico espectrofotométrico para quantificação de porfirinas fecais..... 45**

**4.3 Análise espectroscópica das porfirinas fecais ..... 46**

**4.4 Correlação entre os níveis de PSA e as porfirinas fecais ..... 48**
**4.5 Dados laboratoriais ..... 50**
**5 DISCUSSÃO ..... 51**
**6 CONCLUSÕES ..... 55**
**7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ..... 56**
**8 APÊNDICES..... 65**

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Câncer de próstata

### 1.1.1 Epidemiologia e fatores de risco

Desconsiderando-se os tumores de pele, o câncer de próstata é o mais incidente entre os homens no Brasil e no mundo. Em 2016, uma estimativa considerou 1 milhão e 400 mil novos casos no mundo e 381 mil mortes devido à neoplasia. Nos Estados Unidos, acredita-se que esse tipo de câncer tenha levado ao óbito 29.720 pessoas apenas no ano de 2013. Para o ano de 2018, estima-se que tenham ocorrido 68.220 novos casos no Brasil, de acordo com o Instituto Nacional de Câncer – INCA (1, 2).

O risco de desenvolver câncer de próstata durante a vida é de 15,3% nos Estados Unidos, sendo proporcionalmente maior com o avançar da idade: 0,3% até 49 anos, 2,3% entre 50 e 59 anos, 6,4% entre 60 e 69 anos e 11,2% a partir dos 70 anos. No mesmo país, a incidência da enfermidade em negros é de 220 para 100.000 indivíduos, enquanto que em brancos é de 138,6 e 124,2 em hispânicos (3).

Uma revisão sistemática de 29 séries de casos avaliou a prevalência mundial de carcinoma prostático incidental em autópsias de 8.776 indivíduos que morreram por outras causas, revelando que a prevalência aumentava de 5%, em indivíduos com menos de 30 anos, para 59% em indivíduos com mais de 79 anos, achados que apontam para a possibilidade de sobrediagnóstico e sobretratamento da doença, possivelmente limitando a utilidade de programas de rastreamento para essa enfermidade, uma vez que muitos desses pacientes não faleceram “por causa” da doença, mas “com” a doença (4).

Há uma leve tendência de queda das taxas de mortalidade ajustadas por idade devido ao carcinoma prostático nos últimos anos. A sobrevida relacionada a essa neoplasia pode variar de acordo com o estadiamento da doença e com a raça, sendo menor em estágios mais avançados e na população negra (3).

Quanto à hereditariedade do câncer de próstata, também designado carcinoma prostático ou câncer prostático, mais de 90% dos casos aparecem

espontaneamente e 9% dos casos podem ser considerados hereditários. Indivíduos com câncer prostático hereditário geralmente têm a afecção em idade mais precoce, sendo semelhante ao não hereditário em outros aspectos (5).

A idade é o principal fator de risco para o desenvolvimento do câncer de próstata, sendo que a etnia e a história familiar também podem contribuir para o seu aparecimento. Obesidade e dietas com base em gordura animal, carne vermelha, embutidos e cálcio têm sido associadas, em alguns trabalhos, ao aumento do risco de desenvolver essa neoplasia. Por outro lado, acredita-se que dietas à base de frutas e vegetais, ricas em fitoquímicos e antioxidantes, possam interferir no desenvolvimento desse tipo de tumor por reduzirem potencialmente o dano genômico causado por espécies reativas de oxigênio e pela redução de enzimas antioxidantes. A ingestão de carotenoides, vitaminas C e E, polifenóis existentes em cafés e chás, flavonoides e licopenos também tem sido estudada com resultados variáveis - ora positivos, ora negativos, ora sem associação com o risco de desenvolvimento do tumor (2,6). De maneira geral, o papel da ingestão de café, verduras, álcool, chá, gorduras, lácteos, carnes, tomates, licopenos, vitamina E, ácidos graxos e selênio no risco de desenvolvimento do câncer de próstata permanece controverso ou não estabelecido (7).

Considerando os fatores de risco anteriormente mencionados, aqueles mais importantes no sentido de exercerem alguma influência na decisão de realizar o rastreamento são: (1) aumento da idade, (2) ancestralidade – raça negra e (3) história familiar – parentes de primeiro grau diagnosticados antes dos 65 anos de idade. Além disso, mutações suspeitas ou confirmadas no gene BRCA também parecem conferir risco aumentado (8).

Os fatores de risco considerados modificáveis para a prevenção da neoplasia prostática estão relacionados ao estilo de vida e aos hábitos alimentares. Menores índices de massa corporal (IMC) podem estar associados a uma menor incidência da neoplasia, e um incremento nos níveis de atividade física total também pode levar a uma redução de risco. Quanto à alimentação, o consumo de peixes, apesar de aparentemente não reduzir a incidência desse tipo de câncer, parece apresentar potencial na redução da mortalidade específica pela doença. Ingestão de alimentos à base de soja e suplementos contendo vitaminas antioxidantes em pequenas doses pode diminuir o risco da doença. No caso dos

antioxidantes, os achados sugerem efeito maior quando o PSA basal for menor que 3 mcg/L (6).

O uso de medicamentos da classe dos anti-inflamatórios não esteroidais pode estar associado a um menor risco da neoplasia, e o uso de estatinas apresenta evidências conflitantes a esse respeito. A utilização de inibidores da enzima 5 alfa-redutase demonstrou redução de risco em homens que se submetem regularmente ao rastreamento, com o inconveniente de poder estar associada a um aumento do risco de neoplasia de alto grau. Quanto a essa classe, indicações em que os benefícios provavelmente superariam os riscos seriam o uso para afecções benignas (p. ex. hiperplasia prostática benigna) e para indivíduos assintomáticos com PSA ≤ 3ng/mL regularmente rastreados para detecção precoce da doença (9).

### 1.1.2 Patogênese

A patogênese do câncer de próstata envolve uma série de fatores genéticos. Especula-se que esses fatores estejam especialmente envolvidos no surgimento da neoplasia, enquanto os fatores ambientais parecem contribuir para o aumento do risco de sua progressão (5), embora o conhecimento acerca desses últimos seja escasso. Ainda não existem evidências sólidas para determinar mudanças comportamentais favoráveis no intuito de prevenir o câncer de próstata, tais como reduzir o consumo de gordura animal e carnes vermelhas ou aumentar a ingestão de frutas, cereais e vegetais. Até hoje, os poucos fatores de risco de fato estabelecidos são idade, raça e história familiar (9).

O mecanismo genético causador do câncer de próstata guarda forte relação com a história familiar do paciente. Caso esta seja positiva em um parente de primeiro grau, o risco de um homem desenvolver a neoplasia é duas vezes maior que o da população geral, subindo para quatro vezes se o parente de primeiro grau teve a condição diagnosticada antes dos 60 anos. A carcinogênese é, em geral, engatilhada pela ação isolada ou pela interação de variações genéticas comuns, que oferecem baixo risco, e mutações raras altamente penetrantes, que oferecem alto risco ao paciente. Vários estudos conseguiram mapear 77 regiões de Polimorfismo de Nucleotídeo Único (SNPs) associadas ao câncer de próstata. Mutações de genes como o BRCA2 e o HOXB13 também elevam significativamente o risco de seus portadores. Um gene BRCA2 mutante,

por exemplo, confere a seu portador um risco 5 a 7 vezes maior de desenvolver câncer de próstata, enquanto uma mutação no gene HOXB13 está associada com o surgimento precoce da neoplasia. Ainda é controverso o risco relativo de indivíduos com mutação no gene BRCA1 (9,10).

A existência do câncer de próstata ou até mesmo seu surgimento precoce não garantem um perfil agressivo da doença. A invasão local, formação de metástases a distância e a morte são consequências moduladas por vários dos fatores genéticos citados acima. Comparando análises genômicas de pessoas com uma doença de curso agressivo e daquelas com curso indolente, bem como ao comparar padrões genômicos de células tumorais com diferentes pontuações no Escore de Gleason, uma escala histopatológica relacionada à agressividade do tumor, foi possível determinar *loci* importantes associados à maior gravidade do câncer de próstata. Estudos sugerem a relação do SNP rs17160911 em KLRG2, 7q32-33 com formas agressivas do carcinoma prostático. Outro SNP importante descoberto foi o rs12621278 em IGTA6, 2q31.1, com um risco 2,4 vezes maior de progressão da doença associado ao genótipo AG, quando comparado ao genótipo AA. Muitos outros SNPs somam-se a esses, totalizando 77 descobertos até então associados ao surgimento e progressão da neoplasia (9, 10).

A etnia, muito ligada a fatores hereditários, também é um fator de risco significativo no curso do carcinoma prostático. Sabe-se que, nos Estados Unidos, afro-americanos têm um risco 1,4 vezes maior de serem diagnosticados e 2 a 3 vezes maior de morrerem de câncer de próstata, quando comparados àqueles de descendência europeia. Mesmo quando ajustada por fatores socioeconômicos, a mortalidade permanece maior no grupo dos afro-americanos (10).

Uma característica peculiar do câncer de próstata que tem norteado vários estudos é sua associação com a história familiar de outros tipos de câncer. Essa relação foi observada pela primeira vez em 1966 (11). Desde então, já foi relatado um risco aumentado em homens com história familiar de câncer de ovário (OR 6.2, 95% IC: 1.2–32), bexiga (OR 3.5, 95% IC: 1.6-7.4) e renal (OR 3.1, 95% IC: 1.1-8.5). Além disso, foram descobertos SNPs específicos como o rs1056538, em ICAM5, 19p13.2, identificado em pacientes com carcinoma prostático e em coortes de câncer de mama, e o rs4242382, no cromossomo 8q24, conhecidamente associado a uma maior susceptibilidade de desenvolver câncer

de próstata, mas também um marcador de susceptibilidade ao câncer colorretal (10).

O vasto progresso que tem sido feito no campo da genética é especialmente útil, uma vez que os atuais métodos diagnósticos e de rastreamento do câncer de próstata são controversos. Dessa forma, uma triagem genética poderia ser eficaz ao identificar os principais pacientes em risco de desenvolver a doença, bem como classificar aqueles que já a possuem, estratificando-os quanto à agressividade do tumor e, assim, norteando a terapêutica.

Ainda que não haja evidências suficientes para recomendar mudanças nos hábitos de vida dos pacientes para a prevenção da doença, já foi notada uma disparidade significativa na incidência e mortalidade pela doença em países subdesenvolvidos, quando comparados a países desenvolvidos - maior nesses últimos, sugerindo que hábitos de vida possam estar relacionados ao risco de câncer de próstata (12,13).

### 1.1.3 Diagnóstico

A suspeita diagnóstica do câncer de próstata se dá por meio da dosagem do Antígeno Prostático Específico (PSA) e pelo toque retal. Esses dois métodos compõem as principais ferramentas no rastreamento da neoplasia, fazendo parte de um dos temas mais controversos e debatidos da literatura urológica. Uma vez estabelecida a suspeita, o diagnóstico é definido ou refutado pela biópsia e análise histopatológica do tecido prostático. Mais recentemente, uma nova tecnologia de sequenciamento genético de células cancerígenas tem surgido com a proposta de se tornar o método diagnóstico da próxima geração para detecção do câncer de próstata.

O PSA é uma proteína produzida pelas células da próstata que, em condições normais, é encontrada em pequena quantidade na corrente sanguínea. Caso o PSA esteja aumentado, isso é um indicativo de alguma alteração na próstata, não necessariamente uma neoplasia. Outras condições que podem aumentar o PSA são: prostatite, trauma (sondagem vesical, ressecções transuretrais, massagens prostáticas) e hiperplasia benigna da próstata. Em razão da baixa especificidade da dosagem de PSA para diagnosticar o câncer de próstata, novos artifícios foram criados para tornar o teste mais fidedigno,

sobretudo quando encontrado em valores entre 4 e 10 ng/mL. Passou-se a considerar a relação PSA livre/PSA total (indicação de biópsia se for <25%); o PSA ajustado pela idade, levando em consideração o crescimento da glândula com o passar dos anos (Tabela 1); a relação PSA/volume prostático definido pelo US (ultrassom) transretal (valores acima de 0,15 seriam sugestivos de neoplasia) e uma velocidade de aumento do PSA acima de 0,75 ng/mL/ano (14).

Tabela 1 – PSA ajustado à idade

| Idade (anos) | PSA sérico (ng/mL) |
|---|---|
| 40-49 | 2,5 |
| 50-59 | 3,5 |
| 60-69 | 4,5 |
| 70-79 | 6,5 |

Fonte: MAGNABOSCO, W.J., 2014.

O paciente com câncer de próstata pode ser estadiado de acordo com sua dosagem de PSA. Um valor abaixo de 10 ng/mL é um forte indicativo da ausência de doença metastática, enquanto valores acima de 20 ng/mL associam-se com uma cintilografia óssea positiva em 16,2% dos casos, subindo para 73,4% com um PSA > 100 ng/mL (14).

Por outro lado, em cerca de 18% dos pacientes com câncer de próstata, o PSA se mostra inalterado (17). Tal fato justifica a utilização do toque retal como importante método diagnóstico a ser utilizado em conjunto com a dosagem de PSA. Ademais, 80% dos tumores prostáticos se encontram na zona periférica da glândula, sendo palpáveis pelo reto. O toque retal ainda é útil no estadiamento clínico do tumor: a ausência de um nódulo palpável indica um tumor T1, enquanto sua presença classifica o tumor como T2; caso o examinador não consiga definir os limites da glândula e ela seja imóvel à palpação, sugere-se um tumor T3, e uma massa extensa, fixa e endurecida indica uma classificação T4 (14).

O US transretal mostrou-se com o mesmo valor preditivo positivo que o toque retal. Logo, não se recomenda o ultrassom na rotina clínica, a não ser para guiar a biópsia (15).

A definição do diagnóstico se dá somente pela biópsia, preferencialmente guiada pelo US transretal. Durante o procedimento, devem-se biopsiar 12 fragmentos, de modo que eles representem todas as regiões da próstata. Fragmentos adicionais podem ser retirados caso uma área suspeita seja identificada. O diagnóstico é confirmado pela ausência de células basais, sendo que em mais de 95% dos casos de biópsia positiva o laudo é de adenocarcinoma acinar usual. Caso haja a presença de neoplasia intraepitelial prostática de alto grau (lesão precursora de neoplasia) em dois ou mais fragmentos, a rebiópsia está indicada. Pode-se ainda obter um laudo de “suspeito, mas não diagnóstico para câncer de próstata”, o que em geral significa que o material biopsiado é insuficiente ou que faltam critérios citológicos para definir o diagnóstico. Recomenda-se realizar uma avaliação imuno-histoquímica e, se essa também for inconclusiva, rebiopsiar com uma maior amostragem da região suspeita. A biópsia guiada por ressonância magnética multiparamétrica, ainda um método pouco utilizado, tem se mostrado eficaz, limitando o número de pacientes diagnosticados com tumores clinicamente insignificantes e diminuindo o número necessário de fragmentos (16).

Uma vez realizada a biópsia, é possível fazer o estadiamento histopatológico do tumor. O Escore de Gleason, criado em 1966, é a principal ferramenta utilizada para esse propósito, além de ser uma das mais poderosas escalas no estabelecimento do prognóstico. Essa escala consiste numa gradação de 1 a 5 do padrão histopatológico do tumor (quanto maior, mais agressivo e mal diferenciado). O examinador deve identificar o padrão mais frequente na amostra (primário) e o segundo mais frequente (secundário), resultando, na teoria, em uma pontuação de 2 a 10. Dessa forma, o resultado deveria ser apresentado de modo a evidenciar os dois padrões, de modo que, na notação, venha sempre primeiro o padrão predominante, seguido pelo secundário. Por exemplo, Gleason 7 (4+3).

Desde sua criação, o Escore de Gleason sofreu várias modificações, sendo a última em 2014, que contribuíram positivamente na acurácia do estadiamento. Observou-se um aumento da concordância entre a biópsia por agulha e da peça de prostatectomia radical de 58%, utilizando a escala original, para 72%, utilizando a escala com as modificações propostas em 2005 (17). Embora existam poucos estudos comprovando a eficácia das modificações feitas,

vários pontos conflituosos foram elucidados com as modificações no escore, permitindo uma melhor aplicabilidade na prática clínica (18).

Em 2005 ficou definido que as notas 1 e 2 do Escore de Gleason nunca deveriam ser atribuídas para uma amostra de biópsia por agulha, fazendo com que, na prática, a nota mínima fosse 6, correspondendo a um tumor bem diferenciado. Contudo, essa nota passava ao paciente uma falsa impressão de que ele possuía um tumor de gravidade moderada. Para resolver essa questão, foi proposta em 2014 uma nova agrupação do Escore de Gleason (Tabela 2) pela Sociedade Internacional de Patologia Urológica (ISUP) (19), cuja eficácia em prever prognóstico já foi comprovada por estudos recentes (20-22).

Tabela 2 – Nova classificação para o Escore de Gleason proposta pela Sociedade Internacional de Patologia Urológica

| Escore de Gleason | Novo sistema de classificação proposto pela Sociedade Internacional de Patologia Urológica |
|---|---|
| 3+3, 3+2, 2+3, 2+2 | 1 |
| 3+4 | 2 |
| 4+3 | 3 |
| 4+4, 3+5, 5+3 | 4 |
| 4+5, 5+4, 5+5 | 5 |

Fonte: SAMARATUNGA, H. *et al*, 2016.

Outro exame importante no espectro do câncer de próstata é a cintilografia óssea, útil na detecção de metástases ósseas. A ressonância magnética deve ser utilizada em caso de dúvida na cintilografia óssea. Pode-se também fazer uso da ressonância para avaliar a extensão extracapsular do tumor, a invasão das vesículas seminais e os linfonodos regionais, embora tenha baixa sensibilidade para identificar micrometástases.

Uma vez diagnosticado e bem caracterizado o tumor, deve-se classificá-lo de acordo com o estadiamento TNM - Tumor/Nódulos/Metástases para enquadramento em uma das seguintes divisões: tumores localizados

(restritos à próstata) – T1 e T2, localmente avançados (com invasão dos tecidos adjacentes) – T3 e T4, e metastáticos (presença de metástases linfonodais ou a distância) – N+ e/ou M+ (Figura 1). Todas as formas de classificação do câncer de próstata são valiosos instrumentos de determinação do prognóstico, sobretudo quando interpretadas globalmente.

Figura 1 – Classificação TNM, 7ª edição

| Tumor primário | T0 | Sem evidência tumoral |
|---|---|---|
| | T1a<br>T1b<br>T1c | TU incidental < 5% amostra (detectado pela RTU)<br>TU incidental > 5% amostra (detectado pela RTU)<br>TU descoberto em biópsia por agulha por elevação PSA (com toque normal) |
| | T2a<br>T2b<br>T2c | TU acomete < ½ de 1 lobo prostático<br>TU acomete > ½ de 1 lobo prostático<br>TU acomete ambos os lobos prostáticos |
| | T3a<br>T3b | Extensão extracapsular do tumor<br>Tumor invade as vesículas seminais |
| | T4 | TU fixo ou invadindo estruturas adjacentes (reto, bexiga, pelve, intestino) |
| Linfonodos regionais (abaixo da bifurcação entre as artérias ilíacas) | N0 | Linfonodos não acometidos |
| | N1 | Metástase em linfonodos regionais |
| Metástases a distância (categoria mais avançada) | M0 | Ausência de metástases a distância |
| | M1a | Metástase para linfonodos não regionais |
| | M1b | Metástase para ossos |
| | M1c | Metástase para outros órgãos |

Fonte: MAGNABOSCO, W.J., 2014.

Por outro lado, um dos pontos mais criticados em relação ao câncer de próstata é o sobrediagnóstico, ou seja, o excesso de diagnósticos realizados muitas vezes desnecessariamente, uma vez que o tumor é, com frequência, de evolução indolente. Uma das propostas mais promissoras para conseguir identificar os tumores mais agressivos é o sequenciamento genético das células tumorais. Esse processo permite o mapeamento da heterogeneidade intratumoral, possibilitando a identificação de biomarcadores que se relacionam com a agressividade do tumor, tornando-se uma ferramenta notável para o

direcionamento terapêutico. Para mais, o sequenciamento genético permitiria ainda identificar mecanismos de resistência das células tumorais. À luz desse conhecimento, juntamente das informações genômicas do paciente, seria possível o desenvolvimento de drogas capazes de agir eficientemente e mais especificamente nas células neoplásicas (23).

### 1.1.4 Tratamento

O manejo do paciente diagnosticado com câncer de próstata depende de uma série de fatores relacionados à forma de apresentação da doença e ao perfil do próprio paciente, que definirão o grau da intervenção.

Na doença localizada existem várias opções terapêuticas, de modo que a escolha depende da avaliação de risco do paciente, considerando sua idade, dosagem e densidade de PSA, estadiamento clínico do tumor, número de biópsias positivas e quantidade de tecido maligno por amostra. Essas variáveis podem fazer com que a escolha do tratamento inclua desde a vigilância ativa até uma abordagem multimodal. Sabe-se que a maioria dos cânceres de baixo estadiamento (Gleason ≤ 6) apresentam evolução indolente, bastando realizar a vigilância ativa, que consiste em monitorar o PSA sérico, repetir biópsias prostáticas e realizar ressonâncias magnéticas periodicamente, de modo que alterações nesses exames sugestivas de progressão da doença indiquem um tratamento mais radical (9). A vigilância ativa justifica-se pelo fato de as formas mais radicais de tratamento não serem isentas de risco, além de estudos indicarem que o risco de morte por câncer de próstata de baixo risco é de 1% em 10 anos (24, 25).

A grande maioria dos casos de cânceres de próstata encontra-se na faixa de risco baixo a intermediário. Especialmente nos carcinomas de baixo risco, o diagnóstico deve ser preciso para que o médico possa adotar, de forma segura, a conduta conservadora, poupando o paciente dos efeitos adversos das terapias mais radicais. Nos pacientes com carcinoma prostático de risco intermediário, Gleason 7 (3+4) e PSA < 20, outras medidas terapêuticas devem ser consideradas. Entre elas, pode-se optar pela prostatectomia radical, radioterapia de raios externos (EBRT), braquiterapia ou modalidades mais novas, como a crioterapia, o ultrassom focal de alta intensidade (HIFU) e a terapia fotodinâmica (9,26).

Entre os tratamentos radicais (indicados para pacientes de risco intermediário e alto), o único que apresenta dados de ensaios clínicos, quando comparado com a conduta conservadora, é a prostatectomia radical. Há evidências de que a cirurgia, em um seguimento de 18 anos, reduziu a mortalidade global (RR: 0,57; IC95%: 0,40 – 0,81) e a ocorrência de metástases a distância (RR: 0,40; IC95%: 0,21 – 0,73), embora não tenha evidenciado uma redução significativa da mortalidade específica pelo câncer de próstata (RR: 0,54; IC95%: 0,26 – 1,13) (27). Entretanto, dadas suas várias complicações que interferem de forma importante na qualidade de vida do paciente, a prostatectomia radical não deve ser indicada indiscriminadamente. Outra opção, que demonstra bom controle da doença, sobretudo em pacientes de risco intermediário, é a EBRT, especialmente quando associada à supressão androgênica adjuvante, concomitante ou neoadjuvante (26).

Em tempo, é importante lembrar que o câncer de próstata é uma doença que se manifesta principalmente em idosos, com a média de idade de 68 anos no momento do diagnóstico. Sendo assim, muitas vezes o paciente com câncer de próstata apresenta comorbidades importantes, tais como doenças terminais, neurodegenerativas, entre outras. Pacientes com esse perfil devem ter uma abordagem terapêutica individualizada, considerando-se até mesmo a possibilidade de receberem apenas tratamento sintomático paliativo (28).

### 1.1.5 Complicações e prognóstico

Uma das principais complicações ligadas ao tratamento do câncer prostático, de impacto substancial na qualidade de vida do paciente, é a incontinência urinária. Trata-se de uma consequência relativamente comum, relatada tanto por pacientes submetidos à prostatectomia quando por aqueles que trataram com radioterapia. Sabe-se que há melhora da incontinência urinária por esforço no primeiro ano após a cirurgia, seguida de resolução, na maioria dos casos (29). Muitos pacientes, entretanto, passam a sofrer cronicamente de incontinência urinária de urgência e esvaziamento vesical incompleto, podendo se beneficiar, respectivamente, de agentes anticolinérgicos (p. ex.: oxibutinina) e alfabloqueadores adrenérgicos (p. ex.: tansulosina). A radioterapia, em curto prazo, pode causar sintomatologia análoga àquela da infecção do trato urinário. Em longo prazo, manifestações mais complexas podem surgir, tais como sintomas

do trato urinário inferior similares à hiperplasia prostática, bem como alterações anatômicas, como estenoses e fístulas, incontinência urinária evidente e hematúria (30).

Outra complicação importante e extremamente comum é a disfunção sexual. Há relatos de taxas de disfunção erétil pós-prostatectomia de até 79% em dois anos e 76% em cinco anos. No cenário pós-radioterapia, as taxas são de 61% em dois anos e 72% em cinco anos (31). O tratamento indicado para esses pacientes é o uso de inibidores da fosfodiesterase tipo 5. No caso de falha terapêutica, outras opções podem ser consideradas, desde injeções intracavernosas de prostaglandinas até a colocação de prótese peniana (30).

É sabido também que a privação de andrógenos contribui para o aumento do risco de fraturas e da diminuição da densidade mineral óssea. Portanto, torna-se fundamental para os pacientes uma alimentação que contenha, diariamente, pelo menos 1.200 mg de cálcio e 600 UI de vitamina D, devendo ser feita a suplementação, se necessária. Num cenário ideal, o paciente que fará uso de um tratamento de privação de andrógenos deveria ser submetido a uma avaliação de sua densidade mineral óssea antes do início da terapêutica, seguida por avaliações seriadas posteriormente. Contudo, o que se vê na prática é uma alta taxa de negligência nessa avaliação (30).

A radioterapia pode ser causadora de proctite aguda ou crônica, levando à sintomatologia intestinal, como: peristaltismo irregular, flatulência, diarreia e sangramento retal. Há melhora com hidratação, uso de laxantes, corticoides tópicos e anti-inflamatórios. Efeitos mais tardios podem incluir úlceras retais, formação de fístulas, disfunção esfincteriana e dor retal (30).

Cerca de 40% dos homens também terão sintomas vasomotores, como ondas de calor, após o tratamento de privação androgênica. Devido a seu efeito eritropoiético, a falta de andrógenos também pode levar a anemias normocíticas normocrômicas. Por fim, especula-se ainda que esse tipo de tratamento pode aumentar o risco cardiovascular, por facilitar o desenvolvimento de síndrome metabólica (30).

Além desses fatores, é fundamental que o paciente com câncer de próstata receba avaliações psicológicas como parte de seu acompanhamento, visto que há evidências demonstrando uma queda significativa na qualidade de vida de pacientes diagnosticados com câncer de próstata, sobretudo nos seis

meses seguintes ao diagnóstico. Daqueles que sobreviveram à doença, cerca de 9% a 25% são afetados por transtorno depressivo maior e pelo menos 25% possuem ansiedade. Dessa forma, é imprescindível que o médico avalie os fatores de risco para estresse psicológico e, caso julgue necessário, encaminhe para que haja uma intervenção especializada.

Deve-se também levar em conta a grande carga de estresse que o diagnóstico e o tratamento do câncer de próstata causam à parceira do paciente. Recomenda-se, portanto, que a parceira esteja presente na tomada de decisões no manejo do paciente, sobretudo aquelas que podem afetar diretamente o relacionamento, como as que dizem respeito à disfunção erétil, ansiedade, depressão e efeitos adversos do tratamento antiandrogênico.

Por fim, há possibilidade de, após o tratamento, haver recidiva do tumor. As taxas de recidiva do câncer de próstata dependem de seu estadiamento prévio e dos hábitos de vida do paciente. Neste sentido, D'Amico propôs uma divisão de grupos prognósticos para doença localizada baseada no PSA pré-tratamento, no Escore de Gleason e no estadiamento pelo sistema TNM (Tabela 4) (14). Dietas não balanceadas (poucas frutas e vegetais e excesso de álcool), sedentarismo e tabagismo também estão associados a maiores chances de recidiva do tumor (30).

Tabela 3 – Classificação de risco para recidiva do câncer de próstata proposta por D'Amico

| Risco | Variáveis consideradas | Sobrevida livre de doença em 10 anos |
|---|---|---|
| Baixo | PSA < 10 ng/mL, Gleason ≤ 6, Estágio ≤ 2a | 83% |
| Intermediário | PSA entre 10 e 20 ng/mL, Gleason 7, Estágio 2b-c | 46% |
| Alto | PSA > 20 ng/mL, Gleason 8-10, Estágio 3a-b | 29% |

Fonte: MAGNABOSCO, W.J., 2014.

Nos pacientes não tratados, com câncer de próstata avançado, o prognóstico é considerado ruim, sendo dita uma condição incurável, uma vez que

há invasão linfonodal e metástases ósseas. Nesses casos, as taxas de sobrevida em cinco anos caem para um terço daquelas de pacientes com doença localizada. As terapias de supressão androgênica indicadas nesse estágio conseguem prolongar a vida do paciente em 2 a 3 anos até que os tumores tornem-se resistentes. Até mesmo as drogas indicadas para tumores resistentes à castração química podem se deparar com resistência tumoral (32).

### 1.1.6 Rastreamento

Os exames mais largamente utilizados para o rastreamento do câncer de próstata são o PSA e o toque retal. O PSA é um marcador também utilizado para diagnóstico precoce, avaliação da resposta à terapia e determinação de progressão tumoral, sendo um exame próstata-específico, mas não doença-específico, possuindo várias limitações, tais como: baixa sensibilidade para detecção de tumores em estágios precoces; possibilidade de resultados falso-positivos (baixa especificidade) relacionados a medicamentos, inflamações (hiperplasia benigna da próstata e prostatites), idade, trauma e manipulação urológica, entre outros; controvérsia relacionada aos níveis do marcador que deveriam indicar uma biópsia ou revelar a presença de metástases; etc. A descoberta de novos biomarcadores utilizando técnicas de biologia molecular, associados ou não ao PSA, apresenta potencial para revolucionar o diagnóstico e o manejo do câncer de próstata no futuro (33).

Atualmente, devido a sólidas evidências na literatura argumentando que o rastreamento do câncer de próstata pode ser mais maléfico do que benéfico, as vantagens de sua realização vêm sendo colocadas em pauta. Segundo os autores defensores dessa corrente, a maior parte dos tumores prostáticos tem evolução indolente, surgindo numa idade avançada e em poucas vezes evoluem para um quadro letal, de modo que grande parte das pessoas que apresentam essa doença, mesmo quando não tratadas, não morrerão em decorrência de sua existência. Ademais, além do estresse gerado por um diagnóstico de câncer, é comum que o paciente receba alguma forma de tratamento efetivo, mesmo quando não há indicação explícita. Como não há medida curativa isenta de riscos, muitos pacientes acabam trocando um tumor de comportamento pouco agressivo e assintomático pelos frequentes efeitos colaterais da terapêutica, como incontinência urinária e disfunção erétil.

Por outro lado, as políticas de rastreamento do câncer de próstata e a maior conscientização da população masculina contribuíram para o declínio do diagnóstico de neoplasias de próstata em estágios avançados. Essas medidas proporcionaram um aumento de diagnóstico de tumores em estágio inicial, reduziram a incidência de metástases e melhoraram as chances de cura. Além disso, existe uma fração da população com a doença que evoluirá de maneira mais agressiva, oferecendo perigo real à vida, que pode não ser acompanhada devidamente caso o rastreamento não seja realizado.

No Brasil, o Instituto Nacional de Câncer (INCA) não recomenda a realização do rastreamento populacional em massa para o câncer de próstata (34). Já a Sociedade Brasileira de Urologia (SBU) sugere que o rastreamento seja feito anualmente naqueles pacientes com expectativa de vida superior a 10 anos, começando aos 50 anos na população de baixo risco e aos 45 anos nos homens da raça negra ou naqueles com história familiar positiva de câncer de próstata em parentes de primeiro grau. Ainda segundo a SBU, sugere-se que, a partir dos 75 anos, se o homem não tiver no mínimo 10 anos de expectativa de vida, haverá baixo potencial de benefício com o rastreamento, devendo, portanto, interrompê-lo (35). A European Association of Urology (EAU) comunga das recomendações da SBU, com a diferença de considerar a expectativa de vida de 15 anos (36).

Independentemente do posicionamento, há um ponto de comum acordo de que o paciente deve ser bem informado das vantagens e desvantagens de se realizar o rastreamento de câncer de próstata, de modo que ele participe da tomada de decisão em rastrear ou não. Infelizmente, os *guidelines* disponíveis atualmente na literatura dão ao médico pouco além de sua recomendação, sem explicitar devidamente quais os potenciais benefícios e malefícios em se realizar o rastreamento. É importante salientar que essas informações são fundamentais para que o médico seja capaz de orientar o paciente de modo que ambos possam tomar uma decisão mais consciente e bem embasada (37).

Outro aspecto que deve ser levado em consideração é a relação custo/efetividade de realizar um programa de rastreamento como esse no sistema de saúde de nosso país. Um estudo canadense demonstrou que, no geral, realizar o rastreamento pelo PSA se mostrou caro e ineficaz para seu custo, embora tenha sido demonstrada uma boa relação custo/efetividade para o rastreamento em populações selecionadas (38). Sem dúvidas, a realidade

brasileira é diferente em inúmeros aspectos, de modo que ainda é difícil falar de custo/efetividade no rastreamento de câncer de próstata nessa população.

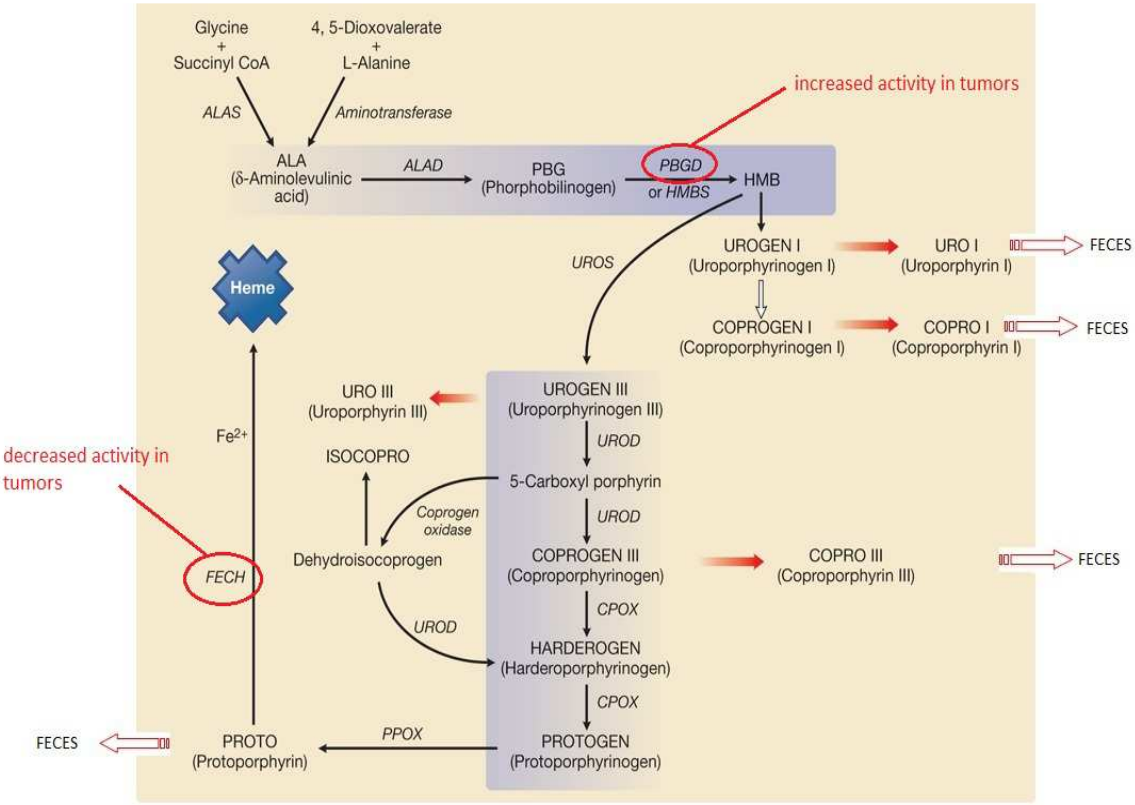
Diante desse cenário, observa-se uma forte propulsão dos estudos genéticos a respeito do câncer de próstata no intuito de conseguir identificar alelos que, quando presentes, sugerem uma maior chance de desenvolver a doença ou uma evolução desfavorável. Contudo, por se tratar de uma condição fenotípica com relação multigênica, o desenvolvimento desses marcadores tem se mostrado uma necessidade e, ao mesmo tempo, um desafio (10).

## 1.2 Porfirinas

As porfirinas são compostos tetrapirrólicos cíclicos que atuam como intermediários na biossíntese do grupo heme. As mais importantes na natureza são a coproporfirina, a uroporfirina e a protoporfirina IX (PpIX), produzidas durante a síntese do heme que, ligado a várias proteínas, exerce papel central em várias funções orgânicas vitais, tais como: transporte e armazenamento de oxigênio, geração de energia celular, reações de detoxificação, reações de redução mediadas por peroxidase, biossíntese de certos esteroides, regulação da síntese de determinadas proteínas e desenvolvimento celular (39).

Ainda que todas as células de mamíferos tenham a capacidade de sintetizar porfirinas e o grupo heme, essa produção é quantitativamente mais significativa na medula óssea e no fígado, consistindo em oito etapas catalisadas por enzimas específicas distribuídas nos compartimentos mitocondrial e citosólico da célula (Figura 2).

Figura 2 – Biossíntese do heme




Fonte: WOLFF, K *et al.*, 2011.

Perturbações bioquímicas e funcionais nas vias metabólicas normais da biossíntese do heme foram descritas pela primeira vez no fim do século passado. Na maioria das vezes de caráter genético, essas aberrações levavam a depósitos ou níveis circulantes alterados das porfirinas e seus precursores, tendo sido alcunhadas de porfirias. As porfirias podem se manifestar clinicamente por uma ampla variedade de sinais e sintomas e seu diagnóstico contempla a dosagem de determinadas porfirinas no sangue, fezes e urina, cuja alteração apresenta relação com as deficiências das enzimas observadas na Figura 2 (39,40).

As deficiências enzimáticas observadas nas porfirias estão associadas ao acúmulo de intermediários tóxicos do metabolismo do heme, levando ao aparecimento de dor abdominal, sintomas neuropsiquiátricos e alterações cutâneas nos indivíduos doentes. As manifestações neurológicas ocorrem devido

a um excesso tóxico do ácido 5-aminolevulínico, precursor de porfirinas, ou devido a um déficit de hemeproteínas vitais resultantes de síntese prejudicada do heme. As manifestações cutâneas são devido ao acúmulo de intermediários porfirínicos fototóxicos na pele, causando fotossensibilidade que, historicamente, estava presente juntamente com a alteração na cor da urina nos primeiros relatos da doença (39,40).

As manifestações cutâneas das porfirias conduziram ao entendimento de que as porfirinas seriam substâncias capazes de interagir com a luz, podendo absorvê-la e transformá-la em fluorescência, sendo por isso consideradas moléculas que se comportam como fluoróforos endógenos.

Além das porfirias, outras afecções como alguns tipos de anemias, doenças hepatobiliares e intoxicações por metais e outros químicos também podem interferir na síntese do heme e nos mecanismos de excreção das porfirinas.

No caso da anemia por deficiência de ferro, a principal causa de anemia no mundo, a PpIX se acumula nos eritrócitos, embora muito raramente em níveis encontrados na protoporfiria eritropoiética, um tipo de porfiria.

Anemia sideroblástica, intoxicação exógena pelo hexaclorobenzeno, envenenamento por chumbo, pacientes com doença renal crônica sob diálise, tirosinemia hereditária, alcoolismo e tumores também podem alterar o perfil bioquímico das porfirinas, principalmente aquelas excretadas pela urina (39).

O metabolismo anormal da PpIX eritrocitária tem sido observado em indivíduos com câncer, fazendo com que os níveis dessa substância estejam elevados e possam ser quantificados em tecidos e líquidos biológicos humanos e de cobaias inoculadas com células neoplásicas. A determinação dos níveis dessa substância foi utilizada para investigar o câncer de mama e intestinal em humanos e o câncer de próstata em modelos animais, entre outros (41-44).

As principais hipóteses que parecem explicar a alteração no metabolismo das porfirinas no câncer são:

- hipervascularização característica das neoplasias malignas, que poderia potencializar o acúmulo de porfirinas pelo fato de maior quantidade de hemoglobina reagir com o tumor, na tentativa de neutralizá-lo (43);

- maior lipossolubilidade da PpIX em ambiente ácido, situação compatível com a presença de ácido lático proveniente do metabolismo anaeróbio encontrado em vários tumores (42);
- presença de bactérias em tumores de vísceras ocas, que poderiam degradar a hemoglobina na superfície luminal, contribuindo para o aumento do sinal porfirínico (45); e, principalmente,
- redução da disponibilidade intracelular de ferro pelo aumento da frequência de divisão celular, redução de atividade da enzima ferroquelatase e aumento da atividade da enzima porfobilinogênio deaminase, interferindo na incorporação do ferro presente na biossíntese do heme, favorecendo o acúmulo de PpIX no tumor (45-48).

Em animais inoculados com células de câncer prostático, a síntese de PpIX está alterada, interferindo na síntese de coproporfirinas e de outros metabólitos fecais (43,44), não existindo, contudo, estudos que tenham verificado essas alterações em fezes de seres humanos.

Na prática médica, a determinação bioquímica da concentração dos diversos tipos de porfirinas em líquidos biológicos tem sido utilizada com maior frequência, juntamente com exames genéticos, para o diagnóstico e acompanhamento de indivíduos com porfiria, havendo poucos estudos na literatura para outras finalidades.

Dentre as diversas técnicas utilizadas para a quantificação de porfirinas, no contexto das porfirias, citam-se os métodos espectrofotométricos e fluorimétricos para dosagem de porfobilinogênio urinário. Porfirinas totais e seus diversos subtipos também podem ser mensurados por HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência) no plasma, fezes e urina, contribuindo para o diagnóstico bioquímico em pacientes sintomáticos (49,50).

Para os estudos experimentais e clínicos envolvendo a dosagem de porfirinas no contexto oncológico, a espectroscopia de fluorescência foi o mais utilizado na literatura, por ter se mostrado um exame de baixo custo, simples, rápido e seguro (41-45).

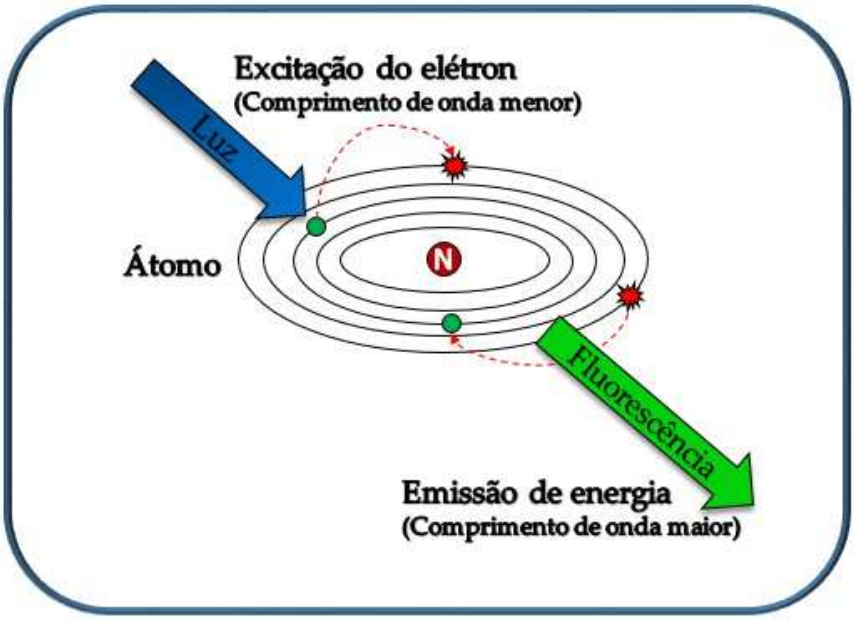
### 1.3 Espectroscopia de fluorescência

Na natureza existem moléculas capazes de interagir com a luz, denominadas de cromóforos, representados por três tipos principais:

(1) fluoróforos, que absorvem a luz e a transformam em fluorescência;
(2) absorvedores, que absorvem a luz, mas não a transformam em fluorescência;
(3) espalhadores, que modificam a direção do fóton sem alterar seu comprimento de onda (52).

No caso dos fluoróforos, ocorre um processo de excitação molecular pela incidência de luz (ultravioleta ou visível) que, quando absorvida, leva a molécula a um maior nível de energia vibracional, fazendo com que elétrons excitados retornem ao seu estado fundamental, ocorrendo a emissão de fótons, conforme ilustrado na Figura 3 (53).

Figura 3 – Fenômeno da fluorescência




Esquema de um átomo em que, com a incidência de energia luminosa, com comprimento de onda menor, possibilita o salto quântico do elétron para um estado mais energético. Quando o elétron retorna para seu estado fundamental (original), há a liberação da energia luminosa com comprimento de onda maior que o incidente.
Fonte: ROCHA, L. G.; NETO, A. O., 2018.

A emissão da fluorescência difere da fosforescência pelo tempo de vida. Enquanto na fluorescência o tempo de vida é da ordem de nanossegundos, na fosforescência o tempo de vida é da ordem de milissegundos/segundos, diferença de tempo atribuída à natureza do estado de excitação eletrônica.

Os fluoróforos são representados tipicamente por moléculas aromáticas em compostos orgânicos e podem ser divididos em dois tipos:

- intrínsecos ou endógenos, também chamados de autofluorescentes: que ocorrem naturalmente. Exemplos: aminoácidos (triptofano, tirosina e fenilalanina), proteínas estruturais (colágeno e elastina), enzimas, vitaminas, lipídeos e porfirinas;
- extrínsecos ou exógenos: que são adicionados artificialmente a uma amostra para transmitir-lhe capacidade espectral. Exemplo: fluoresceína (52).

A Tabela 4 apresenta os comprimentos de onda de excitação e de emissão específicos de diversas moléculas autofluorescentes encontradas no organismo, permitindo sua identificação a partir da captação dos fótons emitidos (54).

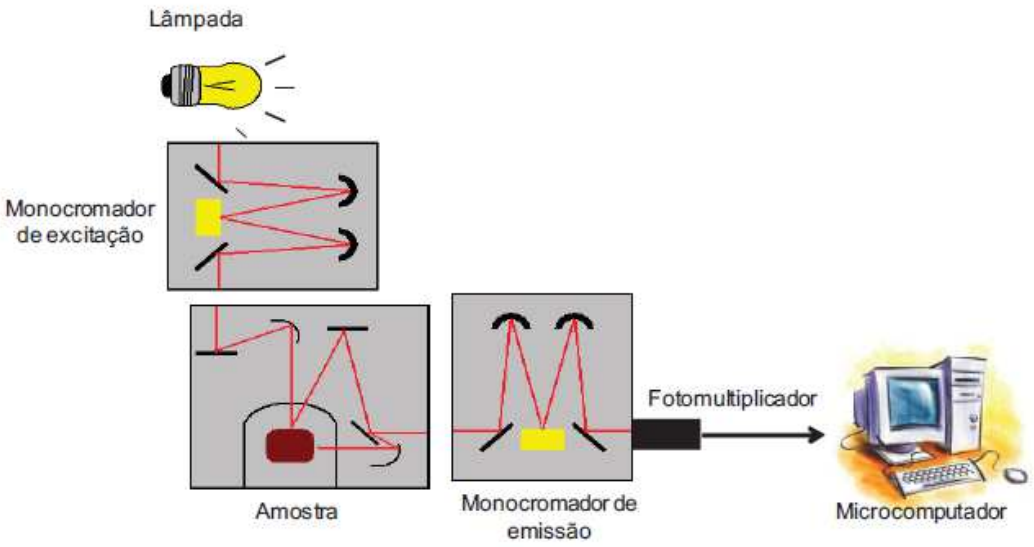
Tabela 4 – Comprimentos de onda de excitação e emissão de fluoróforos endógenos

| Fluoróforos Endógenos | Excitação (nm) | Emissão (nm) |
|---|---|---|
| **Aminoácidos** | | |
| Triptofano | 280 | 350 |
| Tirosina | 275 | 300 |
| Fenilalanina | 260 | 280 |
| **Proteínas Estruturais** | | |
| Colágeno | 325 | 400, 405 |
| Elastina | 290, 325 | 340, 400 |
| **Enzimas e Coenzimas** | | |
| FAD, flavinas | 450 | 535 |
| NADH | 290, 351 | 440, 460 |
| NADPH | 336 | 464 |
| **Vitaminas** | | |
| Vitamina A | 327 | 510 |
| Vitamina K | 335 | 480 |
| Vitamina D | 390 | 480 |
| Componentes da Vitamina B6 | | |
| Piridoxina | 332, 340 | 400 |
| Piridoxamina | 335 | 400 |
| Piridoxal | 330 | 385 |
| Ácido piridóxico | 315 | 425 |
| Piridoxal 5-fosfato | 330 | 400 |
| Vitamina B12 | 275 | 305 |
| **Lipídeos** | | |
| Fosfolipídeos | 436 | 540, 560 |
| Lipoficsina | 340-395 | 540, 430-460 |
| Ceroides | 340-395 | 430-460, 540 |
| **Porfirinas** | 400-450 | 630, 690 |

Fonte: Traduzido de BOTTIROLI, G.; CROCE, A., 2004.

A técnica utilizada para realizar a identificação e a quantificação de fluoróforos é conhecida como espectroscopia de fluorescência, considerada atualmente uma das principais ferramentas para determinação da energia absorvida e emitida por diversas moléculas (54). A amostra é submetida ao espectrofotômetro de fluorescência, um equipamento que emite luz em comprimento de onda específico para atingir a amostra com a molécula orgânica que se deseja analisar (Figura 4). Uma lâmpada é utilizada como fonte de excitação, cuja luz atravessa um monocromador responsável pela individualização da energia luminosa que atingirá a amostra. Por meio de vários espelhos e refletores a luz chega até a amostra e provoca excitação das moléculas que emitem luz em outro comprimento de onda específico. A emissão novamente passa por um monocromador e é captada por um fotomultiplicador acoplado a um software, sendo convertido em imagens espectrais (55).

Figura 4 – Esquema geral de funcionamento de um espectrofotômetro de fluorescência

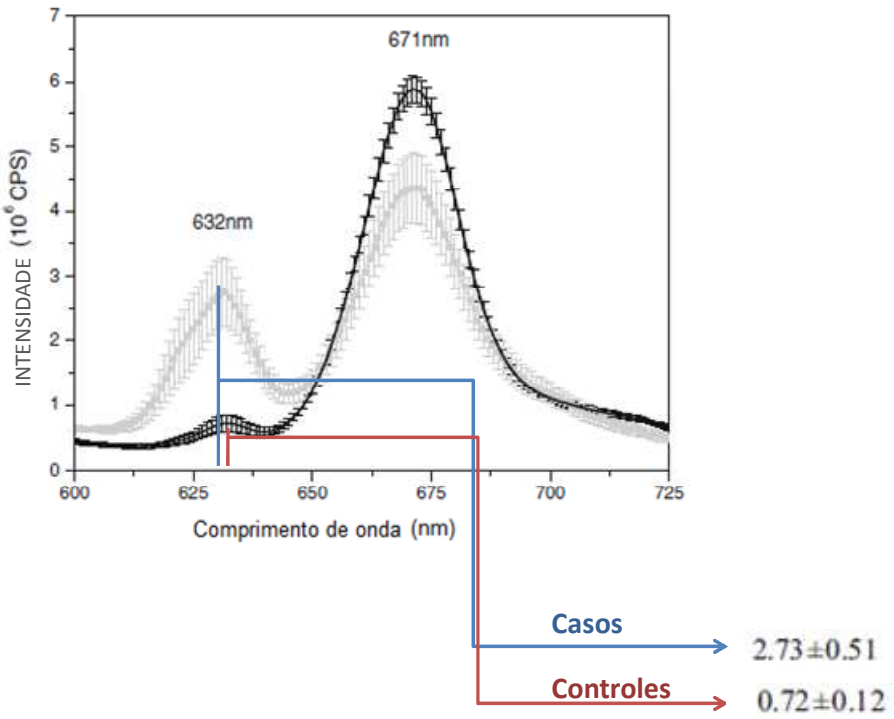



Fonte: Adaptada de GOMES, C.Z.,2011.

Os picos de emissão obtidos pelo software acoplado ao computador do espectrofotômetro são visualizados no comprimento de onda específico da molécula que se pretende analisar, e sua intensidade em CPS (contagens por segundo) ou unidades arbitrárias (u.a.) é proporcional à concentração dessa substância. Usualmente a área sob o pico principal pode ser representada

numericamente e comparada com amostras de controles ou de indivíduos com pequenos níveis da substância estudada (Figura 5).

Figura 5 – Espectro de emissão de um fluoróforo endógeno e sua representação numérica




Fonte: Adaptada de SILVA, F.R. *et al.*,2013.

A espectroscopia de fluorescência tem sido extensivamente utilizada na área biomédica para identificação e quantificação de vários compostos, com destaque para as porfirinas, estudadas como biomarcadores em vários tipos de tumores e em outras doenças. Dentre as porfirinas, a análise da PpIX no sangue é a que mais predomina em estudos envolvendo neoplasias. Porfirinas fecais foram pouco exploradas nesse contexto, principalmente em se tratando de pesquisas envolvendo seres humanos (41-48, 56,57).

O uso de fluoróforos exógenos como o ácido 5-aminolevulínico (ALA) tem se disseminado na comunidade médica. O ALA tem sido utilizado com frequência como fotossensibilizador para fins diagnósticos, principalmente em

doenças neoplásicas (58). Fotossensibilizadores também podem ser utilizados em um processo conhecido como Terapia Fotodinâmica, uma reação fotoquímica em que se associam uma fonte de luz e oxigênio à substância fotossensibilizante. Suas aplicações compreendem o combate a doenças neoplásicas, arteriosclerose, tratamentos odontológicos e, principalmente, dermatoses, como psoríase, câncer cutâneo, micoses, viroses, bacterioses, entre outras (59).

# 2 OBJETIVOS

## 2.1 Objetivo geral

Determinar os níveis de porfirinas nas fezes de indivíduos com e sem câncer de próstata, por meio da espectroscopia de fluorescência, em um estudo do tipo caso-controle inédito em seres humanos.

## 2.2 Objetivos específicos

Determinar a melhor proporção de diluição acetona:fezes para obtenção de picos espectrofotométricos de porfirinas fecais em seres humanos.

Verificar a existência de possíveis variáveis sociodemográficas, clínicas e laboratoriais associadas aos níveis de porfirinas fecais encontrados.

Verificar possível correlação entre os níveis de porfirinas fecais e os níveis de PSA nos pacientes com câncer de próstata e no conjunto total de indivíduos estudados.

# 3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

## 3.1 Cálculo amostral

A quantidade de indivíduos a serem incluídos em um estudo do tipo caso-controle depende das seguintes variáveis: 1) proporção de expostos ao fator de estudo esperada no grupo-controle; 2) estimativa de risco relativo associado à exposição; 3) nível de significância desejado (α); 4) poder do estudo desejado (1-ß). Aos números mínimos de casos e de controles calculados, acrescentam-se 10% ou 20% para suprir eventuais perdas futuras (60). No entanto, a proporção esperada de pacientes com níveis elevados de porfirinas fecais sem câncer de próstata não é conhecida na literatura, tendo em vista que as pesquisas realizadas até o momento contemplaram o câncer prostático apenas em cobaias. Em seres humanos, as porfirinas foram estudadas em outros tipos de câncer, mas não o prostático (Tabela 5).

Tabela 5 – Autores, ano, tipo de estudo, tipo de câncer e amostra utilizada (n) em estudos de referência que evidenciaram aumento de porfirinas, principalmente a PpIX, em doenças neoplásicas.

| AUTORES | ANO | ESTUDO | n | TIPO DE CÂNCER |
|---|---|---|---|---|
| EL-SHARABASY, MMH *et al* | 1992 | Clínico | 14 x 14 | Leucemia linfoblástica |
| VAN DER BREGGEN, EWJ *et al* | 1996 | Experimental | 12 | Lesões pré-malignas e carcinoma de céls. Escamosas (boca) |
| LI, S *et al* | 1996 | Clínico | 139/76 | Estômago e Fígado |
| KALAIVANI, R *et al* | 2008 | Clínico | 35 x 28 | Mama |
| BELLINI, MH *et al* | 2008 | Experimental | 24 | Renal |
| DAE-SUNG HYUN, MD *et al* | 2009 | Clínico | 19 | Pulmão |
| JIA, Z; WAN, X | 2009 | Clínico | 30 x 30 | Cólon e reto |
| SILVA, FR; BELLINI, MH *et al* | 2013 | Experimental | 5 x 7 | Próstata |

Outra maneira de se proceder ao cálculo amostral é por meio da média, desvio padrão (DP), variância, nível de significância e poder do estudo desejado, tendo sido esta a estratégia utilizada para esta pesquisa a partir dos resultados encontrados nos estudos de referência (42,44).

Devido à grande diferença nos níveis de porfirinas observados por esses autores, o cálculo resultou em uma amostra muito pequena para o presente estudo (Quadro 1).

Quadro 1 – Amostra calculada a partir da quantidade de porfirinas encontrada (média ± DP) em estudos de referência

| Estudo de referência | Tipo de estudo | Controles (média ± DP) | Casos (média ± DP) | Nível de confiança | Poder | Amostra calculada |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **44** | Experimental (Câncer de próstata) | 0.72 ± 0.12 | 2.73 ± 0.51 | 99% | 90% | 4 |
| **42** | Clínico (Câncer colorretal) | 0.58 ± 0.08 | 2.28 ± 0.10 | 99% | 90% | 2 |

Considerando-se o pequeno número de pacientes necessário para o estudo a partir do cálculo amostral, optou-se pelo recrutamento de 20 pacientes, 10 casos e 10 controles, em uma amostra semelhante àquelas estudadas por outros autores (44,61,62).

### 3.2 Recrutamento dos indivíduos com e sem câncer de próstata

O recrutamento dos indivíduos foi realizado de forma a se obter um adequado pareamento entre casos e controles, levando em consideração atributos como a idade, a etnia, o grau de escolaridade, a condição socioeconômica e outras variáveis pertinentes entre os grupos estudados. Em estudos do tipo caso-controle, a investigação deve antecipar os vieses que eventualmente possam surgir, principalmente os vieses de seleção, minimizando o julgamento no processo de seleção. Por exemplo, se o grupo caso inclui indivíduos com câncer de uma específica região geográfica, então o grupo controle deve ser escolhido de forma aleatória entre a população geral da mesma área. É preciso examinar a informação dada pelo pesquisador sobre a indicação de quão bem o grupo controle representa os casos, independentemente do fator de exposição a ser estudado. Essa averiguação despende tempo e energia, mas representa o ponto primordial de um estudo do tipo caso-controle (60).

Como casos, recrutaram-se pacientes com câncer de próstata diagnosticados por biópsia no Centro de Oncologia e Radioisótopos, pertencente

ao Hospital Márcio Cunha/Fundação São Francisco Xavier (COR/FSFX), no município de Ipatinga, MG. Como controles, foram recrutados indivíduos saudáveis que tinham se submetido a exames de toque retal e PSA total com resultados negativos nos últimos 12 (doze) meses, recrutados nos ambulatórios da Policlínica Municipal ligada à Secretaria Municipal de Saúde de Ipatinga, MG.

O recrutamento ocorreu entre os meses de julho e outubro de 2017. Os pacientes sem câncer prostático foram recrutados logo após consulta urológica em que o toque retal foi realizado e o resultado do exame do PSA foi verificado. Esses pacientes do grupo controle receberam os frascos e as instruções para coleta e armazenamento das fezes após a leitura e a explicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE, contido no Apêndice A.

Quanto aos pacientes com câncer, foi discutido e determinado, em equipe multiprofissional composta por médicos, enfermeiros e psicólogos, o melhor momento para a abordagem, tendo em vista que eles poderiam estar fragilizados pela experiência da doença. A aproximação aos pacientes foi realizada em uma das consultas previstas entre o diagnóstico e o início do tratamento, sem a presença dos pesquisadores. Quando, após discussão em equipe multiprofissional, constatou-se que a abordagem e a coleta de amostras deveriam ser feitas em ocasiões diferentes das previstas, os custos com o transporte dos pacientes foram arcados pelos próprios pesquisadores. A abordagem do paciente para esclarecimentos, leitura e assinatura do TCLE foi realizada em uma sala reservada para esse fim, no COR/FSFX.

O recrutamento e a coleta de amostras iniciaram-se somente após a aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Centro Universitário do Leste de Minas Gerais, localizado na cidade de Coronel Fabriciano, Minas Gerais, credenciado junto à Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), sob o número 784.592.

### 3.3 Variáveis sociodemográficas, dados clínicos e laboratoriais

Variáveis sociodemográficas foram analisadas para garantir a homogeneidade dos grupos estudados. Dados clínicos e laboratoriais foram obtidos por meio de prontuários e entrevistas realizadas com indivíduos de ambos os grupos com a finalidade de descartar outras causas descritas na literatura para o aumento de porfirinas fecais (Tabela 5).

Tabela 6 – Variáveis sociodemográficas, dados clínicos e laboratoriais analisados

| Variáveis sociodemográficas | Dados clínicos | Dados laboratoriais |
|---|---|---|
| Idade | Uso de antimicrobianos | Hemoglobina |
| Estado civil | Histórico de porfiria | Ferritina |
| Escolaridade | Histórico de câncer | Glicemia em jejum |
| Tabagismo | Histórico de outras doenças prostáticas (hiperplasia prostática benigna, prostatite) | Níveis de PSA |
| Uso de álcool | Anemia | |
| História familiar | Diabetes | |
| | Dislipidemia | |
| | Intoxicação por chumbo e outros metais | |

Para aquisição das variáveis foi elaborado um formulário de pesquisa preenchido com informações obtidas do prontuário do paciente e de uma entrevista com duração média de 20-30 minutos realizada pelo pesquisador responsável e por cinco acadêmicos de medicina devidamente treinados (Apêndices B e C).

### 3.4 Coleta e armazenamento das amostras

Os pacientes colheram as fezes no próprio domicílio, utilizando espátula e um frasco de cor âmbar, pelo fato de as porfirinas fecais serem substâncias fotossensíveis. Após o procedimento, recomendou-se que os frascos fossem conservados no congelador até o momento da entrega ao pesquisador responsável. Os pacientes receberam as orientações verbalmente e por escrito (Apêndice D).

O pesquisador armazenou todas as amostras coletadas em congelador a -20 graus Celsius até o momento do processamento. Todas as amostras de ambos os grupos foram processadas em até 24 horas após a coleta.

### 3.5. Processamento das amostras

O processamento das amostras foi realizado após o descongelamento total do material.

Primeiramente, procedeu-se à pesagem das fezes na balança de precisão após procedimento de tara manual do equipamento. Em seguida, realizou-se a extração das porfirinas com acetona grau analítico.

As porfirinas fecais foram extraídas usando volumes de fezes e de acetona diferentes, com vistas à identificação da melhor proporção de diluição para realização da análise dos picos espectrofotométricos (Tabela 6).

Tabela 7 – Volumes de fezes e acetona utilizados em cada diluição

| Diluição | Acetona (mL) | Fezes (g) |
|---|---|---|
| **1** | 3 | 0,3 |
| **2** | 1 | 0,05 |
| **3** | 3 | 0,2 |
| **4** | 3 | 0,4 |

Após a extração, a mistura foi agitada por 15 segundos e centrifugada a 4.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi pipetado em triplicata e, posteriormente, acondicionado em frascos do tipo Eppendorf para análise por espectroscopia de fluorescência.

### 3.6 Análise espectroscópica das amostras

A fluorescência emitida pelas porfirinas fecais foi analisada com um fluorímetro Horiba Jobin Yvon Fluorolog 3 no intervalo de 550-750 nm, nos laboratórios do Departamento de Física do Instituto de Ciências Ambientais Químicas e Farmacêuticas (ICAQF) da Universidade Federal de São Paulo (Unifesp), Campus Diadema, São Paulo, SP. O espectro de emissão foi obtido pela excitação das amostras a 405 nm, dentro de uma cubeta, por meio de uma abertura de 1 mm no *slit*, fenda que define a quantidade de luz que atingirá a amostra. O material foi analisado considerando-se a média das três medidas de cada amostra (“average multiple curves”) para o cálculo dos resultados de cada indivíduo de cada grupo.

### 3.7 Análise estatística

Os dados foram analisados empregando-se estatística descritiva e inferencial. Para análise estatística, foi utilizado o software SPSS®, versão 19.0. As variáveis quantitativas foram descritas por meio de média e desvio padrão. As variáveis qualitativas foram descritas por meio de frequência absoluta e relativa. Foi aplicado o teste de Kolmogorov-Smirnov para verificação da normalidade. Para comparação das médias dos grupos utilizou-se o teste t independente, e para verificar a correlação utilizou-se o teste de Pearson. O nível de significância adotado foi de 5%.

O software OriginPro® v. 8.0724 foi utilizado para consolidar a média das três medidas de cada amostra e para geração dos picos espectrofotométricos individuais e totais, contendo média ± DP dos grupos caso e controle. O cálculo amostral foi elaborado por meio da ferramenta *on line* encontrada em http://www.openepi.com/SampleSize/SSMean.htm.

# 4 RESULTADOS

Dois indivíduos, sendo um de cada grupo, não procederam à coleta do material, perfazendo o total de 18 amostras coletadas e analisadas.

## 4.1 Variáveis sociodemográficas e dados clínicos

A Tabela 7 mostra a comparação entre os grupos quanto à idade. A Tabela 8 mostra a homogeneidade entre os grupos, requerida para estudos do tipo caso-controle, a partir da análise da frequência das variáveis estudadas.

Tabela 8 – Média de idade ± DP dos casos e dos controles

| Idade (anos) | Média ± DP | *p value* |
|---|---|---|
| Pacientes do grupo controle | 66,0 ± 7,18 | 0,2 |
| Pacientes do grupo com câncer | 70,6 ± 7,75 | |

Tabela 9 – Frequência das variáveis estudadas nos casos (n=9) e controles (n=9)

| Variáveis | Controles | | Casos | |
|---|---|---|---|---|
| | n | % | n | % |
| **Estado civil** | | | | |
| Casado | 6 | 66,6 | 7 | 77,7 |
| Solteiro | 1 | 11,1 | 0 | 0 |
| Divorciado | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Viúvo | 2 | 22,3 | 2 | 22,3 |
| **Etilismo** | | | | |
| Sim | 1 | 11,2 | 0 | 0 |
| Não | 8 | 88,8 | 9 | 100 |
| **Tabagismo** | | | | |
| Sim | 0 | 0 | 3 | 33,3 |
| Não | 9 | 100 | 6 | 66,6 |
| **História familiar de câncer de próstata** | | | | |
| Sim | 2 | 22,3 | 2 | 22,3 |
| Não | 7 | 77,7 | 7 | 77,7 |
| **Histórico de outros tipos de câncer** | | | | |
| Sim | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Não | 9 | 100 | 9 | 100 |
| **Doença prostática (hiperplasia prostática benigna e prostatite)** | | | | |
| Sim | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Não | 9 | 100 | 9 | 100 |
| **Diabetes** | | | | |
| Sim | 2 | 22,3 | 1 | 11,2 |
| Não | 7 | 77,7 | 8 | 88,8 |
| **Dislipidemia** | | | | |
| Sim | 1 | 11,2 | 1 | 11,2 |
| Não | 8 | 88,8 | 8 | 88,8 |
| **Porfiria** | | | | |
| Sim | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Não | 9 | 100 | 9 | 100 |
| **Anemia** | | | | |
| Sim | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Não | 9 | 100 | 9 | 100 |
| **Intoxicação por chumbo/metais** | | | | |
| Sim | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Não | 9 | 100 | 9 | 100 |
| **Uso de antimicrobianos** | | | | |
| Sim | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Não | 9 | 100 | 9 | 100 |

Em relação ao estadiamento dos pacientes com câncer, foram recrutados três pacientes de cada estágio pela classificação D'Amico, com o PSA total variando entre 4,41 e 130,16 ng/mL e o Escore de Gleason variando de 4 a 9.

Todos os indivíduos foram arguidos enfaticamente em relação a comorbidades e hábitos de interesse capazes de interferir nos níveis de porfirinas fecais. Uso de antimicrobianos, dietas, profissão que pudesse levar a uma intoxicação ocupacional, comorbidades como diabetes, dislipidemia, porfirias e outros tipos de câncer foram informações requeridas durante a entrevista clínica (Apêndices B e C).

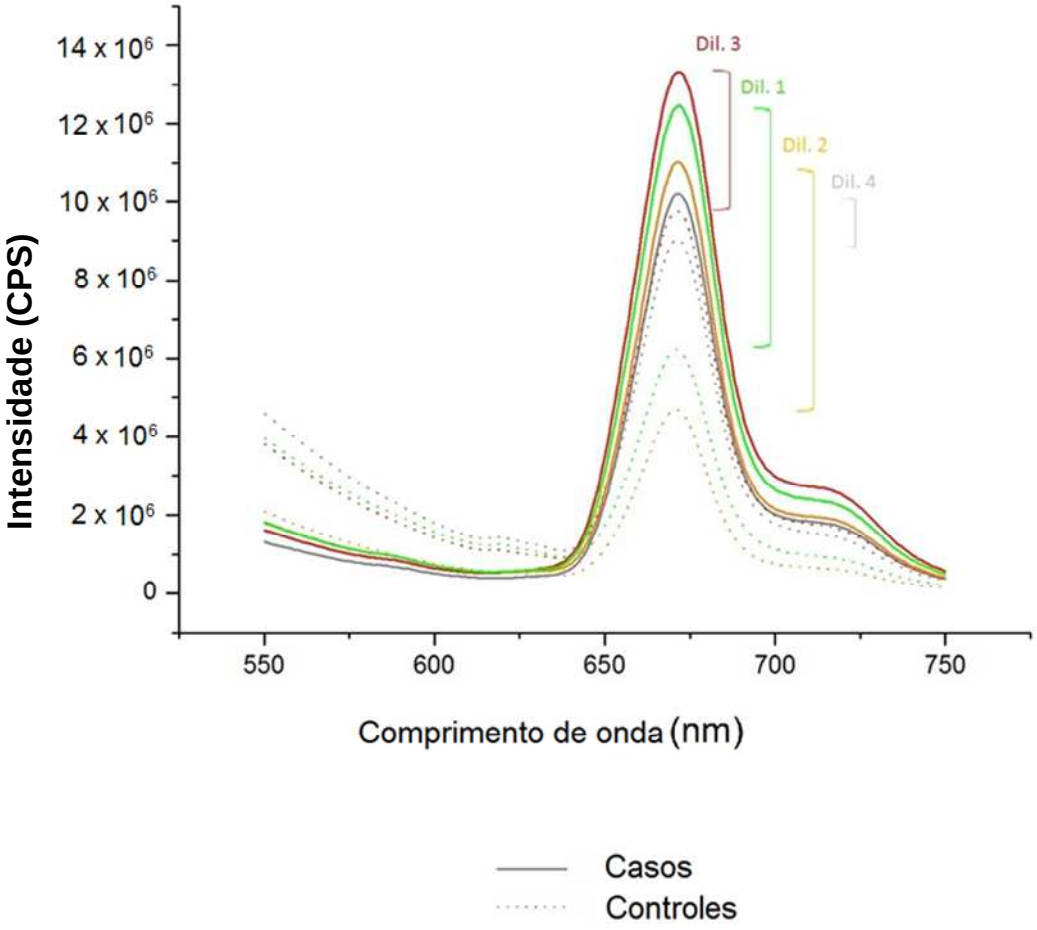
## 4.2 Diluição acetona/fezes para identificação do melhor pico espectrofotométrico para quantificação de porfirinas fecais em seres humanos

Quatro diluições com volumes diferentes de fezes e acetona foram realizadas em dois pacientes de cada grupo, selecionados aleatoriamente, a fim de determinar o melhor pico espectrofotométrico para quantificação de porfirinas fecais em seres humanos (Tabela 6).

A Diluição 1 foi a que melhor permitiu a avaliação do pico espectrofotométrico por ter apresentado o segundo maior pico entre os pacientes com câncer em 671 nm e, ao mesmo tempo, ter revelado a maior diferença entre os pacientes casos e controles (Figura 6).

Sendo assim, 3 mL de acetona grau analítico foram adicionados a 0,3 g de fezes. A mistura foi homogeneizada e submetida a centrifugação na velocidade de 4.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi pipetado e transferido para frascos do tipo Eppendorf em triplicata, sendo, posteriormente, remanejado para a cubeta do espectrofotômetro para análise.

Figura 6 – Diferença entre os picos espectrofotométricos obtidos em cada diluição utilizada para varredura do melhor espectro de emissão




## 4.3 Análise espectroscópica das porfirinas fecais

A concentração de porfirinas fecais foi determinada e se mostrou estatisticamente superior no grupo dos pacientes com câncer (Figuras 7 e 8). A área sob a curva no comprimento de onda de 671 nm, compatível com a emissão das porfirinas, foi representada numericamente e submetida ao teste de Kolmogorov-Smirnov, que evidenciou tratar-se de uma distribuição normal.

Para comparação das médias obtidas entre os pacientes com câncer (casos) e sem câncer (controles) utilizou-se o teste t independente, considerando-se $p<0,05$ (Tabela 9).

Figura 7 – Picos espectrofotométricos obtidos de pacientes do grupo com câncer *versus* grupo controle (média ± DP)

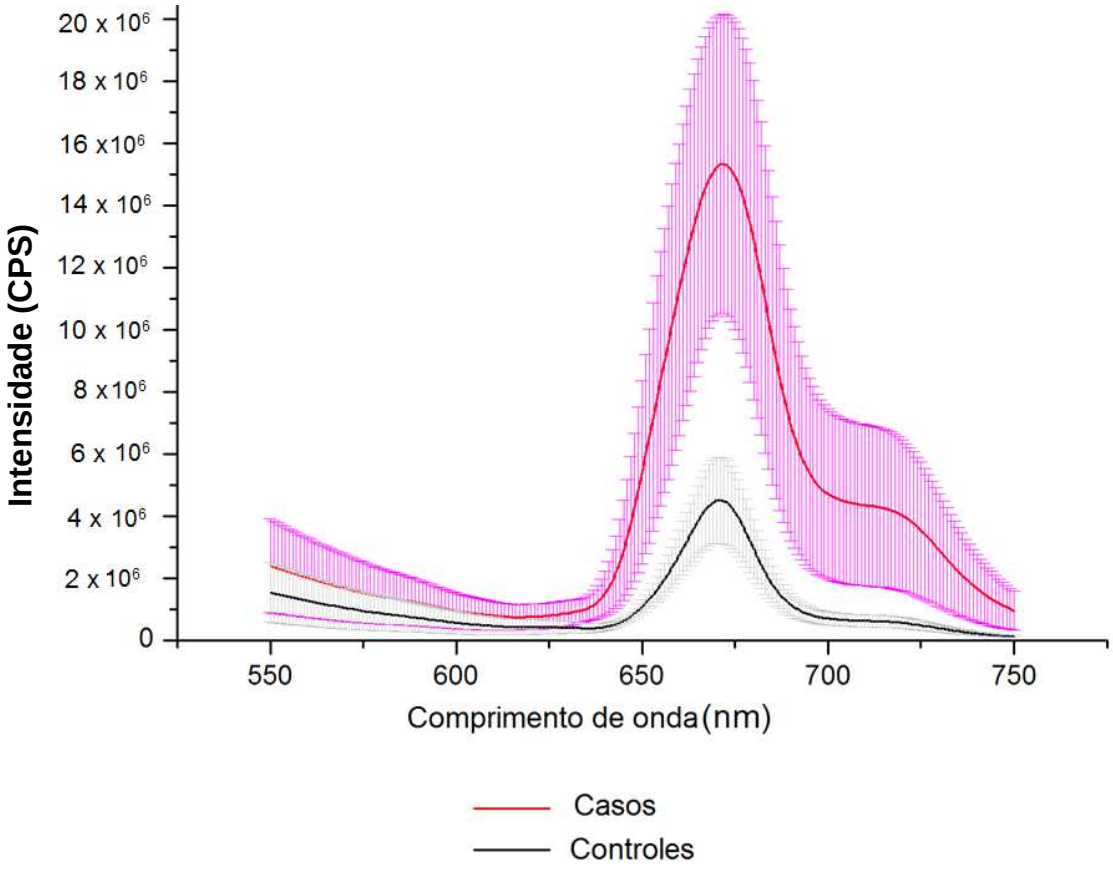



Figura 8 – Média ± DP dos valores dos picos espectrofotométricos em CPS da área sob a curva (671 nm) extraídas das fezes dos casos *versus* controles (Box Plot)

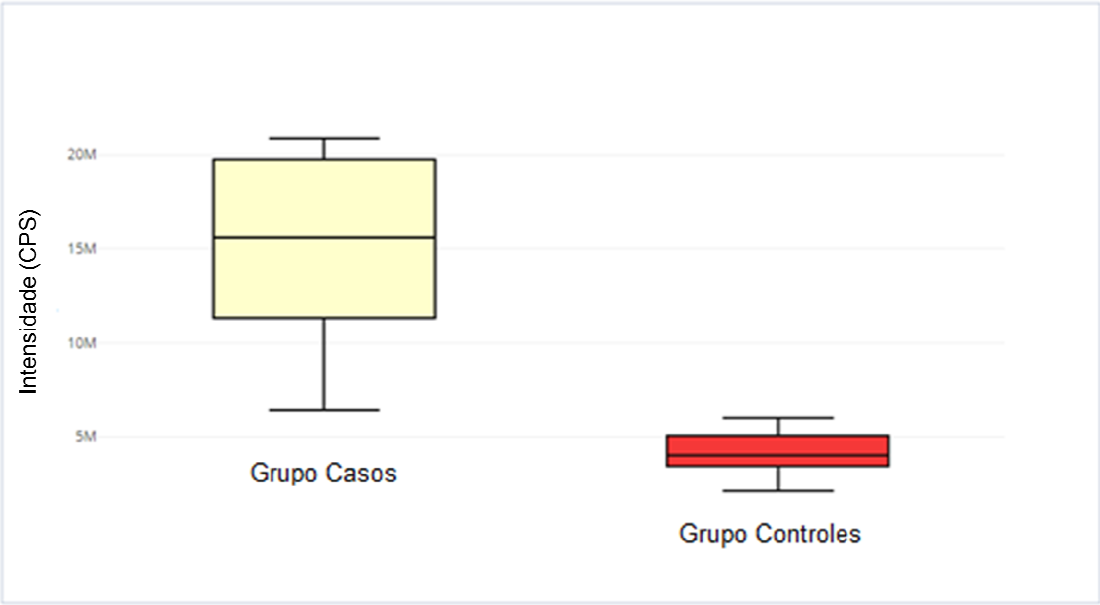


Tabela 10 – Média e DP dos valores dos picos espectrofotométricos em CPS da área sob a curva (671 nm) extraídas das fezes de pacientes com e sem câncer

| | Grupo | Média* (CPS) | DP | *p* valor |
|---|---|---|---|---|
| Porfirinas fecais | Controles | 4,13E+06 | 1,29E+06 | 0,000127 |
| | Casos | 1,50E+07 | 4,94E+06 | |

* Média das áreas sob o pico espectrofotométrico aos 671 nm

## 4.4 Correlação entre os níveis de PSA e as porfirinas fecais

Os resultados de PSA total obtidos dos pacientes com câncer foram comparados com as concentrações de porfirinas fecais, representadas pela área sob a curva em 671 nm (Tabela 10).

Tabela 11 – Níveis de PSA total e concentrações de porfirinas fecais obtidas em pacientes com câncer

| PSA total (ng/mL) | Porfirinas fecais* |
|---|---|
| 7,22 | 6,42E+06 |
| 20,46 | 9,42E+06 |
| 130,16 | 1,19E+07 |
| 10,72 | 1,46E+07 |
| 66,07 | 1,56E+07 |
| 11,15 | 1,62E+07 |
| 6,92 | 1,97E+07 |
| 4,41 | 1,98E+07 |
| 71,05 | 2,09E+07 |

* área sob o pico espectroscópico em 671 nm

A correlação entre os níveis de PSA total e porfirinas fecais foi verificada pelo coeficiente de Pearson (r) e mostrou-se inversamente proporcional e matematicamente desprezível nos pacientes com a doença (Tabela 11).

Tabela 12 – Correlação entre os níveis de porfirinas fecais e os níveis de PSA no grupo com câncer

| PSA total | r* |
|---|---|
| Porfirinas fecais | -0,0221 |

*Coeficiente de Correlação de Pearson

Os resultados de PSA total obtidos dos pacientes sem a doença e as concentrações de porfirinas fecais nesse grupo, representadas pela área sob a curva em 671 nm, podem ser visualizados na Tabela 12.

Tabela 13 – Níveis de PSA total e concentrações de porfirinas fecais obtidas em pacientes do grupo controle

| PSA total (ng/mL) | Porfirinas fecais* |
|---|---|
| 1,93 | 6,00E+06 |
| 0,40 | 5,77E+06 |
| 0,34 | 4,82E+06 |
| 1,11 | 4,29E+06 |
| 2,86 | 4,02E+06 |
| 2,13 | 3,87E+06 |
| 1,50 | 3,72E+06 |
| 0,85 | 2,57E+06 |
| 0,58 | 2,13E+06 |

* área sob o pico espectroscópico em 671 nm

Considerando-se os pacientes de ambos os grupos, a correlação entre os níveis de PSA e as concentrações de porfirinas fecais mostrou-se fracamente positiva (Tabela 13).

Tabela 14 – Correlação entre os níveis de porfirinas fecais e os níveis de PSA total em ambos os grupos

| PSA total | r* |
|---|---|
| Porfirinas Fecais | 0,4286 |

*Coeficiente de Correlação de Pearson

## 4.5 Dados laboratoriais

Os níveis de hemoglobina, ferritina e glicemia mais recentes obtidos dos prontuários dos pacientes de ambos os grupos foram avaliados.

Em relação aos exames de hemoglobina e ferritina, nenhum dos pacientes apresentou níveis inferiores aos considerados normais, representados respectivamente por níveis menores que 13,0 g/dL (hemoglobina) e menores que 23,90 ng/mL (ferritina), considerados valores de referência no sexo masculino.

Em relação aos 3 (três) pacientes diabéticos, sendo 2 (dois) do grupo controle e 1 (um) do grupo dos pacientes com câncer, o resultado da última glicemia em jejum e uma entrevista sobre o tipo de diabetes e o controle glicêmico de acordo com critérios da Associação Americana de Diabetes (ADA) foram avaliados (Tabela 14).

Tabela 15 – Glicemia em jejum, controle glicêmico e tipo de diabetes dos pacientes

| | Glicemia em jejum (mg/dL) | Controle glicêmico | Tipo de diabetes |
|---|---|---|---|
| Caso 1 | 96 | Dentro da meta | 2 |
| Controle 1 | 121 | Dentro da meta | 2 |
| Controle 2 | 130 | Dentro da meta | 2 |

Em relação aos 2 (dois) pacientes dislipidêmicos, sendo 1 (um) de cada grupo, o resultado da última dosagem de lípides em jejum e o controle lipídico de acordo com a Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC) foram avaliados (Tabela 15).

Tabela 16 – Níveis de lípides e controle dos pacientes que relataram possuir dislipidemia

| | Colesterol total (mg/dL) | LDL-c (mg/dL) | HDL-c (mg/dL) | Triglicérides (mg/dL) | Controle dos níveis lipídicos |
|---|---|---|---|---|---|
| Caso 1 | 208 | 136 | 41 | 155 | Discretamente fora da meta |
| Controle 1 | 193 | 120 | 45 | 138 | Dentro da meta |

## 5 DISCUSSÃO

Atualmente, os principais desafios em relação ao câncer de próstata são encontrar alternativas ao PSA para o diagnóstico e pesquisar novos marcadores que possam prever a agressividade da doença. Novos biomarcadores poderiam ajudar no planejamento terapêutico e evitar intervenções desnecessárias como, por exemplo, a realização de biópsia e seus riscos associados. A acurácia do PSA é questionável porque a maioria dos homens com os valores do exame normais não serão submetidos a biópsia, a menos que o exame de toque retal esteja alterado. Esse viés tende asuperestimar a sensibilidade e subestimar a especificidade do teste de PSA. O desempenho do exame também pode ser superestimado porque o PSA detecta frequentemente cânceres sem importância clínica. Além disso, protocolos que usam grande número de biópsias para avaliar pacientes com níveis elevados de PSA podem detectar cânceres incidentais que não eram a etiologia da elevação do PSA. A partir disso, faz-se premente a busca de novos biomarcadores capazes de melhorar a sensibilidade e a especificidade do teste de PSA (63-65).

Nesse contexto, é fundamental que haja incentivo para pesquisa e desenvolvimento de novas técnicas complementares aos recursos até então existentes para o manejo do carcinoma prostático. Os termos Medicina Translacional e Oncologia Translacional derivam desse imperativo e representam, atualmente, um campo de pesquisa em vários países, em que se pretende agilizar a transferência do conhecimento produzido na bancada e nos laboratórios de ciências básicas para aplicação na prática clínica e na saúde pública. Vários marcadores tumorais e tratamentos oncológicos são estudados experimentalmente e necessitam de apoio para que o conhecimento produzido chegue ao paciente. Para esse intento, deve-se estimular a formação de equipes multidisciplinares e criar uma cultura de aproximação da área básica com a área clínica. No presente momento, vários países financiam a organização de centros de Medicina Translacional nas universidades e muitos periódicos científicos divulgam a produção científica na área (66-67).

Há várias razões para investigar biomarcadores de doenças neoplásicas e até mesmo de outras afecções que possam ser encontrados nas fezes como material biológico: menor desconforto quando comparado à punção

para retirada de sangue (dor, hematomas, etc.), menor necessidade de profissionais e materiais especializados para coleta e maior familiaridade por parte dos médicos clínicos e médicos de família com a solicitação deste tipo de exame para outros fins (por exemplo, exame parasitológico e exame de sangue oculto nas fezes). No caso das porfirinas, vários estudos demonstraram aumento de seus níveis em outros tipos de câncer, mas, na maioria das vezes, a porfirina analisada foi a PpIX e o material biológico utilizado foi o sangue (41-43, 45).

Um único estudo experimental evidenciou alteração nas concentrações de porfirinas fecais em cobaias inoculadas com células de câncer prostático (44). Segundo os autores, esse estudo identificou duas bandas de emissão porfirínica nas fezes dos camundongos; uma com intensidade aumentada aos 632 nm, correspondendo à concentração de PpIX nas fezes, e outra com intensidade diminuída aos 671 nm, correspondendo a coproporfirinas e outras porfirinas fecais (44). No presente estudo, apenas uma banda de emissão aos 671 nm foi encontrada em ambos os grupos, casos e controle. Essa banda pode ser atribuída aporfirinas encontradas nas fezes, como as coproporfirinas I e III, a uroporfirina I, associadas ou não aos fotoprodutos formados pela degradação da protoporfirina (PpIX). O pico correspondente à PpIX fecal não foi encontrado em nosso estudo. O mesmo método de extração e processamento utilizado no estudo experimental foi aplicado, mas nenhum dos grupos deste estudo apresentou pico espectrofotométrico aos 632 nm. A principal hipótese para explicar a ocorrência poderia ser a diferença no metabolismo e concentração de diferentes tipos de porfirinas nas fezes humanas, quando comparadas às de cobaias. Outra explicação para esses achados poderia ser o intervalo de tempo decorrido da coleta de fezes a sua análise nos dois estudos. Apesar de estarem devidamente protegidas da luz em frasco âmbar, o encontro de um único pico espectrofotométrico pode ser explicado pela fotodegradação de PpIX em nossas amostras, bem como o aumento da atividade da porfobilinogênio deaminase, enzima encontrada no citoplasma. Essa atividade enzimática pode ter levado ao aumento de coproporfirinas e uroporfirinas fecais, como hipotetizado por alguns autores (45).

Um aumento nas porfirinas fecais já foi demonstrado em outras condições, incluindo alguns tipos de porfirias (porfiria variegada e coproporfiria hereditária) e anemia sideroblástica (68,69). O uso de antibióticos é uma

abordagem comum na prática clínica que hipoteticamente poderia diminuir os níveis de porfirinas fecais por meio de modificações da flora intestinal (70). A presença dessas enfermidades e o uso desses medicamentos foram excluídos nos pacientes do nosso estudo.

Todos os cuidados foram tomados na realização da entrevista e do exame clínico no sentido de excluir outras condições que poderiam levar a resultados falso-positivos. Além do uso de antibióticos, os níveis de colesterol, glicemia, hemoglobina e ferritina de todos os pacientes em ambos os grupos foram verificados. Conforme dados das Tabelas 14 e 15, depreende-se que apenas uma pequena fração dos pacientes estudados apresentou alterações nos níveis glicêmicos e lipídicos. No entanto, essas afecções estavam controladas e estáveis de acordo com as principais referências da literatura (71,72). Optou-se por investigar os níveis de colesterol e o *status* glicêmico nesse estudo a partir do resultado de trabalhos que demonstraram experimentalmente o aumento de PpIX sanguínea em cobaias que desenvolveram aterosclerose a partir de uma dieta hiperlipêmica (57).

Todos os pacientes foram questionados sobre seus hábitos de vida, presença de dietas específicas e outras condições, como anemias, porfirias, outros cânceres, outras doenças prostáticas capazes de alterar o PSA (prostatite, hiperplasia benigna), intoxicações ocupacionais e sobre a presença de quaisquer sintomas. Além desses cuidados, os pacientes pertencentes ao grupo “casos” foram recrutados e tiveram suas fezes coletadas antes do início do tratamento, descartando mais uma possibilidade de interferência nos resultados. Todos esses argumentos conduzem à conjectura que o aumento de porfirinas fecais de fato resultou do metabolismo alterado das porfirinas causado pelo tumor.

Prever o comportamento biológico do câncer de próstata após o diagnóstico é de grande relevância e importância científica para determinar o tratamento. O PSA é o marcador tumoral considerado nos escores preditores de risco mais frequentemente utilizados na prática clínica, o Nomograma de Partin e a Classificação de D'Amico (73,74). No presente estudo, correlação entre os níveis de PSA e de porfirinas fecais nos pacientes com câncer não foi estabelecida, ainda que existam estudos correlacionando aumento no tamanho do tumor com o aumento de PpIX sanguínea em cobaias, o que poderia levar a um aumento nas porfirinas fecais (43). Outros autores observaram aumento de PpIX

nas células cancerígenas, mesmo durante o estágio de latência, caracterizado por ausência de proliferação celular, supressão metabólica e capacidade de recuperação do *status* ativo e proliferativo (75). Esses estudos sugerem que as concentrações fecais de porfirinas poderiam ser úteis como biomarcadores para monitorar o crescimento do tumor e, talvez, para avaliar o comportamento biológico desse tipo de câncer. Mesmo em relação à amostra total, casos e controles, houve apenas uma fraca correlação positiva entre os níveis de porfirinas e os de PSA. A ausência de correlação entre os níveis dessas substâncias poderia ser igualmente explicada por diferenças entre o metabolismo de cobaias e dos seres humanos. Outra hipótese para explicar a diferença entre os achados é que, nos estudos experimentais, titulou-se a PpIX sanguínea, e não as porfirinas fecais. Uma possibilidade de investigação para o apronfundamento dessa questão, e que também permitiria uma melhor compreensão do metabolismo das porfirinas na presença do câncer de próstata, seria o desenvolvimento de novos estudos visando o isolamento e a determinação dos níveis de cada subtipo de porfirina por meio de outra técnica - por exemplo, HPLC -, de maneira semelhante à realizada na investigação das porfirias (76,77).

Prospectivamente, além da individualização dos subtipos de porfirinas nos indivíduos com câncer, conforme discutido anteriormente, vislumbra-se a possibilidade de novos estudos com maior número de pacientes e em outras situações, como a dosagem no pré e no pós-tratamento. Apesar de, a exemplo do PSA, a concentração de porfirinas fecais ser um achado inespecífico para o câncer de próstata, neste estudo preliminar apresentou resultados promissores para o desenvolvimento de novas pesquisas na área, tendo sido o primeiro estudo que demonstrou o aumento dessas substâncias por espectroscopia de fluorescência em seres humanos com câncer de próstata. Um trabalho científico foi redigido a partir dos dados desta pesquisa, sendo submetido e aceito em um periódico internacional com Fator de Impacto relevante em várias áreas do conhecimento (Apêndice E) (78).

## 6 CONCLUSÕES

Em síntese, o presente estudo demonstrou que:

● as melhores diluições para extração porfirínica em fezes humanas de pacientes do sexo masculino na faixa etária estudada foram, primeiramente, de 3 mL de acetona grau analítico em 0,3 g de fezes e, em segundo lugar, 1 mL de acetona grau analítico em 0,05 g de fezes;

● a concentração de porfirinas fecais por espectroscopia de fluorescência foi maior nos pacientes com câncer do que nos pacientes sem câncer prostático, e essa diferença foi estatisticamente significativa, revelando o potencial do método para quantificar porfirinas fecais que podem funcionar como um biomarcador para esse tipo de neoplasia;

● não houve correlação entre os níveis de porfirinas fecais e os de PSA total nos pacientes com câncer e quando considerados os dois grupos em conjunto; por consequência, a quantificação dessa substância parece ser mais útil para auxiliar no diagnóstico do que para determinação do prognóstico da doença;

● novos estudos envolvendo outros métodos são requeridos para individualizar o tipo específico de porfirina responsável pelo pico espectrofotométrico observado nos pacientes com câncer;

● este foi o primeiro estudo na literatura científica a demonstrar o aumento dos níveis de porfirinas fecais por espectroscopia de fluorescência em seres humanos com câncer de próstata.

# 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. GLOBAL BURDEN OF DISEASE CANCER COLLABORATION. Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-years for 29 Cancer Groups, 1990 to 2016. A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. ***JAMA Oncology***, v. 4, n. 11, p. 1553-68, 2018.

2. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Estimativa 2018: Incidência de Câncer no Brasil. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: ***Instituto Nacional do Câncer***, 2017.

3. SIEGEL, R.; MA, J; ZOU, Z; JEMAL, A. Cancer statistics, 2014. ***CA Cancer J Clin***, v. 64, n. 1, p. 9-29, 2014.

4. BELL, K.J.; DEL MAR, C.; WRIGHT, G.; DICKINSON, J.; GLASZIOU, P. Prevalence of incidental prostate cancer: A systematic review of autopsy studies. ***International Journal of Cancer***. v. 137, n. 7, p. 1749-1757, 2015.

5. HEIDENREICH, A.; BASTIAN, P.J.; BELLMUNT, J. BOLLA, M.; JONIAU, S; VAN DER KWAST, T.; MASON, M.; MATVEEV, V.; WIEGEL, T.; ZATTONI, F.; MOTTET, N.; EUROPEAN ASSOCIATION OF UROLOGY. EAU guidelines on prostate cancer. part 1: screening, diagnosis, and local treatment with curative intent-update 2013. ***European Urology***. v. 65, n. 1, p. 124-137, 2014.

6. VANCE, T.M.; SU, J.; FONTHAM, E.T.; KOO, S.I.; CHUN, O.K. Dietary antioxidants and prostate cancer: a review. ***Nutrition and Cancer***. v. 65, n. 6, p. 793-801, 2013.

7. STRATTON, J.; GODWIN, M. The effect of supplemental vitamins and minerals on the development of prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. ***Family Practice***. v. 28, n. 3, p. 243-252, 2011.

8. HAYES, J.H.; BARRY, M.J. Screening for prostate cancer with the prostate-specific antigen test: a review of current evidence. ***JAMA***. v. 311, n. 11, p. 1143-1149, 2014.

9. ATTARD, G.; PARKER, C.; EELES, R.A.; SCHRÖDER, F.; TOMLINS, S.A.; TANNOCK, I.; DRAKE, C.G.; BONO, J.S. Prostate cancer. ***The Lancet***. v. 387, n. 10013, p. 70-82, 2016.

10. LYNCH, H. T.; KOSOKO-LASAKI, O.; LESLIE, S. W.; RENDELL, M.; SHAW, T.; SNYDER, C.; D'AMICO, A.V.; BUXBAUM, S.; ISAACS, W.B.; LOEB, S.L MOUL, J. W.; POWELL, I. Screening for familial and hereditary prostate cancer. ***International Journal of Cancer***. v. 138, n.11, p. 2579-2591, 2016.

11. LYNCH H.T.; LARSEN, A.L.; MAGNUSON, C.W.; KRUSH, A.J. Prostate carcinoma and multiple primary malignancies: study of a family and 109 consecutive prostate cancer patients. ***Cancer***. v. 19, n. 12, p. 1891-1897, 1966.

12. GANN, P.H. Risk factors for prostate cancer. ***Rev Urol***. v. 4, Suppl 5:S3-S10, 2002.

13. ROSE, D.P.; BOYAR, A.P.; WYNDER, E.L. International comparisons of mortality rates for cancer of the breast, ovary, prostate, and colon, and per capita food consumption. ***Cancer***. v. 58, n.11, p. 2363-2371, 1986.

14. MAGNABOSCO, Wesley Justino. Câncer de próstata – diagnóstico e estadiamento in: ***Revista Onco&***. Iaso Editora, Jan/Fev 2014.

15. LEE, F.; LITTRUP, P.J.; TORP-PEDERSEN, S.T.; METTLIN, C.; MCHUGH, T.A.; GRAY, J.M.; KUMASAKA, G.H.; MCLEARY, R.D. Prostate cancer: comparison of transrectal US and digital rectal examination for screening. ***Radiology***. v. 168, n. 2, p. 389-394, 1988.

16. REDDY, B. N, BESSEDE, T.; REDDY, A.; NAIR, S.; TEWARI, A.K.; RASTINEHAD, A.R. Prostate biopsies: Available technique, approaches and diagnostic accuracy. ***Archivos Españoles de Urologia.*** v. 69, n. 6, p. 302-310, 2016.

17. HELPAP, B.; EGEVAD, L. The significance of modified Gleason grading of prostatic carcinoma in biopsy and radical prostatectomy specimens. ***Virchows Arch.*** v. 449, n. 6, p. 622-627, 2006.

18. EPSTEIN, J. I. An update of the Gleason grading system. ***The Journal of Urology***. v. 183, n. 2, p. 433-440, 2010.

19. SAMARATUNGA, H.; DELAHUNT, B.; YAXLEY, J.; SRIGLEY, J. R.; EGEVAD, L. From Gleason to International Society of Urological Pathology (ISUP) grading of prostate cancer. ***Scandinavian Journal of Urology***. v. 50, n. 5, p. 325-329, 2016.

20. DELAHUNT, B.; EGEVAD, L.; SRIGLEY, J.R.; STEIGLER, A.; MURRAY, J.D.; ATKINSON, C.; MATTEHEWS, J.; DUCHESNE, G.; SPRY, N.A.; CHRISTIE, D.; JOSEPH, D.; ATTIA, J.; DENHAM, J.W. Validation of International Society of Urological Pathology (ISUP) grading for prostatic adenocarcinoma in thin core biopsies using TROG 03.04 'RADAR' trial clinical data. ***Pathology***. v. 47, n. 6, p. 520–525, 2015.

21. SAMARATUNGA H.; DELAHUNT, B.; GIANDUZZO. T.; COUGHLIN, G; DUFFY, D.; LEFEVRE, I.; JOHANNSEN, S.; EGEVAD, L.; YAXLEY, J. The prognostic significance of the 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) grading system for prostate cancer. ***Pathology***. v. 47, n. 6, p. 515–519, 2015.

22. BERNEY, D.M.; BELTRAN, L.; FISHER, G.; NORTH, B.V.; GREENBERG, D.; MOLLER, H.; SOOSAY, G.; SCARDINO, P.; CUZICK, J. Validation of a contemporary prostate cancert grading system using cancer death as outcome. ***Br J Cancer***. v. 114, n. 10, p. 1078-1083, 2016.

23. YADAV, S.S.; LAVERY, H.J.; YADAV, K.K, TEWARI, A.K. Next-generation sequencing technology in prostate cancer diagnosis, prognosis, and personalized treatment. ***Urologic Oncology***. v. 33, n. 6, p. 267, 2015.

24. KLOTZ, L.; ZHANG, L.; LAM, A.; NAM, R.; MAMEDOV, A.; LOBLAW, A. Clinical results of long-term follow-up of a large, active surveillance cohort with localized prostate cancer. ***J Clin Oncol***. v. 28, n. 1, p. 126–31, 2010.

25. SELVADURAI, E.D.; SINGHERA, M.; THOMAS, K.; MOHAMMED, K.;WOODE-AMISSAH, R.; HORWICH, A.; HUDDART, R.A.; DEARNALEY, D.P.; PARKER, C.C.. Medium-term outcomes of active surveillance for localised prostate cancer. ***Eur Urol***. v. 64, n. 6, p. 981-987, 2013.

26. LÓPEZ, B. M.; REINA-ALCAINA, L.; GUERRA, A.R.; SÁNCHEZ, A.R.; MOREJÓN, E. I.; PIETRICICA, B.N. Cáncer de próstata de bajo riesgo e intermedio: opciones de tratamiento. ***Archivos Españoles de Urología***. v. 69, n. 6, p. 260-270, 2016.

27. BILL-AXELSON A,; HOLMBERG, L.; GARMO, H.; RIDER, J.R.; TAARI, K.; BUSCH, C.; NORDING, S.; HAGGMAN, M.; ANDERSSON, S.O.; SPANGBERG, A.; ANDRÉN, O.; PALMGREN, J.; STEINECK, G.; ADAMI, H.O.; JOHANSSON, J.E. Radical prostatectomy or watchful waiting in early prostate cancer. ***N Engl J Med***. v. 370, n. 10, p. 932-942, 2014.

28. DROZ, J.P.; BALDUCCI, L.; BOLLA, M.; EMBERTON, M.; FITZPATRICK, J.M.; JONIAU, S.; KATTAN, M.W.; MONFARDINI, S.; MOUL, J.W.; NAEIM, A.; VAN POPPEL, H.; SAAD, F.; STERNBERG, C.N. Management of prostate cancer in older men: recommendations of a working group of the International Society of Geriatric Oncology. ***BJU international***. v. 106, n. 4, p. 462-469, 2010.

29. SANDHU, J.S. Treatment options for post-prostatectomy incontinence. ***Urology Practice***. v. 1, n. 4, p. 194-197, 2014.

30. NOONAN, E. M.; FARRELL, T.W. Primary Care of the Prostate Cancer Survivor. ***American Family Physician***. v. 93, n.9, p. 764-770, 2016.

31. RESNICK, M.J.; KOYAMA, T.; FAN, K.H.; ALBERTSEN, P.C.; GOODMAN, M.; HAMILTON, A.S.; HOFFMAN, R.M.; POTOSKY, A.L.; STANFORD, J.L.; STROUP, A.M.; VAN HORN, R.L.; PENSON, D.F. Long-term functional outcomes after treatment for localized prostate cancer. ***N Engl J Med***. v. 368, n. 5, p. 436-445, 2013.

32. HODSON, R. Prostate cancer: 4 big questions. ***Nature***. v. 528, S137, 2015.

33. OBORT, A.S.; AJADI, M.B.; AKINLOYE, O. Prostate-Specific Antigen: Any Successor in Sight? ***Reviews in Urology***. v. 15, n. 3, p. 97-107, 2013.

34. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. ***Câncer de próstata - versão para Profissionais de Saúde***. Rio de Janeiro, 21 nov. 2018. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/prostata/deteccao_precoce>. Acesso em 30 nov. 2018.

35. SOCIEDADE BRASILEIRA DE UROLOGIA (SBU). ***Diretrizes de Câncer de Próstata***. Rio de Janeiro, mar. 2011. Disponível em: <https://sbu.org.br/pdf/guidelines_EAU/cancer-de-prostata.pdf>. Acesso em 30 nov. 2018.

36. MOTTET, N.; BELLMUNT, J.; BOLLA, M.; BRIERS, E.; CUMBERBATCH, M.G.; DE SANTIS, M.; FOSSATI, N.; GROSS, T.; HENRY, A.M.; JONIAU, S.; LAM, T.B.; MASON, M.D.; MATVEEV, V.B.; MOLDOVAN, P.C.; VAN DEN BERGH, R.C.N.; VAN DEN BROECK, T.; VAN DER POEL, H.G.; VAN DER KWAST, T.H.; ROUVIÈRE, O.; SCHOOTS, I.G.; WIEGEL, T.; CORNFORD, P. EAU-ESTRO-SIOG Guidelines on Prostate Cancer. Part 1: Screening, Diagnosis, and Local Treatment with Curative Intent. ***Eur Urol***. v. 71, n. 4, p. 618-629, 2017.

37. CAVERLY, T.J.; HAYWARD, R.A.; REAMER, E.; ZIKMUND-FISHER, B.J.; CONNOCHIE, D.; HEISLER, M.; FAGERLIN, A. Presentation of Benefits and Harms in US Cancer Screening and Prevention Guidelines: Systematic Review. ***J Natl Cancer Inst***. v. 108, n. 6, djv. 436, 2016.

38. TAWFIK, A. Prostate-Specific Antigen (PSA) -Based Population Screening for Prostate Cancer: An Economic Analysis. ***Ontario health technology assessment series***. v. 15, n. 11, p. 1-37, 2015.

39. BATLLE, A.M. Porphyrins, Porphyrias, Cancer And Photodynamic Therapy - A Model For Carcinogenesis. ***J Photochem Photobiol B***. vol. 20, n. 1, p.5-22, 1993.

40. BISSELL, D.M.; ANDERSON, K.E.; BONKOVSKY, H.L. Porphyria. ***N Engl J Med.*** v. 377, n. 9, p. 862-872, 2017.

41. KALAIVANI, R.; MASILAMANI, V.; SIVAJI, K.; ELANGOVAN, M.; SELVARAJ, V.; BALAMURUGAN, S.G.; AL-SALHI, M.S.Fluorescence spectra of blood components for breast cancer diagnosis. ***Photomed Laser Surg***. v. 26, n. 3, p. 251-256, 2008.

42. JIA, Z.; WAN, X. Concentration of protoporphyrin IX in cancer tissues and blood in patients with colorectal cancer at early stage. ***Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban***. v. 34, n. 9, p. 846-849, 2009.

43. SILVA, F.R.O.; BELLINI, M.H.; TRISTÃO, V.R.; SCHOR, N.; VIEIRA, N.D. JR.; COURROL, L.C. Intrinsic fluorescence of Protoporphyrin IX from blood samples can yield. ***J Fluoresc***. v. 20, n. 6, p. 1159-1165, 2010.

44. SILVA, F.R.; NABESHIMA, C.T.; BELLINI, M.H.; SCHOR, N.; VIEIRA, N.D. JR.; COURROL, L.C. Study of protoporphyrin IX elimination by body excreta: a new noninvasive cancer diagnostic method? ***J Fluoresc***. v. 23, n. 1, p. 131-135, 2013.

45. MOESTA, K.T.; EBERT, B.; HANDKE, T.; NOLTE, D.; NOWAK, C.; HAENSCH, W.E.; PANDEY, R.K.; DOUGHERTY, T.J.; RINNEBERG, H.; SCHLAG, P.M. Protoporphyrin IX occurs naturally in colorectal cancers and their metastases. ***Cancer Res***. v. 61, n. 3, p. 991-999, 2001.

46. EL-SHARABASY, M.M.; EL-WASEEF, A.M.; HAFEZ, M.M.; SALIM, S.A. Porphyrin metabolism in some malignant diseases. ***British Journal of Cancer***. v. 65, n. 3, p. 409-412, 1992.

47. MASILAMANI, V.; AL-ZHRANI, K.; AL-SALHI, M.; AL-DIAB, A.; AL-AGEILY, M. Cancer diagnosis by autofluorescence of blood components. ***J Lumin***. v. 109, n. 3-4, p. 143-154, 2004.

48. XU, X.R.; MENG, J.W.; HOU, S.G.; MA, H.P.; WANG, D.S. The characteristic fluorescence of the serum of cancer patients. ***J Lumin***. v. 40, n. 1, p. 219-220, 1988.

49. BADMINTON, M. ***The Porphyrias***. National Metabolic Biochemistry Network (NetBioMet). Disponível em: <http://www.metbio.net/docs/metbio-trainingdoc-easa122038-09-05-2011.pdf>. Acesso em 30 dez 2018.

50. CARDIFF & VALE UNIVERSITY HEALTH BOARD. ***Routine porphyrin tests***. Disponível em: <http://www.cardiffandvaleuhb.wales.nhs.uk/opendoc/196058>. Acesso em 30 dez 2018.

51. CARVALHO, M.P.; MARTINELLI, T.; PERES, W.; GARCIAS, G. L. Fisiopatologia da porfiria aguda intermitente.***RBM Rev Bras Med***, v. 71, n. 10, 2014.

52. LAKOWICZ, J. Introduction to fluorescence. ***Principles of fluorescence spectroscopy***. 3. ed. New York: Springer, p. 1-26, 2006.

53. ROCHA, L. G.; NETO, A. O.; AYALA-BURBANO, P.A. Fluorescência: As luzes da escuridão. ***Temas Atuais em Biologia.*** Disponível em: <http://www.temasbio.ufscar.br/?q=artigos/fluoresc%C3%AAncia-luzes-da-escurid%C3%A3o>. Acesso em ago 2018.

54. BOTTIROLI, G.; CROCE, A. Autofluorescence spectroscopy of cells and tissues as a tool for biomedical diagnosis. ***Laser and Current Optical Techniques in Biology***. United Kingdom: ESf Editor, p. 189-210, 2004.

55. LAKOWICZ, J. Instrumentation for fluorescence spectroscopy. ***Principles of fluorescence spectroscopy***. 3. ed. New York: Springer, p. 27-61, 2006.

56. GOMES, C.Z. ***Utilização da espectroscopia de fluorescência para mensuramento de moléculas autofluorescentes em indivíduos diabéticos.*** 2011. 55 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), São Paulo. Disponível em: <http://www.teses.usp.br>. Acesso em: mar. 2017.

57. NASCIMENTO DA SILVA, M.; SICCHIERI, L.B.; SILVA, F.R.O.; ANDRADE, M.F.; COURROL, L.C. Liquid biopsy of atherosclerosis using protoporphyrin IX as a biomarker. ***Analyst***. v. 139, n. 6, p. 1383-1388, 2014.

58. FUKUHARA, H.; INOUE, K.; SATAKE, H.; TAMURA, K.; KARASHIMA, T.; YAMASAKI, I.; TATSUO, I.; KURABAYASHI, A.; FURIHATA, M.; SHUIN. T. Photodynamic diagnosis of positive margin during radical prostatectomy: preliminary experience with 5-aminolevulinic acid. ***Int J Urol***. v. 18, n. 8, p. 585-591, 2011.

59. ISSA, M.C.A.; AZULAY, M. Photodynamic therapy: A review of the literature and image documentation. ***An Bras Dermatol***. v. 85, p. 501-511, 2010.

60. SUZUMURA, E.A.; LARANJEIRA, L.N.; BERWANGER, O.; GUIMARÃES, H. P.; AVEZUM, A.Como delinear e conduzir estudos de caso-controle de hipertensão arterialsistêmica. ***Rev Bras Hipertens***. v. 13, n. 2, p. 150-153, 2006.

61. COURROL, L.C.; SILVA, F.R.O.; COUTINHO, E.L.; PICCOLI, M.F.; MANSANO, R.D.; VIEIRA-JUNIOR, N.D.; SCHOR, N.; BELLINI, M.H. Study of blood porphyrin spectral profile for diagnosis of tumor progression. ***J Fluoresc***. v. 17, n. 3, p. 289-292, 2007.

62. HYUN, D.S.; KIM, H.T.; JHEON, S.H.; PARK, S.I.; KIM, J.K. A preliminary study of protoporphyrin-IX as a potential candidate for identification of lung cancer cells using fluorescence microscopy. ***Photodiagnosis Photodyn Ther***. v. 6, n.3-4, p. 221-226, 2009.

63. PUNGLIA, R.S.; D'AMICO, A.V.; CATALONA, W.J.; ROEHL, K.A.; KUNTZ, K.M. Effect of verification bias on screening for prostate cancer by measurement of prostate-specific antigen. ***N Engl J Med***. v. 349, n. 4, p. 335-342, 2003.

64. MCNAUGHTON COLLINS, M.; RANSOHOFF, D.F.; BARRY, M.J. Early detection of prostate cancer. Serendipity strikes again. ***JAMA***. v. 278, n. 18, p. 1516-1519, 1997.

65. RISK, M.C.; LIN, D.W. New and novel markers for prostate cancer detection. ***Curr Urol Rep***. v. 10, n. 3, p. 179-186, 2009.

66. LUZ, P. L. Medicina Translacional - Nova Fronteira. ***Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo***. v. 28, n. 1, p. 14-19, 2018.

67. CRUZ-LÓPEZ, M. Translational medicine. ***Gac Med Mex***. v. 153, n. 5, p. 547-549, 2017.

68. HINDMARSH, J.T.; OLIVERAS, L.; GREENWAY, D.C. Biochemical differentiation of the porphyrias. ***Clin Biochem***. v. 32, n. 8, p. 609-619, 1999.

69. CAMASCHELLA, C. Hereditary sideroblastic anemias: pathophysiology, diagnosis and treatment. ***Semin Hematol***. v. 46, n. 4, p. 371–377, 1999.

70. BEUKEVELD, G.J.; WOLTHERS, B.G.; VAN SAENE, J.J.; DE HAAN, T.H.; DE RUYTER-BUITENHUIS, L.W.; VAN SAENE, R.H. Patterns of porphyrin excretion in feces as determined by liquid chromatography; reference values and the effect of flora suppression. ***Clin Chem***. v. 33, n. 12, p. 2164–2170, 1987.

71. SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA (SBC). ***Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose - 2017***. Arquivos Brasileiros de Cardiologia. v. 109, n. 2, supl. 1, 2017.

72. SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES (SBD). Org. OLIVEIRA, J.E.P.; MONTENEGRO-JÚNIOR, R.M.; VENCIO, S. ***Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2017-2018.*** São Paulo: Ed. Clannad, 2017.

73. TOSOIAN, J.J.; CHAPPIDI, M.; FENG, Z.; HUMPHREYS, E.B.; HAN, M.; PAVLOVICH, C.P.; EPSTEIN, J.I.; PARTIN, A.W.; TROCK, B.J. Prediction of pathological stage based on clinical stage, serum prostate-specific antigen, and biopsy Gleason score: Partin tables in the contemporary era. ***BJU Int***. v. 119, n. 5, p. 676–83, 2017.

74. HERNANDEZ, D.J.; NIELSEN, M.E.; HAN, M.; PARTIN, A.W. Contemporary evaluation of the D'Amico risk classification of prostate cancer. ***Urology.*** v. 70, n. 5, p. 931-935, 2007.

75. NAKAYAMA, T.; OTSUKA, S.; KOBAYASHI, T.; OKAJIMA, H.; MATSUMOTO, K.; HAGIYA, Y.; INOUE, K.; SHUIN, T.; NAKAJIMA, M.; TANAKA, T.; OGURA, S. I. Dormant cancer cells accumulate high protoporphyrin IX levels and are sensitive to 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy. ***Nature Sci Rep.*** 6:36478, 2016.

76. LIM, C.K.; PETERS, T. Urine and faecal porphyrin profiles by reversed phase high performance liquid chromatography in the porphyrias. ***Clinica Chimica Acta***. v. 139, p. 55-63, 1984.

77. LIM, C.K.; LI, F.; PETERS, T.J. High-performance liquid chromatography of porphyrins. ***Journal of Chromatography***. v. 429, p. 123-153, 1988.

78. GOTARDELO, D.R.; COURROL, L.C.; BELLINI, M.H.; DE OLIVEIRA SILVA, F.R., SOARES, C.R.J. Porphyrins are increased in the faeces of patients with prostate cancer: a case-control study. ***BMC Cancer***. v. 18, n. 1, 1090, 2018.

# 8 APÊNDICES

APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Título da pesquisa: DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE PORFIRINAS FECAIS EM INDIVÍDUOS COM CÂNCER DE PRÓSTATA.
Pesquisador Responsável: Prof. Daniel Riani Gotardelo
E-mail: danielriani@uol.com.br
Telefone(s) de contato: (31) 3825-4737 e (31) 98417-7824

Você, _____, está sendo convidado a participar de uma pesquisa realizada pelo Prof. Daniel Riani Gotardelo, médico e professor adjunto do curso de Medicina do Instituto Metropolitano de Ensino Superior/Univaço. A pesquisa faz parte do doutorado do referido profissional no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN).

O propósito da pesquisa é saber os níveis de algumas substâncias no sangue e nas fezes de indivíduos com e sem câncer de próstata. Além disso, o trabalho tem a finalidade de analisar algumas informações (ex.: idade, anos de estudo, hábito de fumar, resultados de exames de sangue, etc.) em conjunto com os níveis encontrados dessas substâncias.

1. Sua participação envolverá o fornecimento de uma pequena quantidade de sangue e fezes para a dosagem das substâncias, de preferência no momento em que já tiver de colher esses materiais para realizar exames solicitados por seu médico. O volume de sangue e fezes a serem coletados a mais não são capazes de causar prejuízo à sua saúde. Além disso, você precisará responder verbalmente a perguntas que serão feitas no momento em que for colher os exames e autorizar o acesso a resultados de exames que estão no seu prontuário. Estima-se um tempo de participação de, no máximo, 30 minutos.
2. Se concordar em participar da pesquisa, os riscos previstos são: (1) dor ou sensação desagradável para retirar e/ou fornecer o sangue e as fezes para a pesquisa, (2) formação de hematoma (mancha roxa) no local aonde foi retirado o sangue e, (3) vergonha ou se sentir pouco à vontade para responder as perguntas a serem feitas pelo pesquisador.
3. Sua participação na pesquisa não acarretará nenhum preconceito, discriminação ou desigualdade social.
4. Sua participação na pesquisa não envolve um benefício direto, ou seja, você não receberá dinheiro ou qualquer outro incentivo financeiro. Entretanto, ao participar da mesma, você poderá contribuir para a descoberta de um exame que pode ajudar a entender melhor o câncer de próstata.
5. Os resultados dos seus exames de sangue e as informações que você forneceu aos pesquisadores poderão ser divulgadas em trabalhos ou congressos científicos, mas seu nome ou identificação não serão revelados. Se você quiser,

poderá receber um exemplar do trabalho resultante da pesquisa, bastando solicitá-lo ao pesquisador responsável.
6. Não haverá remuneração ou ajuda de custo (ressarcimento) por sua participação.
7. Quaisquer dúvidas que você tiver em relação à pesquisa ou à sua participação, antes ou depois do consentimento, serão respondidas pelo pesquisador responsável.
8. Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética de pesquisa em Seres Humanos do UnilesteMG que funciona no Bloco U, sala 309, Campus I do Centro Universitário do Leste de Minas Gerais, localizado na Avenida Presidente Tancredo Neves, 3500 - Bairro Universitário – Coronel Fabriciano – MG – CEP 35170-056 – Telefone: (31) 3846-5687. Assim, este termo está de acordo com a Resolução 466 do Conselho Nacional de Saúde para proteger os direitos dos seres humanos em pesquisas. Qualquer dúvida quanto aos seus direitos como participante da pesquisa, ou se sentir que foi colocado em riscos não previstos, você poderá entrar em contato com o pesquisador ou com o Comitê de Ética em Pesquisa.

Li as informações acima, recebi explicações sobre a natureza, riscos e benefícios do projeto. Comprometo-me a colaborar voluntariamente e compreendo que posso retirar meu consentimento e interrompê-lo a qualquer momento, sem penalidade ou perda de benefício.

Ao assinar este termo, não estou desistindo de quaisquer direitos meus. Uma cópia deste termo me foi dada.
Local e data: _____, ____ de _____ de 2016.
Assinatura do voluntário:
Assinatura do pesquisador:

APÊNDICE B –Formulário de pesquisa preenchido durante as entrevistas com os pacientes sem câncer

**PARTE I: Identificação**
Nome completo (por extenso):
Data de Nascimento:
Telefones para contato:
Endereço completo:

**PARTE II: Dados epidemiológicos**
1. Qual a profissão do Sr.? _____

2. Qual a idade do Sr.? _____ anos
( ) menos de 40 anos
( ) 40 – 50 anos
( ) 50 – 60 anos
( ) 60 – 70 anos
( ) 70 – 80 anos
( ) mais de 80 anos

3. Qual o estado civil do Sr.?
( ) Casado
( ) Solteiro
( ) Amasiado
( ) Divorciado
( ) Viúvo

4. Qual o grau de escolaridade do Sr.?
( ) nenhum
( ) 1 – 4 anos
( ) 4 – 11 anos
( ) > 11 anos

5. O Sr. fuma? ( ) Sim: _____ Em caso positivo, quantificar em anos/maço.
( ) Não

6. Com qual frequência você ingeriu bebidas alcoólicas nos últimos quatro meses?
( ) nunca **(vá para a questão 8)**
( ) 1 vez por mês ou menos
( ) de 2 a 4 vezes por mês
( ) 1 vez por semana
( ) de 2 a 3 vezes por semana
( ) 4 ou mais vezes por semana

7. Em média, quantas “doses” de álcool você ingeriu nos últimos quatro meses?
( ) Menos que 1 “dose” por semana
( ) 1 a 7 “doses” por semana
( ) 8 a 14 “doses” por semana

( ) Mais de 14 “doses” por semana

Obs.:
1 “dose” = 13,7 g de etanol
= 350 ml (1 lata) de cerveja
= 30 a 50 ml (1 “copinho de dose”) de destilados: cachaça, uísque, vodca, etc.
= 120 a 150 ml (1/2 taça) de vinho
Teor alcoólico: Cerveja = 4% Vinhos = 10,5% Destilados = 40%

8. O Sr. já teve algum parente de 1º grau (pai, irmão, filho) com câncer de próstata?
( ) Sim
( ) Não

**PARTE III (para pacientes sem câncer de próstata, submetidos a rastreamento com PSA + toque retal pelo menos em uma ocasião nos últimos 12 meses)**

1. O Sr. já teve alguma dessas doenças?

| | | |
|---|---|---|
| Porfiria | ( ) Sim | ( ) Não |
| Câncer | ( ) Sim | ( ) Não |
| Anemia | ( ) Sim | ( ) Não |
| Dislipidemia | ( ) Sim | ( ) Não |
| Intoxicação por chumbo/metais | ( ) Sim | ( ) Não |

2. Há quanto tempo o Sr. realizou rastreamento para câncer de próstata (toque retal + PSA)? _____ meses.

3. Último PSA livre/total = _____
Hb/Htc = _____/_____
Ferritina= _____

4. Histórico de doença prostática nos últimos 12 meses:
( ) HPB
( ) prostatite
( ) outras _____

4. É diabético?
Se positivo, está em bom controle?
Última glicemia em jejum:
Possui dislipidemia?
Se positivo, está em bom controle?
Último perfil lipídico:

6. Foi realizada biópsia prostática transretal? ( ) Sim ( ) Não

7. Está fazendo uso de algum antibiótico atualmente? ( ) Sim ( ) Não

8. Está se submetendo a alguma dieta específica atualmente? ( ) Sim ( ) Não

APÊNDICE C – Formulário de pesquisa preenchido durante as entrevistas com os pacientes com câncer

**PARTE I: Identificação**
Nome completo (por extenso):
Data de Nascimento:
Telefones para contato:
Endereço completo:

**PARTE II: Dados epidemiológicos**

1. Qual a profissão do Sr.? _____

2. Qual a idade do Sr.? _____ anos
( ) menos de 40 anos
( ) 40 – 50 anos
( ) 50 – 60 anos
( ) 60 – 70 anos
( ) 70 – 80 anos
( ) mais de 80 anos

3. Qual o estado civil do Sr.?
( ) Casado
( ) Solteiro
( ) Amasiado
( ) Divorciado
( ) Viúvo

4. Qual o grau de escolaridade do Sr.?
( ) nenhum
( ) 1 – 4 anos
( ) 4 – 11 anos
( ) > 11 anos

5. O Sr. fuma? ( ) Sim: _____ Em caso positivo, quantificar em anos/maço.
( ) Não

6. Com qual frequência você ingeriu bebidas alcoólicas nos últimos quatro meses?
( ) nunca **(vá para a questão 8)**
( ) 1 vez por mês ou menos
( ) de 2 a 4 vezes por mês
( ) 1 vez por semana
( ) de 2 a 3 vezes por semana
( ) 4 ou mais vezes por semana

7. Em média, quantas “doses” de álcool você ingeriu nos últimos quatro meses?
( ) Menos que 1 “dose” por semana

( ) 1 a 7 “doses” por semana
( ) 8 a 14 “doses” por semana
( ) Mais de 14 “doses” por semana

Obs.:
1 “dose” = 13,7 g de etanol
= 350 ml (1 lata) de cerveja
= 30 a 50 ml (1 “copinho de dose”) de destilados: cachaça, uísque, vodca, etc.
= 120 a 150 ml (1/2 taça) de vinho
Teor alcoólico: Cerveja = 4% Vinhos = 10,5% Destilados = 40%

8. O Sr. já teve algum parente de 1º grau (pai, irmão, filho) com câncer de próstata?
( ) Sim
( ) Não

**PARTE III (para pacientes com câncer de próstata comprovado por biópsia prostática)**

1. O Sr. já teve alguma dessas doenças?

| | | |
|---|---|---|
| Porfiria | ( ) Sim | ( ) Não |
| Câncer | ( ) Sim | ( ) Não |
| Anemia | ( ) Sim | ( ) Não |
| Dislipidemia | ( ) Sim | ( ) Não |
| Intoxicação por chumbo/metais | ( ) Sim | ( ) Não |

2. Há quanto tempo realizou a biópsia/tem o diagnóstico de câncer de próstata? _____ meses.

3. PSA livre/total ao diagnóstico = _____ Data:
PSA livre/total atual = _____ Data:
Hb/Htc = _____
Ferritina= _____

4. É diabético?
Se positivo, está em bom controle?
Última glicemia em jejum:
Possui dislipidemia?
Se positivo, está em bom controle?
Último perfil lipídico:

5. Está fazendo uso de algum antibiótico atualmente? ( ) Sim ( ) Não

6. Está se submetendo a alguma dieta específica atualmente? ( ) Sim ( ) Não

APÊNDICE D – Orientações quanto à coleta e ao armazenamento das fezes transmitidas por escrito aos pacientes

Caro amigo,

Conforme conversamos, gostaríamos de convidá-lo a participar de uma pesquisa apoiada por nosso Hospital.

Para isso, precisamos que o Sr. recolha:

NO FRASCO DE COR ÂMBAR: amostra de fezes que poderá ser colhida com a espátula fornecida e, posteriormente, armazenada no congelador, envolta em saco plástico.

O dia que agendamos para o Sr. coletar sangue é:

Por favor, traga nesse dia as fezes que o Sr. coletou em casa.

As suas despesas com o transporte serão pagas pelos pesquisadores.

Muito obrigado,
Dr. Pedro Paulo (COR)
Dr. Daniel Riani (Univaço/IPEN)

APÊNDICE E – Trabalho científico publicado no *BMC Cancer*, periódico científico com expressivo Fator de Impacto em várias áreas do conhecimento.

Gotardelo et al. BMC Cancer (2018) 18:1090
https://doi.org/10.1186/s12885-018-5030-1

BMC Cancer

RESEARCH ARTICLE Open Access

# Porphyrins are increased in the faeces of patients with prostate cancer: a case-control study

Daniel Riani Gotardelo[1,2*], Lilia Coronato Courrol[3], Maria Helena Bellini[1], Flávia Rodrigues de Oliveira Silva[1] and Carlos Roberto Jorge Soares[1]

## Abstract

**Background:** Experimental models of prostate cancer have demonstrated increased levels of protoporphyrin IX (PpIX) in the blood and faeces of mice. Hence, the quantification of these autofluorescent molecules could be hypothesized to be a potential marker for this type of tumour. In this case-control study, the autofluorescence of porphyrins in human faeces from patients with prostate cancer and control subjects was analysed using fluorescence spectroscopy.

**Methods:** First, 3 mL of analytical-grade acetone was added to 0.3 g of faeces, and the mixture was macerated and centrifuged at 4000 rpm for 15 min. The supernatant was analysed spectroscopically. The emission spectra from 550 to 750 nm were obtained by exciting the samples at 405 nm.

**Results:** A significant difference between the samples from control and cancer subjects was established in the spectral region of 670–675 nm ($p = 0.000127$), which corresponds to a significant increase in faecal porphyrins in patients with cancer. There was no statistically significant correlation between PSA levels and faecal porphyrins.

**Conclusion:** In this preliminary study conducted in humans, the results show a simple and non-invasive method to assess faecal porphyrins, which have the potential to function as a tumour biomarker in patients with prostate cancer. This approach has improved sensitivity and specificity over PSA testing. Additional prospective studies with larger sample sizes are required to validate these findings.

**Keywords:** Porphyrin, Biomarker, Faeces, Prostate Cancer, Fluorescence spectroscopy

## Background

Other than skin cancer, prostate cancer is the most common type of cancer among men. In 2013, there were 1.4 million cases of prostate cancer and 293,000 deaths. The probability of developing prostate cancer is 1 in 15 between birth and the age of 79 years [1]. Commonly used methods to screen for this disease are the prostate-specific antigen (PSA) measurement and the digital rectal examination.

PSA is used as a marker for screening, early diagnosis, treatment response assessment, and tumour progression determination. PSA is also prostate-specific but not disease-specific. PSA dosage has several limitations, such as (1) low specificity for the detection of early-stage tumours; (2) the possibility of altered results related to medications, inflammation (benign prostatic hyperplasia and prostatitis), age, trauma and urologic manipulation; and (3) controversy related to the marker level that indicates the need for a biopsy or reveals the presence of metastasis. The discovery of new biomarkers that may or may not be associated with PSA using molecular biology techniques could potentially revolutionize the diagnosis and management of prostate cancer [2].

Clinical and experimental studies have been conducted to quantify substances that could be capable of identifying the presence of several types of tumours, including prostate tumours. Some of these substances, called endogenous

* Correspondence: danielriani@uol.com.br
[1]Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, Av. Prof. Lineu Prestes, 2242- Cidade Universitária, São Paulo 05508-000, Brazil
[2]Instituto Tocantinense Presidente Antônio Carlos - ITPAC Palmas, Tocantins, Brazil
Full list of author information is available at the end of the article

© The Author(s). 2018 Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

fluorophores, are autofluorescent and are identifiable through fluorescence spectroscopy studies. Several fluorophores have been quantified in cells and tissues, but there are a limited number of papers addressing the possibility of measuring these components in human biological fluids for cancer diagnosis. The known fluorophores include collagen, elastin, tryptophan, tyrosine, phenylalanine, pyridoxine, and porphyrin derivatives [3].

Porphyrins are cyclic tetrapyrrolic compounds that act as intermediates in haem biosynthesis (Fig. 1). The most important compounds in nature are coproporphyrin, uroporphyrin, and protoporphyrin IX (PpIX), which are produced during haem synthesis. Abnormal metabolism of the erythrocyte PpIX has been observed in individuals with cancer who show elevated levels of this substance. It may be quantified by fluorescence in the tissues and biological fluids of human and guinea pigs that have been inoculated with neoplastic cells. The determination of the levels of this substance has been used to assess breast and bowel cancer in humans and prostate cancer in animal models [3, 4–9].

There are several main hypotheses that seem to explain the alteration in porphyrin metabolism in cancer. One is the hypervascularization typical of malignant neoplasia, which could potentially result in the accumulation of porphyrins due to a greater amount of haemoglobin reacting with the tumour in an attempt to neutralize it [5]. PpIX also has higher fat solubility in an acidic environment, which is compatible with the presence of lactic acid from anaerobic metabolism found in several tumours [4]. The presence of bacteria in hollow viscera tumours could also degrade haemoglobin on the luminal surface, which increases the porphyrin autofluorescence signal [10]. Most important of these hypotheses are the metabolic abnormalities present in malignant cells. Intracellular iron availability is reduced due to the increasing frequency of cell division, decrease in the activity of the ferrochelatase enzyme, and increase in the activity of the porphobilinogendeaminase enzyme. This process interferes with iron incorporation during haeme biosynthesis and favours the accumulation of PpIX in the tumour (Fig. 1) [7, 10].

A significant difference could be established between PpIX autofluorescence in healthy and prostate cancer animal models. In animals with tumours, PpIX synthesis is altered, which probably interferes with the synthesis of coproporphyrin and other faecal metabolites [5, 6]. In this study, we analysed faecal porphyrin levels in subjects with prostate cancer in a case-control study with humans.

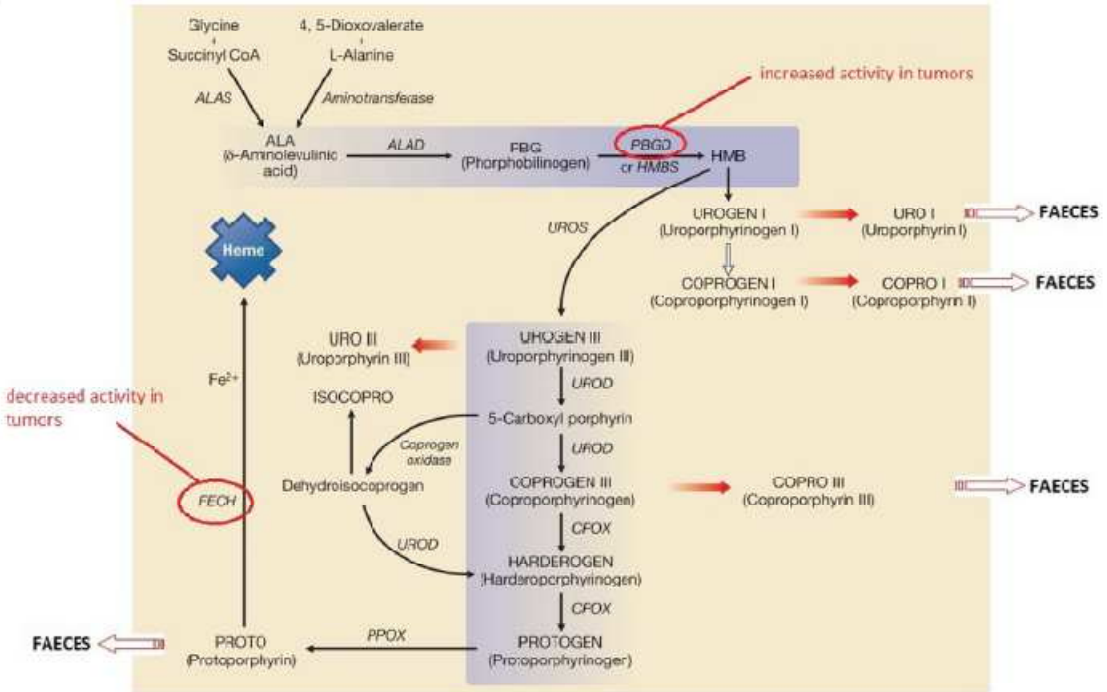



**Fig. 1** Biosynthesis of haeme and enzymes possibly altered in tumors [23]. *ALAS* = ALA synthase; *ALAD* = ALA dehydratase (Porphobilinogen synthase); *PBGD* = Porphobilinogen deaminase; *HMB* = Hydroxymethylbilane; *UROS* = Uroporphyrinogen synthase; *UROD* = Uroporphyrinogen descarboxilase; *CPOX* = Coproporphyrinogen oxidase; *PPOX* = Protoporphyrinogen oxidase; *FECH* = Ferrochelatase

## Methods

### Study type and sampling

In this case-control study, we recruited individuals with and without prostate cancer. All prostate cancer patients had a diagnosis confirmed by biopsy at Hospital Márcio Cunha/Fundação São Francisco Xavier's Oncology Division, Ipatinga, MG, Brazil, and we collected their material before the start of treatment. For the controls, we selected healthy individuals who were subjected to digital rectal examination and PSA measurement with negative results in the last 12 months. They were recruited within the Municipal Health Secretary Urology Ambulatories in the city of Ipatinga, MG, Brazil. Recruitment was carried out to obtain proper matching between attributes such as age, ethnicity, degree of schooling, socioeconomic status, and other variables.

### Clinical and sociodemographic variables

In addition to porphyrias, there is a group of metabolic diseases in which there could be an increase in faecal porphyrins. The investigation for other conditions that could cause this increase was conducted through clinical interviews and evaluation of patients' laboratory tests. Sociodemographic variables were analysed to guarantee homogeneity among the studied groups. All patients filled out a research form and consented to providing their faeces for the study. Table 1 shows the groups' homogeneity from the analysis of the studied variables.

The mean age ± SD in the prostate cancer patient group was 70.6 ± 7.75 years and in the control group was 66 ± 7.18 years ($p$ value = 0.2).

### Porphyrin extraction

Faecal samples were collected in proper amber flask receptacles without exposure to light, stored, and transported at − 20 °C prior to analysis. According to a thermometer installed inside the Styrofoam boxes, the cold temperature was maintained. All the materials were analysed within 48 h of collection.

A scan was carried out on four dilutions to choose the best volumes of acetone and faeces to obtain the most intense fluorescence. The assayed concentrations are shown in Table 2. For this optimization, two patients from each group were studied, and samples were prepared in triplicate.

### Fluorescent spectral analysis

The emission spectra were obtained by exciting the samples at 405 nm inside a 1-mm optical path cuvette. The samples' fluorescence was analysed using a Horiba Jobin Yvon Fluorolog 3 Fluorimeter in the range of 550–750 nm. The material was analysed in triplicate, and the mean of the three measures of each sample was considered for calculating the results (average multiple curves).

**Table 1** Studied variables frequency in cases and controls

| Variables | Controls | | Cases | |
|---|---|---|---|---|
| | *n* | % | *n* | % |
| Marital Status | | | | |
| Married | 6 | 66.6 | 7 | 77.7 |
| Single | 1 | 11.1 | 0 | 0 |
| Divorced | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Widowed | 2 | 22.3 | 2 | 22.3 |
| Alcoholism | | | | |
| Yes | 1 | 11.2 | 0 | 0 |
| No | 8 | 88.8 | 9 | 100 |
| Smoking | | | | |
| Yes | 0 | 0 | 3 | 33.3 |
| No | 9 | 100 | 6 | 66.6 |
| Family history of prostate cancer | | | | |
| Yes | 2 | 22.3 | 2 | 22.3 |
| No | 7 | 77.7 | 7 | 77.7 |
| Personal history of other kinds of cancer | | | | |
| Yes | 0 | 0 | 0 | 0 |
| No | 9 | 100 | 9 | 100 |
| Prostatic disease | | | | |
| Yes | 0 | 0 | 0 | 0 |
| No | 9 | 100 | 9 | 100 |
| Diabetes | | | | |
| Yes | 2 | 22.3 | 1 | 11.2 |
| No | 7 | 77.7 | 8 | 88.8 |
| Dyslipidemia | | | | |
| Yes | 1 | 11.2 | 1 | 11.2 |
| No | 8 | 88.8 | 8 | 88.8 |
| Porphyria | | | | |
| Yes | 0 | 0 | 0 | 0 |
| No | 9 | 100 | 9 | 100 |
| Anemia | | | | |
| Yes | 0 | 0 | 0 | 0 |
| No | 9 | 100 | 9 | 100 |
| Lead/metals intoxication | | | | |
| Yes | 0 | 0 | 0 | 0 |
| No | 9 | 100 | 9 | 100 |
| Antibiotics use | | | | |
| Yes | 0 | 0 | 0 | 0 |
| No | 9 | 100 | 9 | 100 |

Data were analysed using descriptive and inferential statistics. For spectra analysis, we used the software OriginPro 8® version 8.0724. For statistical analysis, we used the software SPSS® version 19.0. Quantitative variables are presented as means and standard deviations. Qualitative

**Table 2** Amount of faeces and acetone used in each dilution

| Dilution | Acetone (mL) | Feces (g) |
|---|---|---|
| 1 | 3 | 0,3 |
| 2 | 1 | 0,05 |
| 3 | 3 | 0,2 |
| 4 | 3 | 0,4 |

variables are presented as absolute and relative frequencies. A Kolmogorov-Smirnov test was applied for normality verification. We used an independent t-test for the comparison of group means and a Pearson test to verify correlations. A significance level of 5% was adopted.

## Results

Because this study is the first to quantify porphyrin in the faeces of humans with prostate cancer, a preliminary study was carried out with 9 individuals in each group, which is a similar sample size to those used in other studies [6, 11, 12]. Table 3 shows the result of the sample calculation based on the mean and standard deviation of two studies that have already demonstrated a difference between the porphyrin levels of cases and controls. Because this significant difference, a very small sample was estimated necessary for this study.

An initial study was carried out to determine the best acetone volume and faeces mass to use for optimal porphyrin fluorescence intensity in samples from the cancer patient and control groups (Additional file 1: spreadsheet 1). The results are shown in Fig. 2.

Dilutions 1 and 2 showed greater differences between groups and dilution 1 was chosen for later analyses.

Figure 3 shows the average results of the porphyrin fluorescence analysis of the control and cancer patient groups (Additional file 1: spreadsheets 2 and 3). The fluorescence intensity of faecal porphyrins was significantly higher in the group of patients with cancer. The Kolmogorov-Smirnov test indicated a normal distribution. For mean comparisons, we used an independent t-test with a significance level of $p < 0.05$.

The difference in mean maximum emission intensities at 671 nm between the control and cancer patient groups was significant (Fig. 3), at 4.13E + 06 CPS (±1.29E + 06 CPS) for controls and 1.50E + 07 CPS (±4.94E + 06 CPS) for cancer patients, with a $p$ value of 0.000127.

For further study of cancer patients, we recruited 3 patients from each D'Amico classification stage, with PSAs ranging from 4.41 ng/mL to 71.05 ng/mL and Gleason scores ranging from 4 to 9 within each stage. However, there was no correlation between any of these variables and the levels of porphyrins in the faeces of these cancer patients. A potential correlation between the PSA levels and faecal porphyrins was assessed using Pearson's coefficient (r). There was no statistically significant correlation between these variables ($R = -0.0221$).

## Discussion

Currently, the main challenges in prostate cancer are finding alternatives to PSA measurement for diagnosis and researching new markers that can predict the disease's aggressiveness. This would assistin therapeutic planning and avoid unnecessary interventions, for example, the need for prostate biopsy and its associated risks for diagnosis. Determining the accuracy of PSA testing has been difficult because most men with normal PSA values will not undergo biopsy unless their digital rectal exam is abnormal. This workup bias tends to overestimate sensitivity and underestimate specificity of PSA testing. Performance can also be overestimated because PSA often detects clinically unimportant cancers. Additionally, protocols that use large numbers of biopsies to evaluate patients with elevated PSA levels may be detecting incidental cancers that were not the aetiology of the PSA elevation. In this context, the search for new biomarkers capable of improving the sensitivity and specificity of PSA testing is necessary [13–15].

There are several advantages to demonstrating that a biomarker for prostate cancer can be quantified from faeces, such as low cost, decrease in discomfort related to blood withdrawal, and negation of the need for specialized professionals and materials for the collection procedure as well as the clinical community's familiarity with performing this kind of exam for other purposes (e.g., parasitological examination and faecal occult blood testing). On the other hand, many people might prefer to have a blood collection than to collect a faecal sample of themselves. Although many studies have shown an

**Table 3** Reference studies containing mean concentration ± SD of porphyrins found in cases and controls

| Reference study | Study type | Control group (mean ± SD) | Case group (mean ± SD) | Confidence Level | Power | Calculated sample |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Study of Protoporphyrin IX Elimination by Body Excreta: A new Noninvasive Cancer Diagnostic Method. [6] | Experimental (Prostate cancer) | 0.72 ± 0.12 | 2.73 ± 0.51 | 99% | 90% | 4 |
| Concentration of protoporphyrin IX in cancer tissues and blood in patients with colorectal cancer at early stage. [4] | Clinical (Colorectal cancer) | 0.58 ± 0.08 | 2.28 ± 0.10 | 99% | 90% | 2 |

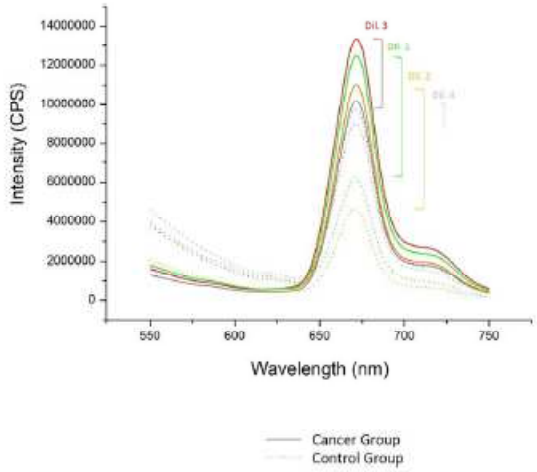



**Fig. 2** Difference between spectrophotometric peaks obtained from each dilution

increase in blood porphyrins in other types of cancer, only a single experimental study in prostate cancer showed an alteration in faecal porphyrins. This study identified two emission bands in the faeces of nude mice [6]. One band at 632 nm had increased intensity and corresponded to the faecal concentration of PpIX. The other band at 671 nm corresponded to coproporphyrins and other faecal porphyrins, and the mice with prostate cancer had a lower intensity band compared to that found with the control group.

In the present study, only a single emission band at 670–675 nm was found in both the cancer patient and control groups. This band can be attributed to soluble porphyrins, such as coproporphyrin and uroporphyrin, or to the photoproducts formed by PpIX degradation. A peak corresponding to faecal PpIX was not found in our study. The main hypothesis to explain this could be the difference in the metabolism and concentration of different kinds of porphyrins in human faeces compared to those from nude mice. The same method of extraction and processing used in the nude mouse experiment was applied, but neither of this study's groups presented a spectrophotometric peak at 632 nm. Another explanation for these findings could be the elapsed time gap from the collection of faeces to their analysis in the two studies. Despite being properly protected from light, the finding of a single spectrophotometric peak could be explained by the photodegradation of PpIX in our patient samples, as well as the increased activity of porphobilinogendeaminase enzyme in the cytoplasm of individuals with cancer. This enzymatic activity would have led to an increase in faecal coproporphyrins and uroporphyrins, as hypothesized by other authors [10].

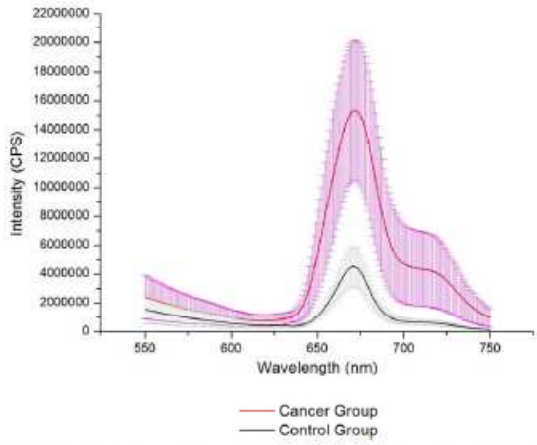



**Fig. 3** Analysis of porphyrins extracted from the feces of control and cancer groups

An increase in faecal porphyrins has already been shown in other conditions, including porphyria (variegate porphyria and hereditary coproporphyria) and sideroblastic anaemia [16, 17]. The use of antibiotics is a common approach in clinical practice that could decrease the levels of faecal porphyrins by modifying intestinal flora [18]. The use of these medications excluded patients from our study. In this study, we were also careful to exclude conditions that could lead to false-positive results through clinical examination. The cholesterol and haemoglobin levels of all patients in both groups were verified [17, 19]. All patients were asked about their disease conditions, such as diabetes and dyslipidaemia, medication use (antibiotics), and the presence of any symptoms. This leads us to believe that the increase in faecal porphyrins indeed resulted from the altered metabolism of porphyrins caused by the tumour.

Predicting prostate cancer biological behaviour after being diagnosed is of great scientific relevance and importance for determining treatment. PSA is a tumour marker that is considered in risk predictor scores that are often used in clinical practice (Partin nomogram and D'Amico classification) [20, 21]. In the present study, we did not find a correlation between PSA level, Gleason score, D'Amico classification and the level of faecal porphyrins. However, there are in vitro studies correlating an increase in tumour size with an increase of PpIX blood levels in nude mice, which could ultimately lead to an increase in faecal porphyrins [5]. Nakayama et al. observed increases in PpIX in cancer cells, even during the latency stage that is characterized by no proliferation, no death, metabolic suppression, and the recovery of active status [22]. These findings suggest that faecal porphyrin concentrations could also be useful as biomarkers to monitor tumour growth and perhaps to assess the biological behaviour of this type of cancer.

## Conclusions

In conclusion, we have demonstrated in this preliminary study that faecal porphyrins have the potential to function as a tumour biomarker for prostate cancer. Additional prospective studies with larger sample sizes are required to validate these findings and elucidate the sensitivity and specificity of faecal porphyrins for the diagnosis of the disease.

## Additional file

**Additional file 1:** Spreadsheet 1- comparison between the dilutions used, spreadsheets 2 and 3 - results of the spectrophotometric peaks (XLSX 90 kb)

**Acknowledgements**
The authors thank Carla Regina Borges Lopes for their excellent technical assistance.

**Funding**
No funding was received. Materials and equipment were provided by the institutions of the authors.

**Availability of data and materials**
All data generated or analyzed during this study are included in this published article in Additional file 1: spreadsheets 1, 2 and 3.

**Authors' contributions**
DRG: project development, protocol development, data collection and management, data analysis and manuscript writing. LCC: protocol development, data analysis and manuscript writing. MHB: project development, protocol development and data management. FROS: protocol development, data management. CRJS: project development and manuscript editing. All authors read and approved the final manuscript.

**Ethics approval and consent to participate**
All the patients signed a Informed Consent Form, and the study was approved by the Research Ethics Committee of Unileste, MG, Brazil (draft number 784592/2017).

**Consent for publication**
Not applicable.

**Competing interests**
The authors declare that they have no competing interest.

## Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

**Author details**
[1]Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, Av. Prof. Lineu Prestes, 2242- Cidade Universitária, São Paulo 05508-000, Brazil. [2]Instituto Tocantinense Presidente Antônio Carlos - ITPAC Palmas, Tocantins, Brazil. [3]Instituto de Ciências Ambientais Químicas e Farmacêuticas (ICAQF), Departamento de Física (DF), UNIFESP, Campus Diadema, São Paulo, Brazil.

Received: 25 April 2018 Accepted: 1 November 2018
Published online: 12 November 2018

**References**

1. Global, Regional, and National Cancer Incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 32 Cancer groups, 1990 to 2015. A systematic analysis for the global burden of disease study. JAMA Oncologia. 2017;3(4):524–48.
2. Obort AS, Ajadi MB, Akinloye O. Prostate-specific antigen: any successor in sight? Rev Urol. 2013;15(3):97–107.
3. Kalaivani R, et al. Fluorescence spectra of blood components for breast cancer diagnosis. Photomed Laser Surg. 2008;26(3):251–6.
4. Jia Z, Wan X. Concentration of protoporphyrin IX in cancer tissues and blood in patients with colorectal cancer at early stage. Zhong Nan Da XueXueBao Yi Xue Ban. 2009;34(9):846–9.
5. Silva FRO, Bellini MH, Tristão VR, Schor N, Vieira ND Jr, Courrol LC. Intrinsic fluorescence of Protoporphyrin IX from blood samples can yield. J Fluoresc. 2010;20(6):1159–65.
6. Silva FR, et al. Study of protoporphyrin IX elimination by body excreta: a new noninvasive cancer diagnostic method? J Fluoresc. 2013;23(1):131–5.
7. El-Sharabasy MM, el-Waseef AM, Hafez MM, Salim SA. Porphyrin metabolism in some malignant diseases. Br J Cancer. 1992;65(3):409–12.
8. Masilamani V, Al-Zhrani K, Al-Salhi M, Al-Diab A, Al-Ageily M. Cancer diagnosis by autofluorescence of blood components. J Lumin. 2004;109:143–54.
9. Xu XR, Meng JW, Hou SG, Ma HP, Wang DS. The characteristic fluorescence of the serum of cancer patients. J Lumin. 1988;40–1:219–20.
10. Moesta KT, et al. Protoporphyrin IX occurs naturally in colorectal cancers and their metastases. Cancer Res. 2001;61(3):991–9.
11. Hyun DS, Kim HT, Jheon SH, Park SI, Kim JK. A preliminary study of protoporphyrin-IX as a potential candidate for identification of lung cancer cells using fluorescence microscopy. Photodiagn Photodyn Ther. 2009;6(3–4):221–6.
12. Bellini MH, Coutinho EL, Courrol LC, Oliveira Silva FR, Vieira JND, Schor N. Correlation between autofluorescence intensity and tumor area in mice bearing renal cell carcinoma. J Fluoresc. 2008;18(6):1163–8.
13. Punglia RS, D'Amico AV, Catalona WJ, Roehl KA, Kuntz KM. Effect of verification bias on screening for prostate cancer by measurement of prostate-specific antigen. N Engl J Med. 2003;349(4):335–42.
14. McNaughton Collins M, Ransohoff DF, Barry MJ. Early detection of prostate cancer. Serendipity strikes again. JAMA. 1997;278(18):1516–9.
15. Risk MC, Lin DW. New and novel markers for prostate cancer detection. Curr Urol Rep. 2009;10(3):179–86.
16. Hindmarsh JT, Oliveras L, Greenway DC. Biochemical differentiation of the porphyrias. Clin Biochem. 1999;32(8):609–19.
17. Camaschella C. Hereditary sideroblastic anemias: pathophysiology, diagnosis and treatment. Semin Hematol. 2009;46(4):371–7.
18. Beukeveld GJ, Wolthers BG, van Saene JJ, de Haan TH, de Ruyter-Bultenhuis LW, van Saene RH. Patterns of porphyrin excretion in feces as determined by liquid chromatography; reference values and the effect of flora suppression. Clin Chem. 1987;33(12):2164–70.
19. Nascimento da Silva M, Sicchieri LB, de Oliveira Silva FR, Andrade MF, Courrol LC. Liquid biopsy of atherosclerosis using protoporphyrin IX as a biomarker. Analyst. 2014;139(6):1383–8.
20. Tosoian JJ, Chappidi M, Feng Z, Humphreys EB, Han M, Pavlovich CP, Epstein JI, Partin AW, Trock BJ. Prediction of pathological stage based on clinical stage, serum prostate-specific antigen, and biopsy Gleason score: Partin tables in the contemporary era. BJU Int. 2017;119(5):676–83.
21. Hernandez DJ, Nielsen ME, Han M, Partin AW. Contemporary evaluation of the D'Amico risk classification of prostate cancer. Urology. 2007;70(5):931–5.
22. Nakayama T, Otsuka S, Kobayashi T, Okajima H, Matsumoto K, Hagiya Y, Inoue K, Shuin T, Nakajima M, Tanaka T, Ogura SI. Dormant cancer cells accumulate high protoporphyrin IX levels and are sensitive to 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy. Nature Sci Rep. 2016;6:36478.
23. Wolff K, Goldsmith L, Katz S, Gilchrest B, Paller AS, Leffell D. Fitzpatrick's dermatology in general medicine, chapter 132: the Porphyrias, 8th Edition. New York: McGraw-Hill; 2011.

**INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES**
**Diretoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Ensino**
**Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 – Cidade Universitária CEP: 05508-000**
**Fone/Fax(0XX11) 3133-8908**
**SÃO PAULO – São Paulo – Brasil**
**http://www.ipen.br**

**O IPEN é uma Autaquia vinculada à Secretaria de Desenvolvimento, associada à Universiade de São Paulo e gerida técnica e administrativamente pela Comissão Nacional de Energia Nuclear, órgão do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação.**