



UNIVERSIDADE FEDERAL
DE ALAGOAS

INSTITUTO DE COMPUTAÇÃO

DEPARTAMENTO DE COMPUTAÇÃO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MODELAGEM COMPUTACIONAL DO
CONHECIMENTO

ARTHUR DANTAS VIEIRA

**Perfil metabólico das águas fecais de pacientes
com carcinoma colorretal através de espectroscopia
de ressonância nuclear magnética**

Maceió

28 de Fevereiro de 2019

ARTHUR DANTAS VIEIRA

**Perfil metabólico das águas fecais de pacientes
com carcinoma colorretal através de espectroscopia
de ressonância nuclear magnética**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Modelagem Computacional do Conhecimento, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Manoel Álvaro de Freitas Lins Neto

Coorientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Caetano

Maceió
28 de Fevereiro de 2019

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale – CRB4 - 661

V658p Vieira, Arthur Dantas.

Perfil metabólico das águas fecais de pacientes com carcinoma colorretal através de espectroscopia de ressonância nuclear magnética / Arthur Dantas Vieira. – 2019.

47 f. : il.

Orientador: Manuel Álvaro de Freitas Lins Neto.

Co-orientador: Luiz Carlos Caetano.

Dissertação (mestrado em Modelagem Computacional de Conhecimento) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Computação. Maceió, 2019.

Bibliografia: f. 41-47.

1. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear. 2. Screening. 3. Cancer colorretal – Diagnóstico. 4. Metabólica. I. Título.

CDU: 004.4:616.34-006

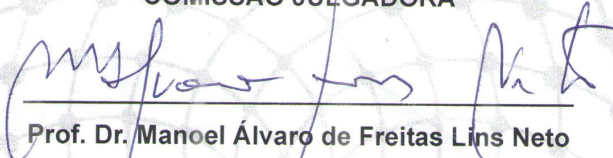


UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS/UFAL
Programa de Pós-Graduação em Modelagem Computacional de Conhecimento
Avenida Lourival Melo Mota, Km 14, Bloco 12, Cidade Universitária
CEP 57.072-900 – Maceió – AL – Brasil
Telefone: (082) 3214-1364/1825



Membros da Comissão Julgadora da Dissertação de Mestrado de Arthur Dantas Vieira, intitulada: “Perfil Metabolômico das Águas Fecais de Pacientes com Carcinoma Colorretal através de Espectroscopia de Ressonância Nuclear Magnética”, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Modelagem Computacional de Conhecimento da Universidade Federal de Alagoas, em 28 de fevereiro de 2019, às 16h30min, no Auditório da Famed - UFAL.

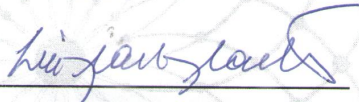
COMISSÃO JULGADORA



Prof. Dr. Manoel Álvaro de Freitas Lins Neto

Ufal – Faculdade de Medicina

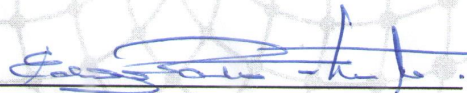
Orientador



Prof. Dr. Luiz Carlos Caetano

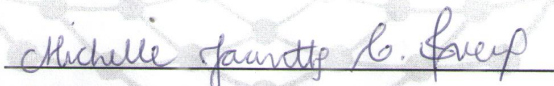
Ufal – Instituto de Química e Biotecnologia

Co-orientador



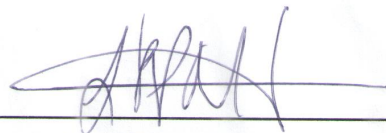
Prof. Dr. Edgar Valente de Lima Neto

Ufal – Faculdade de Medicina



Profa. Dra. Michelle Jacintha Cavalcante Oliveira

Ufal – Faculdade de Medicina



Prof. Dr. Jorge Artur Peçanha de Miranda Coelho

Ufal – Faculdade de Medicina

Maceió, 28 de fevereiro de 2019.

Resumo

O Carcinoma Colorretal (CCR) é uma das principais causas de mortalidade associada ao câncer em todo o mundo. No intuito de reduzir a morbimortalidade desta doença, técnicas de rastreio (*screening*) do paciente assintomático são extensamente estudadas na literatura. A videocolonosopia com biópsia é largamente utilizada, mas apresenta uma taxa considerável de morbidade inerentes à procedimentos invasivos de diagnóstico. Diante do citado, a metabolômica têm surgido como alternativa viável e com aceitável sensibilidade e especificidade para diagnóstico do CCR. O estudo metabolômico de material fecal tem provado ter maior efetividade visto à proximidade com a mucosa do intestino grosso e por ser produto direto de interações entre compostos da dieta e microbiota intestinal. Na tentativa de distinguir um padrão metabólico de pacientes sadios em relação à pacientes portadores de CCR, foi realizada a análise das águas fecais destes grupos distintos através de espectroscopia por ressonância nuclear magnética (ERNM). **Objetivos:** procurar diferenciar um perfil metabólico típico de pacientes com CCR frente ao grupo controle (GC) e comparar estes resultados com uma revisão sistemática da literatura (RSL). **Método:** 11 pacientes do GC e 5 pacientes com CCR foram selecionados no ambulatório de coloproctologia do HUPAA. Realizou-se a análise de ERNM das águas fecais e posteriormente avaliação dos espectros de RNM por correlação estatística (STOCSY) pelo *software* SIMCA (umetrics.com). RSL foi efetuada nas bases PubMed, Web of Science, Cochrane e Scopus, usando palavras chaves relacionadas à câncer de cólon e ERNM, contemplando estudos publicados em inglês num período de 1992 à 2018. **Resultados:** os pacientes com CCR apresentaram redução em praticamente todas as vias metabólicas. Ácidos graxos de cadeia curta (acetato, propionato e butirato) e aminoácidos (alanina e glicina) apresentaram-se reduzidos frente ao GC (ANOVA, $P < 0,05$). Na RSL, identificou-se 386 estudos, dos quais 5 respondem diretamente à pergunta de pesquisa estabelecida, nos permitindo verificar que nas amostras fecais os AGCC e aminoácidos se apresentam em quantidades reduzidas em pacientes CCR. **Conclusão:** ERNM de águas fecais é um método factível para *screening* do CCR. Porém, um aumento no interesse da comunidade científica em publicações em revistas de alto fator de impacto se faz necessário para estabelecê-lo como método *gold standard* de *screening* e diagnóstico precoce do câncer do cólon e reto.

Abstract

Colorectal Carcinoma (CRC) is one of the leading causes of cancer-related mortality worldwide. In order to reduce the morbidity and mortality of this disease, screening techniques for asymptomatic patients are extensively studied in the literature. Biopsy by videocolonoscopy is widely used, but presents a considerable rate of morbidity inherent in invasive diagnostic procedures. In view of the above, metabolomics have emerged as a viable alternative and with acceptable sensitivity and specificity for CRC diagnosis. The metabolic study of faecal material has been shown to be more effective because of its proximity to the mucosa of the large intestine and because it is a direct product of interactions between dietary compounds and intestinal microbiota. In an attempt to distinguish a metabolic pattern of healthy patients in relation to patients with CRC, fecal analysis of these distinct groups was performed by magnetic resonance spectroscopy (MRE). **Objectives:** to differentiate a typical metabolic profile of CRC patients versus the control group (CG) and to compare these results with a systematic review of the literature (SRL). **Method:** 11 patients from GC and 5 patients with CRC were selected at the HUPAA coloproctology outpatient clinic. Faecal MRE analysis and subsequent evaluation of MRI spectra by statistical correlation (STOCSY) were performed by SIMCA software (umetrics.com). SRL was performed in the PubMed, Web of Science, Cochrane and Scopus databases, using key words related to colon cancer and MRE, considering studies published in English from 1992 to 2018. **Results:** CRC patients showed reduction in practically all metabolic pathways. Short chain fatty acids - SCFA (acetate, propionate and butyrate) and amino acids (alanine and glycine) were reduced against CG (ANOVA, $P < 0.05$). In the SRL, 386 studies were identified, of which 5 respond directly to the established research question, allowing us to verify that in the fecal samples the SCFA and amino acids are present in reduced amounts in CRC patients. **Conclusions:** MRE of faecal extract is a feasible method for CRC screening. However, an increase in the interest of the scientific community in publications in high impact factor journals is necessary to establish it as a gold standard method of screening and early diagnosis of colon and rectal cancer.

Lista de ilustrações

Figura 1 – Passos tomados na revisão sistemática usando a metodologia PRISMA	17
Figura 2 – Evolução do interesse da comunidade científica em métodos de detecção de CRC	18
Figura 3 – Fase Seleção - Número de artigos atendendo aos critérios de inclusão definidos anteriormente	19
Figura 4 – Fase Seleção - Número de artigos atendendo aos critérios de exclusão definidos anteriormente	19
Figura 5 – Número de artigos na fase de Seleção e na fase de Extração	20
Figura 6 – <i>emph</i> Journals com mais contribuições em número de artigos	20
Figura 7 – Variação da concentração dos metabólitos nos grupos controle e paciente nos 5 estudos selecionados	22
Figura 8 – Funil de Begg dos estudos selecionados - variância dos metabólitos	23
Figura 9 – Metabólitos que apresentam correlação com CCR nos estudos selecionados	24
Figura 10 – Análise PCA Controle x CCR	31
Figura 11 – Análise OPLS-DA Controle x CCR	31
Figura 12 – Prova de validação cruzada Controle x CCR	32
Figura 13 – Perfil metabólico CCR X Controle	32
Figura 14 – Perfil do Propionato CCR x Controle	33
Figura 15 – Perfil do Butirato CCR x Controle	33
Figura 16 – Perfil do Acetato CCR x Controle	33
Figura 17 – Perfil da Alanina CCR x Controle	34
Figura 18 – Perfil metabólico da Glicina CCR x Controle	34
Figura 19 – Perfil da Glicina CCR x Controle	34
Figura 20 – Perfil Metabólico da Creatinina e Creatina CCR X Controle	35
Figura 21 – Perfil da Creatinina CCR X Controle	35
Figura 22 – Perfil da Creatina CCR X Controle	35
Figura 23 – Perfil dos metabólitos desconhecidos	36
Figura 24 – Perfil do metabólito em 1H ppm = 8,5072	36
Figura 25 – Perfil do metabólito em 1H ppm = 6,0255	36
Figura 26 – Perfil Metabólico do Etanol CCR x Controle	37
Figura 27 – Perfil do Etanol CCR X Controle	37

Lista de tabelas

Tabela 1 – Estudos selecionados - Análise de metabólitos em amostras fecais usando ERNM	21
Tabela 2 – Perfil Epidemiológico Grupo Controle	28
Tabela 3 – Perfil Epidemiológico CCR	29

Lista de abreviaturas e siglas

AGCC	Ácidos Graxos de Cadeia Curta
ATC	Ácido tricarboxílico
CCR	Carcinoma Colorretal
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectômetro de massas
CL-EM	Cromatografia Líquida acoplada ao Espectômetro de Massas
CRC	Colorectal Carcinoma
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EM	Espectofotometria de Massa
ERNM	Espectroscopia por Ressonância Nuclear Magnética
EUA	Estados Unidos da América do Norte
FOBT	fecal occult blood test ou teste de sangue oculto nas fezes
GC	Grupo Controle
GC-MS	Gas Chromatography-Mass Spectrometry
HUPAA	Hospital Universitário Prof. Alberto Antunes
LC-MS	Liquid Chromatography - Mass Spectrometry
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
OPLS-DA	Orthogonal Partial Least Squares-Discriminant Analysis
RNM	Ressonância Nuclear Magnética
RNM-H	Ressonância Nuclear Magnética com Hidrogênio
RSL	Revisão Sistemática da Literatura
TC	Tomografia Computadorizada
TNM	Tumor, Nodes and Metastasis
TOFMS	Time-of-flight mass spectrometry
UPLC	Ultrapformance liquid chromatography

Sumário

1	Introdução	10
2	Revisão Sistemática da Literatura	15
2.1	Questão de pesquisa	15
2.2	Estratégia de busca	16
2.3	Crerários de inclusão	17
2.4	Crerários de Exclusão	18
2.5	Meta-análise	18
2.5.1	Síntese dos estudos selecionados	21
2.5.1.1	Considerações sobre os estudos selecionados	24
2.6	Revisão geral da literatura	25
3	Materiais e Métodos	28
4	Resultados e Discussão	31
4.1	Resultados	31
4.2	Discussão	37
5	Conclusão	41
	Referências	42

1 Introdução

A análise de biofluidos é milenar. Hipócrates, no quarto século A.C., descreveu o diagnóstico e detecção de doenças através da análise de urina (cor, sabor e odor). Porém, foi na metade do século XVIII D.C. onde pesquisadores começaram a associar os constituintes dos biofluidos com inúmeras doenças⁽¹⁾. A metabolômica é um campo recém-emergente relacionado com a identificação de alto rendimento e quantificação dos pequenos metabólitos moleculares dentro do metaboloma⁽²⁾. O metaboloma pode ser definido como a coleção completa de todos os metabólitos celulares (aminoácidos, açúcares, ácidos orgânicos, bases, vitaminas, lipídeos, etc.) encontrados em uma célula específica, órgão ou organismo. Devido ao foco em estudo de metabólitos, a metabolômica é utilizada para estudo de: diabetes mellitus, osteoartrite, diagnóstico e monitoramento de doenças genéticas, diagnóstico de doenças infecciosas, toxicologia clínica e monitoramento de transplante de órgãos. A metabolômica é uma subárea relativamente nova no campo das ciências ômicas (genômica, transcriptômica e proteômica) e baseia-se em princípios técnicos de química analítica como espectrometria de massa (EM), espectroscopia por ressonância nuclear magnética (ERNM) e cromatografia⁽³⁾. O potencial do perfil metabólico é tamanho pois é possível a análise de dezenas ou centenas de componentes metabólicos em uma única amostra, possibilitando a análise do perfil metabólico e fisiológico do indivíduo. Este perfil pode gerar informações, em poucos segundos ou minutos, de uma “assinatura fisiometabólica pessoal” as quais podem não ser acessíveis por testes genéticos, laboratoriais convencionais ou biópsias de tecidos orgânicos⁽⁴⁾. Logo, é possível realizar o diagnóstico precoce de inúmeras doenças através destes compostos isolados.

A partir de 1990 iniciou-se a metabolômica de alto rendimento com aperfeiçoamento de inúmeros instrumentais analíticos como a EM, desenvolvimento de espectrômetros de RNM de frequência, cromatografia líquida de alta pressão e sistemas de cromatografia multidimensional⁽⁵⁾. Para aprimorar o processo de análise, inúmeros *softwares* foram desenvolvidos no intuito de promover um perfil metabólico e espectral adequado e posterior armazenamento em banco de dados^(6, 7, 8). A análise de biofluidos em preferência à tecidos orgânicos (biópsia) é benéfica por diversos fatores citados por Wishart⁽⁹⁾ como: menos invasiva, processamento de dados mais rápido e sugerem um perfil fisiológico do indivíduo. A urina refletiria o perfil renal, o líquido cefalorraquidiano (LCR) o perfil cerebral e as fezes o perfil do intestino grosso, por exemplo. A vantagem da urina e LCR sobre outros biofluidos (saliva, sangue e fezes) seria pela redução importante da concentração de proteínas. Logo urina e LCR podem ser processados de uma forma mais dinâmica e os outros compostos precisam de extração e filtração, para remoção de componentes de alto peso molecular, para serem analisados em espectroscopia por RNM, por exemplo⁽⁹⁾. A preferência no uso de material fecal para

rastreamento de CCR pode ser justificada. Segundo Rowland(10) as fezes podem ser capazes de demonstrar um perfil ideal da saúde do intestino grosso, composição da microbiota colônica e estado inflamatório atual do cólon.

A metabolômica refere-se à medida abrangente e análise de metabólitos e sua variação em reação a qualquer condição subjacente (ambiental por exemplo) ou doença (11, 12). A caracterização de fenótipos metabólicos que utilizam ferramentas de alta resolução poderia fornecer maior compreensão das doenças afetadas pelo metabolismo, como CCR. Foi demonstrado que o desenvolvimento do CCR depende das interações entre o hospedeiro e vários fatores ambientais, incluindo dieta e composição do microbioma intestinal (13, 14). Matrizes como urina, fezes e tecidos tumorais representam o produto final de expressão genética, síntese e consumo de compostos orgânicos e metabolismo microbiológico do CCR (15). Segundo Martin et al.; Schwabe e Jobin(16, 17), o estudo metabolômico de material fecal tem provado ter maior efetividade visto à proximidade com a mucosa do intestino grosso e por ser produto direto de interações entre compostos da dieta e microbiota intestinal.

Independentemente da forma de perfil metabólico selecionado a análise será realizada através de Cromatografia Gasosa associada ao Espectômetro de Massas (*Gas Chromatography-Mass Spectrometry* ou CG-EM), Cromatografia Líquida associada ao Espectômetro de Massas (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry* ou CL-EM) e ERNM. A ERNM possui algumas vantagens e desvantagens sobre a EM (18, 19). Sobre as vantagens, Wishart(9) cita: é um método quantitativo e não-destrutivo; rapidez na análise (2 a 3 minutos por amostra); não necessita de derivatização ou separação; detecção de todas as classes orgânicas; tecnologia madura e robusta; pode ser usada para imagem dos metabólitos; grande gama de *softwares* para análise e banco de dados; compatível com líquidos e sólidos. Contudo, também possui algumas desvantagens. Segundo Wishart(9): não é muito sensível; alto custo; *footprint* alargado; não detecta componentes não-protonados; requer amostras maiores (0,5mL). Como regra geral, ERNM é capaz de detectar de 50 a 75 compostos em um biofluido humano, com baixo limite de sensibilidade de 1 μ M (ácidos orgânicos, açúcares, aminoácidos e pequenas aminas) (18).

De acordo com Trygg, Holmes e Lundstedt; Weljie et al.; Lavine e Workman(20, 21, 22), Quimiometria é a aplicação de métodos matemáticos, estatísticos e simbólicos para otimizar informações extraídas de dados químicos e espectrais. Para tal, se faz necessário um N sugerido de pelo menos quarenta amostras espectrais (23). Segundo Kind et al.(23) após a coleta dos espectros é imprescindível o escalonamento, alinhamento e/ou centralização para análise. Para análise objetiva das inúmeras variações que um espectro pode ter são utilizadas técnicas de redução dimensional, onde a mais conhecida é a PCA (*Principal Component Analysis*) (9).

O Carcinoma Colorretal (CCR) é uma das principais causas de mortalidade associada ao câncer em todo o mundo, particularmente em países desenvolvidos. Segundo Derry et al.(24) é a segunda causa de morte relacionada à câncer nos Estados Unidos da América do Norte (EUA). A ressecção cirúrgica do CCR em pacientes com estádios clínicos iniciais (TNM) oferece taxas de sobrevivência em cinco anos livres de doença maiores em comparação com estádios avançados (25). Na França, o câncer recentemente superou as doenças cardiovasculares como a principal causa de morte na população em geral. A origem do CCR é multifatorial tendo como fatores de risco a herança genética e dieta (24). Evidências sugerem aumento (ingesta de carne vermelha, carne processada e gorduras) ou redução (fibras, frutos e vegetais) na incidência de CCR a depender do estilo dietético do indivíduo (26). Estratégias para redução da morbimortalidade desta doença focam-se em tratamentos curativos ou técnicas de rastreio (*screening*) no paciente assintomático, como o FOBT (*fecal occult blood test* ou teste de sangue oculto nas fezes) (27), FIT (*fecal immunochemical test* ou teste imunológico fecal) (28), CEA (*carcinoembryonic antigen* ou antígeno carcinoembrionário) (29), pesquisa de hipermetilação de DNA sérico (30), pesquisa de DNA fecal (31), colonografia por tomografia computadorizada (TC) (32, 33), vídeo-colonosopia (34, 35, 36, 37, 38, 39) e análise metabólica fecal (40). Inúmeros ensaios clínicos controlados e randomizados têm apresentado reduções nas taxas de morbimortalidade do CCR dos pacientes que realizam *screening* em comparação com os que não (41)

Os testes de rastreamento baseados em análises fecais apresentam ampla aceitação e utilização. FOBT apresenta taxas de falso-positivo em alimentos que contêm sangue em sua composição (carne vermelha) ou que reagem com o guaiaco (rábano, nabo ou brócolis) (41). No entanto, a sensibilidade do FOBT permanece baixo para CCR e, especialmente, para adenomas pequenos (42, 31, 43). FIT apresenta vantagem sobre o FOBT por não requerer restrições dietéticas e apresenta sensibilidade de 79% e especificidade de 94% (44). No entanto, existe uma variabilidade considerável nos resultados de diversos FIT disponíveis no mercado atualmente (41). Marcadores moleculares presentes em células de CCR podem ser detectadas nas fezes (41). Maior sensibilidade foi apresentada com FIT-DNA frente ao FIT isolado (92,3% vs. 73,8%) porém houve uma redução na especificidade (86,6% vs. 94,9%).

Para implementar estratégias de triagem em indivíduos assintomáticos o uso de marcadores de DNA fecal e perfis de metilação aberrante foram avaliados em um cenário clínico. Apresentam maior precisão diagnóstica do que o FOBT ou a colonoscopia mas possuem uma importante limitação: o custo de 220 a 800 dólares nos EUA (45).

O epitélio do intestino grosso é rico em bactérias as quais participam de inúmeras

reações orgânicas para garantir a homeostase do cólon, como ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), biotina e vitamina K⁽⁴⁶⁾. Os produtos do metabolismo de alguns destes compostos orgânicos podem gerar agentes carcinogênicos do CCR, como o benzopireno e acetaldeído⁽⁴⁷⁾. AGCC são produtos de fermentação bacteriana de polissacarídeos não digeridos amido-resistentes e, em menor grau, da putrefação de proteínas e aminoácidos. AGCC, em particular, butirato, são as principais fontes de energia para as células epiteliais colônicas. As bactérias produtoras de butirato estão presentes em quantidades consideráveis no intestino grosso⁽⁴⁸⁾. Estas alterações nas concentrações de AGCC podem ser explicadas de inúmeras formas, principalmente por alterações na microbiota colônica. A produção de AGCC ocorre principalmente através da degradação da glicose em piruvato, o qual é então transformado em AGCC e outros ácidos orgânicos⁽⁴⁹⁾.

Segundo Gonçalves⁽⁵⁰⁾, AGCC apresentam cauda alifática constituída por esqueleto de 2 a 6 carbonos e são produzidos por fermentação de fibra dietética pelas bactérias do cólon. Os principais AGCC são o butirato, o propionato e o acetato. A fermentação dos carboidratos que ocorre nas bactérias do cólon envolvem diversas reações metabólicas. A maioria das bactérias usa a via glicolítica para a fermentação mas, dependendo do carboidrato, também podem haver bactérias que usam a via das pentoses⁽⁵⁰⁾. Um dos produtos que se forma, como resultado destas vias, é o piruvato que, dependendo da bactéria, irá formar produtos dos quais se destacam o acetato, o propionato e o butirato⁽⁵¹⁾⁽⁵⁰⁾. A fermentação ocorre, na sua maior parte, no cólon ascendente, sendo os AGCC transportados para o cólon descendente pelo trânsito intestinal. A concentração e absorção de AGCC ao longo do intestino diminui com a proximidade do reto sigmoides (local com maior incidência de CCR)⁽⁵⁰⁾⁽⁵²⁾. AGCC apresentam importante papel anticarcinogênico no CCR através da redução da inflamação do colonócito e apoptose de células cancerígenas via atividade da p21⁽⁵³⁾.

A metabolômica para diagnóstico precoce do CCR têm base multifatorial. Os compostos orgânicos finais do metabolismo deste tumor são produtos de reações genéticas, dieta, exposição ambiental e alterações na microflora intestinal^(15, 29, 17, 54). A literatura, porém, é discordante sobre quais perfis metabólicos podem ser encontrados a depender do método utilizado. *Phua et al.*⁽⁵⁵⁾, através de CG-EM, realizou a análise de 11 pacientes portadores de CCR e 10 pacientes saudáveis. O autor encontrou níveis reduzidos de frutose, ácido linoléico e ácido nicotínico na análise metabolômica das fezes em comparação ao grupo controle. *Walker et al.*⁽⁵⁶⁾ reproduziram os achados de *Phua et al.*⁽⁵⁵⁾ com CG-EM, demonstrando concentrações reduzidas de ácido linoléico, frutose e ácido nicotínico. *Montrose et al.*⁽⁵⁷⁾ obtiveram resultados de três matrizes de amostras de ratos com CCR induzidos por azoximetano (fezes, sangue e biópsia do tumor) as quais foram analisadas por CG-EM e CL-EM. Nos ratos com CCR foi identificado diminuição nas concentrações de dipeptídeos e aumento de aminoácidos,

gama-glutamil e sarcosina. Goedert et al.(58) realizaram estudo tipo caso-controle com 48 pacientes com CCR e 102 controles. Utilizando CG-EM e CL-EM verificaram aumento na correlação de CCR com níveis aumentado de triptofano, glicina e sitostanol. Brown et al.(59) efetivaram o perfil metabólico da peça cirúrgica de CCR, margem de segurança de mucosa intestinal de 10 cm e fezes. Mediante CG-EM e CL-EM foram separados 728 compostos de 17 indivíduos com CCR (anátomo-patológico e fezes). De 500 metabólitos descritos na literatura nas fezes, apenas 215 foram identificados nas peças cirúrgicas. Apenas 19 compostos foram isolados tanto nos cólons ressecados quanto nas margens de segurança e somente 7 foram encontrados nas três matrizes.

Quando comparada a métodos de *screening* contemporâneos, a ERNM apresenta resultados promissores. Li et al. (60) relataram a superioridade do método quando comparado à FOBT e teste de identificação de metilação aberrante (AUROC=0,94 vs. 0,81 e 0,71, respectivamente) para identificação de CCR avançado. Este achado sugeriu que uma impressão metabólica fecal pode ser identificada devido à alterações metabólicas ocasionadas pelo CCR (61, 62). Dados de Rowland et al. (10) sedimentam o uso das fezes na demonstração da saúde do intestino grosso, composição da microbiota colônica e estado inflamatório atual do cólon. Já Lin et al. (63) reforça a correlação direta das águas fecais com a patôgenese do CCR.

Diante da literatura supra-citada, a seguinte questão chave foi aventada: é possível discriminar um perfil metabolômico em águas fecais que possa diferenciar o indivíduo sadio de portadores de CCR? A análise metabolômica fecal pode ser instituída como parte integrante do *screening* para o CCR?

O objetivo desta dissertação é apresentar dados para tentativa de verificar esta distinção através da análise metabonômica por intermédio da Espectroscopia por Ressonância Nuclear Magnética (ERNM) e embasar os resultados através de Revisão Sistemática da Literatura (RSL) (64).

2 Revisão Sistemática da Literatura

Revisão sistemática da literatura (RSL) e meta-análise (65, 66, 67) são métodos utilizados para mapear e validar técnicas médicas ao longo do tempo, sendo muitas vezes o ponto de partida para a verificação da eficácia de certo tratamento ou técnica. A RSL tem como premissa reunir e avaliar criticamente toda a evidência de trabalhos científicos originais pertinentes à uma pergunta de pesquisa claramente definida, tendo como primazia uma metodologia que prevê reprodutibilidade. Meta-análise é o uso de métodos estatísticos para divulgar os resultados e descobertas dos estudos fornecidos pela revisão sistemática. O principal documento de uma RSL é o protocolo. Neste documento define-se, *a priori*, os objetivos da revisão sistemática, as questões formuladas a serem respondidas, a estratégia de busca, os critérios de avaliação dos estudos, as bases científicas e o período contemplado pela revisão.

Vários estudos têm sido realizados para avaliar como os biomarcadores são afetados em indivíduos com câncer colorretal usando várias técnicas de detecção e avaliação. *Zhangetal.*(68) reúne estudos num período de 1998 a Janeiro de 2016 sobre metabólitos no plasma (11 estudos), urina (4 estudos), tecido em biópsias (9 estudos) e fezes (1 estudo) usando cromatografia líquida, gasosa e RNM em adultos. *Wangetal.*(69) reúne estudos num período de 1950 à Fevereiro de 2009 sobre metabólitos no plasma (3 estudos), urina (2 estudos) e tecido em biópsias (5 estudos) usando TOFMS (Time-of-flight mass spectrometry), UPLC (Ultrapformance liquid chromatography), ERNM e cromatografia gasosa. *Antonowiczetal.*(70) reúne estudos que avaliam metabólitos no sangue publicados até julho de 2015. Todos apresentam evidências de que os metabólitos podem ser usados para detecção prematura de CCR. Contudo, não são conclusivos em relação à especificidade e sensibilidade. Essa revisão sistemática teve como principal foco reunir e avaliar somente trabalhos científicos publicados que exploram amostras fecais usando ERNM.

A RSL é composta essencialmente por quatro fases: i) Construção do protocolo; ii) Seleção dos estudos; iii) Extração e avaliação dos estudos; iv) Divulgação das descobertas. Essa seção descreve todas as descobertas da RSL realizada, bem como o seu protocolo seguido de uma discussão exaustiva das descobertas encontradas.

2.1 Questão de pesquisa

A RSL teve como principal foco responder a seguinte questão de pesquisa: *existe diferença entre metabólitos encontrados, através de espectroscopia por RNM, nas fezes de indivíduos sadios e indivíduos com câncer de cólon e reto?*

2.2 Estratégia de busca

Para adquirir estudos originais publicados e revisados por pares, fizemos uso da estratégia PICO (*Population - Intervention - Control - Outcome*)(71) para avaliar os estudos extraídos das seguintes bases: Web of Science (8 resultados), Medline/PubMed (162 resultados), Cochrane (10 resultados) e Scopus (205 resultados).

- P = adultos com incidência de CCR em qualquer estadiamento TNM
- I = análise fecal através de ERNM
- C = indivíduos sadios
- O = identificação e quantificação de metabólitos

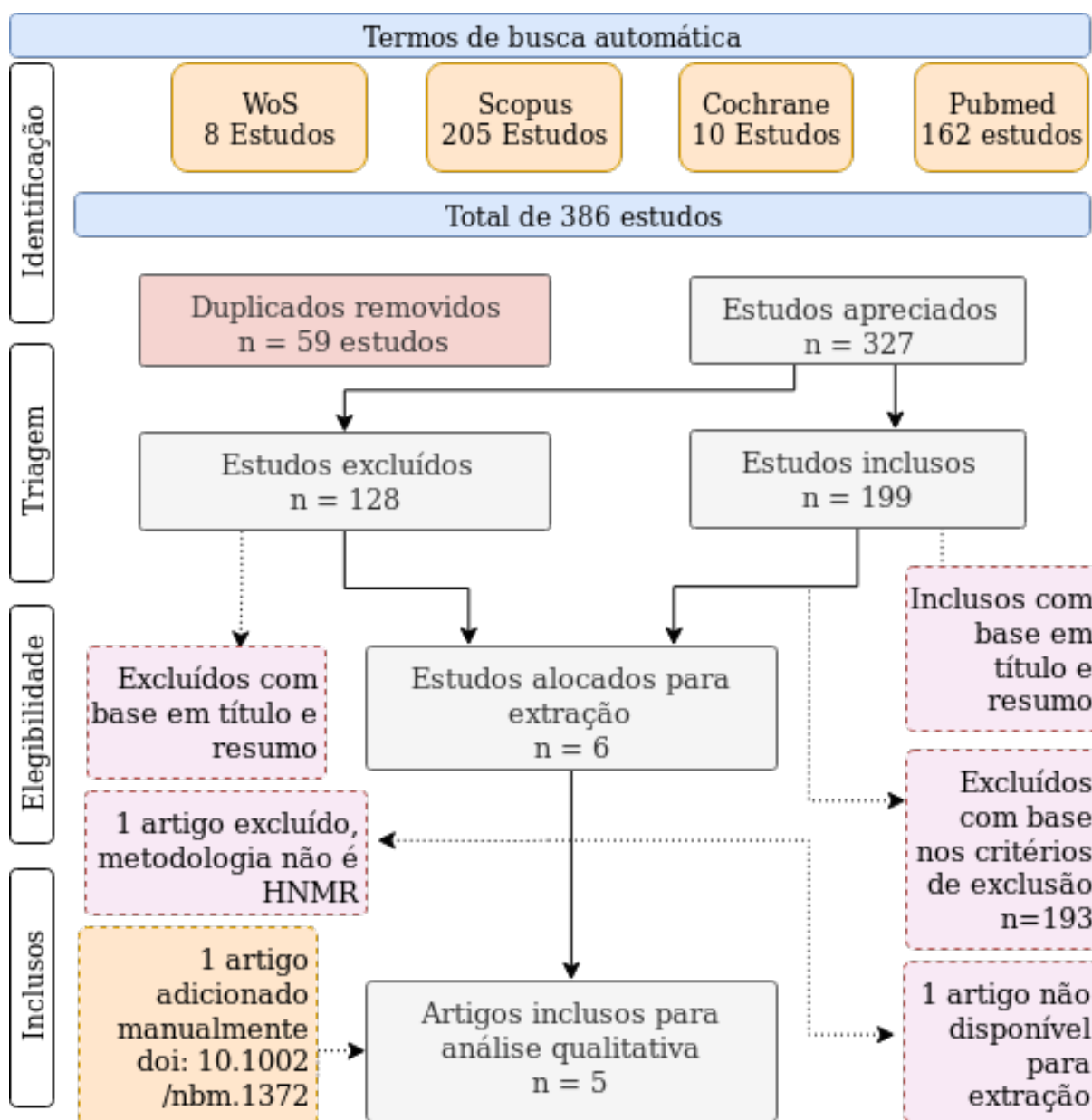
A busca nas bases foi realizada usando uma combinação de termos, facilitando a reprodutibilidade e diminuição do viés ideológico dos autores da revisão.

Os termos de busca foram combinados como descritos a seguir: (“**colorectal cancer?**” OR “**colorectal neoplasm?**”) AND (**screening** OR “**early diagnosis**” OR **non*invasive** OR **mri** OR **spectroscopy**) AND (**metabolomics** OR “**faecal metabolomics**” OR “**water extract feces**” OR “**metabolite**”).

Na figura ??, através da metodologia PRISMA (*Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses*)^{Group(72)} pode-se observar todos os passos tomados nessa RSL, na fase *Identificação* coletamos os estudos em cada base selecionada usando os termos de busca combinados, na *Triagem* foram removidos os duplicados (59 estudos), seguidos da remoção de estudos através da avaliação de título, resumo e critérios de exclusão. Na *Elegibilidade* os estudos foram avaliados em termos de critérios de inclusão, os que não atendiam aos mesmos foram excluídos. Na fase *Inclusos* os artigos foram avaliados criticamente em relação à metodologia e descobertas, explorados com mais profundidade nas seções seguintes.

A coleta de dados numa revisão sistemática contempla critérios de inclusão/exclusão e avaliação de toda evidência científica publicada (73, 74, 75). As seções 2.3 e 2.4 descrevem os critérios usados para selecionar os estudos para avaliação qualitativa das descobertas relacionadas à questão de pesquisa pertinente nesse trabalho.

Figura 1 – Passos tomados na revisão sistemática usando a metodologia PRISMA



2.3 Critérios de inclusão

Para uma melhor análise e avaliação das evidências encontradas, critérios de inclusão foram definidos de modo a restringir os estudos aos objetivos inicialmente estabelecidos, descritos a seguir:

- Estudos retrospectivos e prospectivos
- Estudos comparativos entre indivíduos saudáveis e indivíduos com câncer (ou carcinoma ou neoplasia) colorretal ou intestino grosso (do cólon o do reto).

- Análise metabólica de fezes
- Análise metabólica das águas fecais
- Metabólica por Espectroscopia de Ressonância Nuclear Magnética
- Neoplasia (ou câncer) colorretal (ou do cólon e do reto)

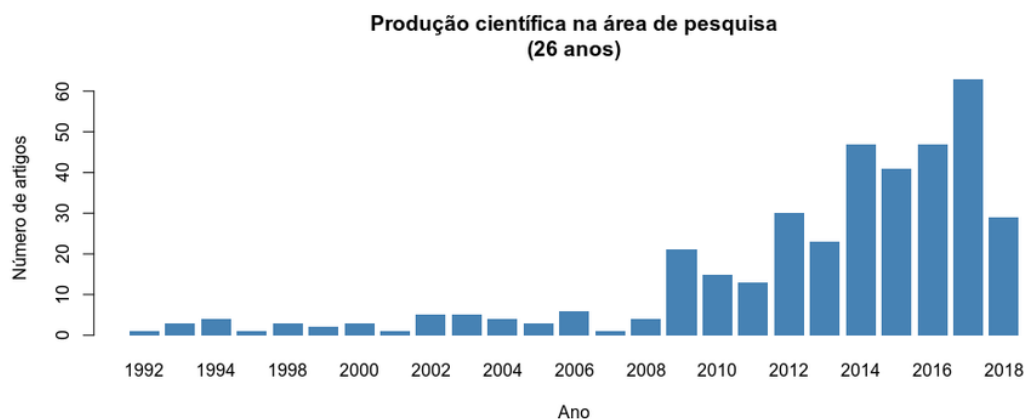
2.4 Critérios de Exclusão

- Literatura Cinza
- Estudos secundários (estudos de revisão)
- Artigo escrito em idioma não inglês
- Análise metabólica de sangue ou urina
- Espectrofotometria por cromatografia gasosa
- Espectrofotometria por cromatografia líquida
- Neoplasias (ou cânceres) que não sejam do cólon ou do reto

2.5 Meta-análise

A busca nas bases resultou num total de 386 artigos. Observe na figura 2 o crescente interesse da comunidade científica em relação ao tema. Claramente há um aumento nas publicações, sinalizando que novas técnicas para detecção de CCR têm sido cada vez mais estudadas na última década. Todos os dados extraídos dos estudos selecionados foram processados usando a linguagem de processamento de gráficos e estatística R com o auxílio do pacote *meta*.

Figura 2 – Evolução do interesse da comunidade científica em métodos de detecção de CRC



A aplicação dos critérios de inclusão/exclusão resultaram nos seguintes dados

para cada item definido nas seções 2.3 e 2.4. As figuras 3 e 4 demonstram que os critérios definidos proporcionaram um refinamento nos estudos, de forma que a proporção de estudos publicados que respondem diretamente a nossa pergunta de pesquisa é pequena.

Figura 3 – Fase Seleção - Número de artigos atendendo aos critérios de inclusão definidos anteriormente

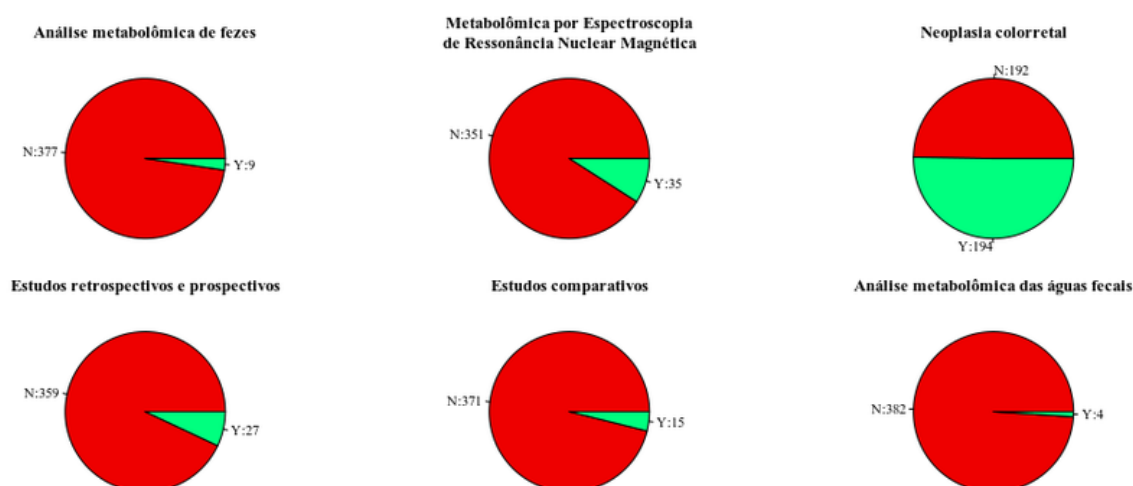
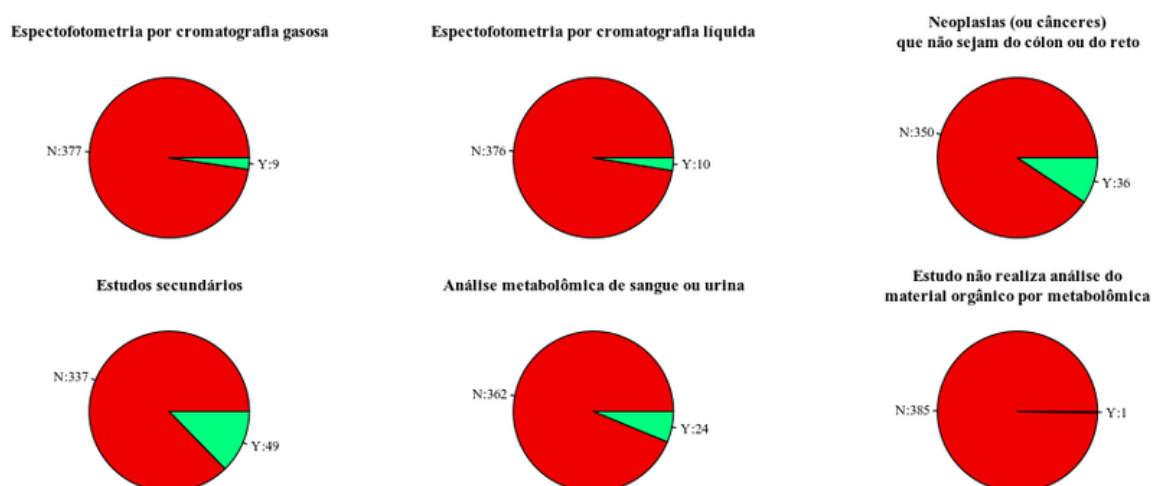


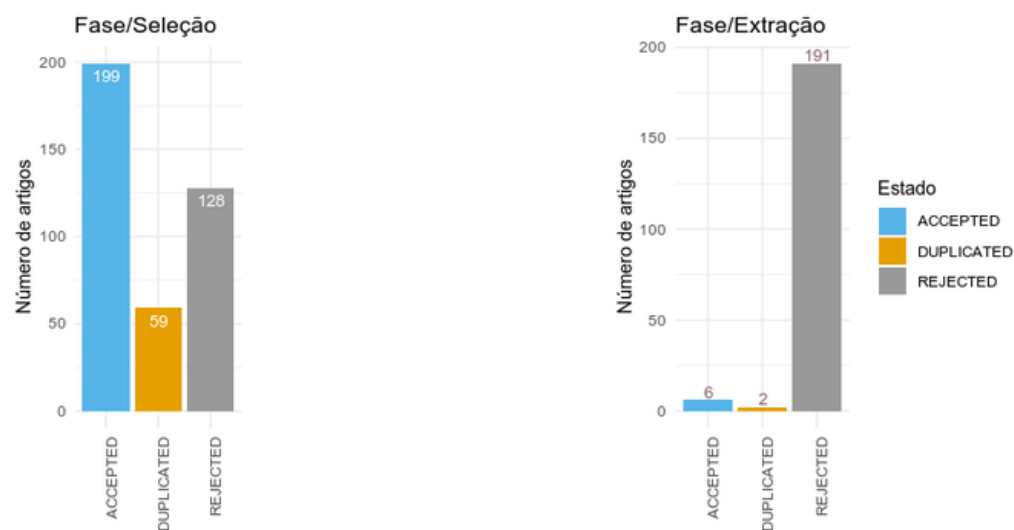
Figura 4 – Fase Seleção - Número de artigos atendendo aos critérios de exclusão definidos anteriormente



Observe na figura 5 o número de artigos a cada fase da revisão sistemática. De 386 artigos na fase de seleção foram excluídos 59 estudos duplicados. Lendo título e resumo, 128 estudos avaliados foram excluídos por atenderem a pelo menos um critério de exclusão, resultando na fase com 199 artigos a serem avaliados com mais profundidade na fase de extração. Na fase de extração, realizando uma análise no corpo

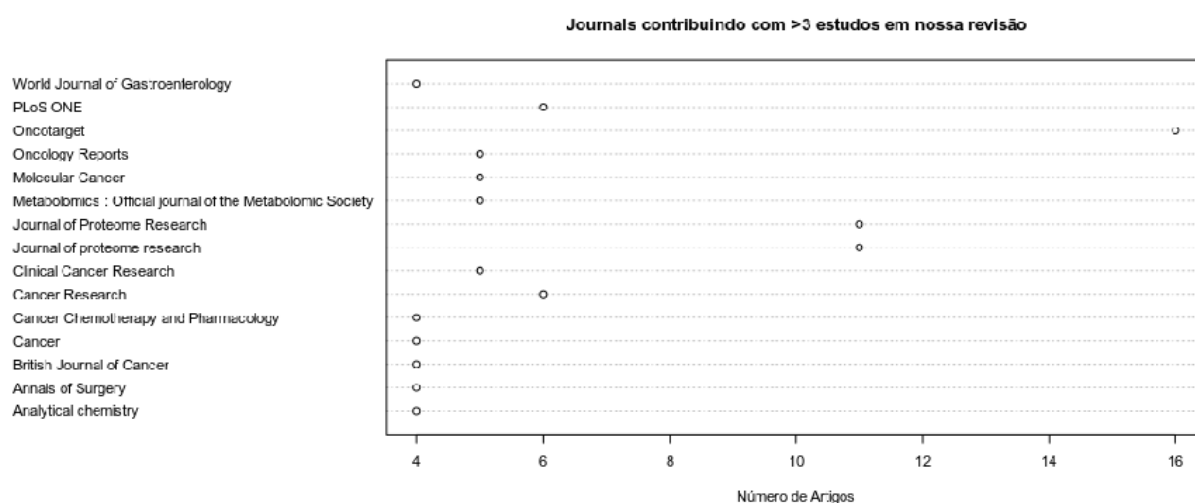
do texto, 191 estudos foram excluídos, 2 duplicados excluídos, 1 artigo não estava disponível para extração. Por conseguinte, apenas 5 artigos respondem concisamente à nossa pergunta de pesquisa.

Figura 5 – Número de artigos na fase de Seleção e na fase de Extração



Analisando os dados bibliométricos (76) obtivemos Journals com mais contribuições na nossa revisão em número de artigos, figura 6. *Journal of Proteome Research* forneceu 22 estudos, seguido do *Oncotarget* que forneceu 16 estudos, sinalizando que são as bases com maior preferência dos autores para publicação de pesquisas de técnicas de *screening* do CCR.

Figura 6 – emphJournals com mais contribuições em número de artigos



2.5.1 Síntese dos estudos selecionados

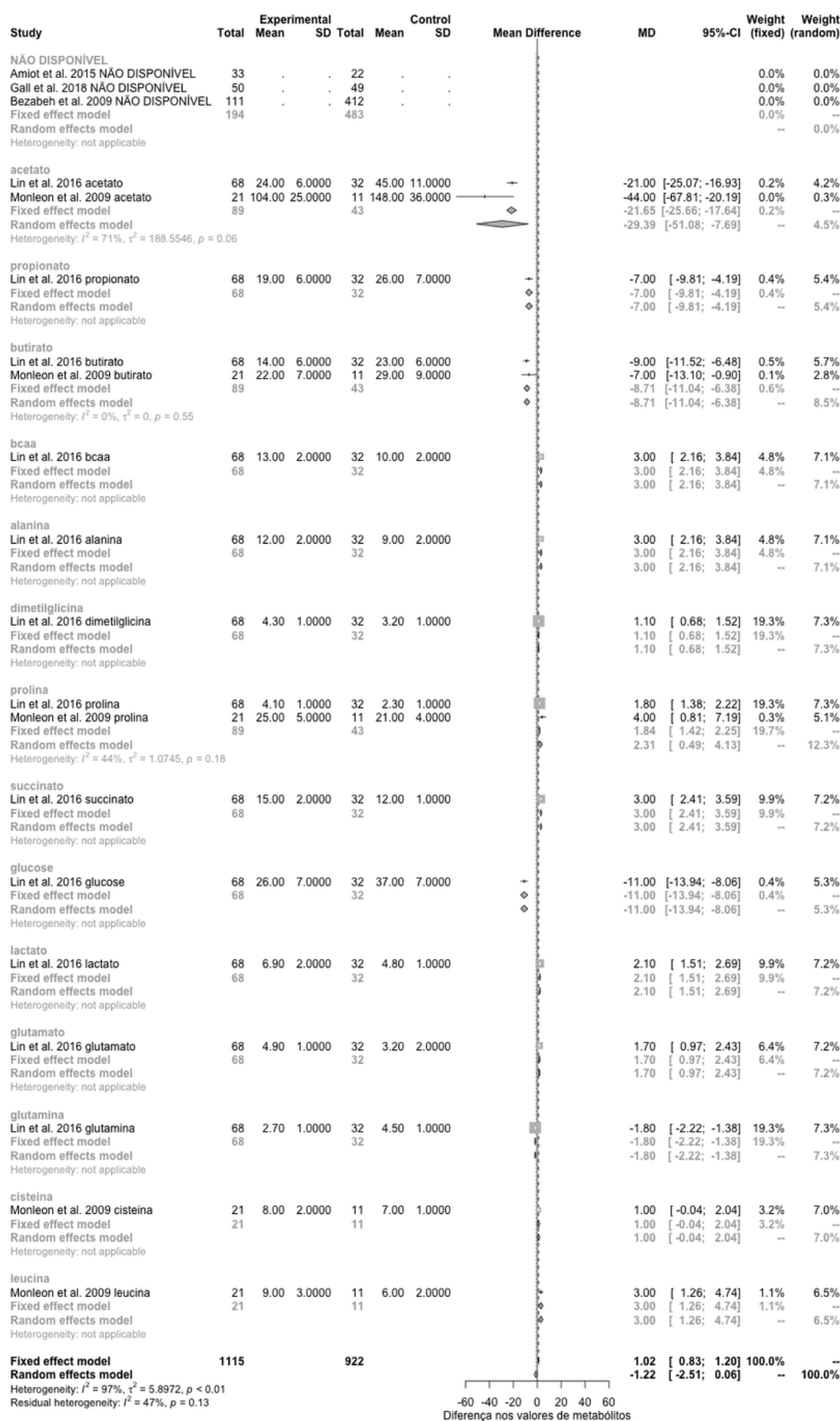
A tabela 1 mostra os estudos selecionados da revisão sistemática, dando ênfase nas técnicas usadas, especificidade e sensibilidade alcançadas com essas técnicas na população de interesse. Com exceção de Bezabeh et al. (62), todos os outros estudos utilizam PCA (Principal component analysis) para visualizar e destacar as diferenças dos GCs e pacientes com CCR.

Tabela 1 – Estudos selecionados - Análise de metabólitos em amostras fecais usando ERNM

Autor	Ano	População		AUC curva ROC IC95%		Técnica
		Controle	Câncer Colorretal	%Sensibilidade	%Especificidade	
Amiot et al. (77)	2015	22	33	84%	99%	PCA OPLS-DA SIMCA-P e MATLAB
Gall et al. (78)	2018	49	50	80%	70%	PCA PLS-DA 11-fold Cross Validation
(61)	2009	11	21			PCA MATLAB (LIBRA)
(40)	2016	32	68	77.61%	86.05%	PCA OPLS-DA
(62)	2009	412	111	85.2%	86.9%	GA_ORs(79) LDA(Linear Discriminant Analysis) e LOOCV(Leave-one-out Cross Validation)

Observe na figura 7 que os metabólitos acetato, propionato, butirato e glicose se apresentam em concentrações mais baixas nos pacientes com CCR em comparação com o grupo controle. Alguns estudos não disponibilizaram os dados dos metabólitos do grupo Controle e CCR, citando apenas como uma quantidade agregada. Por conseguinte, não foi possível realizar a meta-análise da diferença entre ambos. Estes artigos, sinalizados na figura 7, focaram análises quantitativas e qualitativas de bactérias que podem ter correlação com a origem do CCR. Num mundo ideal, os estudos reportam todos os dados de forma clara e concisa, onde os autores exploram e reportam a robustez da sua análise primária em relação aos resultados encontrados.

Figura 7 – Variação da concentração dos metabólitos nos grupos controlo e paciente nos 5 estudos selecionados

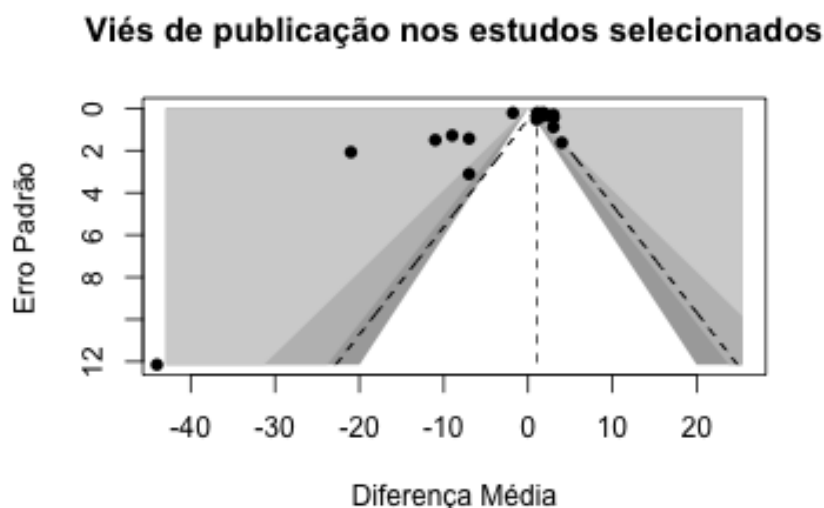


O gráfico funil de Begg ou Egger, na meta-análise, é usado para verificar a existência do viés de publicação, pois, geralmente estudos com amostras pequenas são mais susceptíveis à apresentarem uma variância muito alta em relação aos estudos com amostras maiores. Portanto, quando os dados dos estudos são confrontados com as variâncias de outros estudos, um funil simétrico deve ser formado quando o viés na publicações é mínimo ou praticamente nulo, caso contrário, não se observa o funil no gráfico.

Viés de publicação muitas vezes se refere ao viés de seleção, afetando diretamente as conclusões da revisão. Geralmente acontece quando as amostras selecionadas apresentam apenas dados positivos que beneficiam as crenças das partes interessadas.

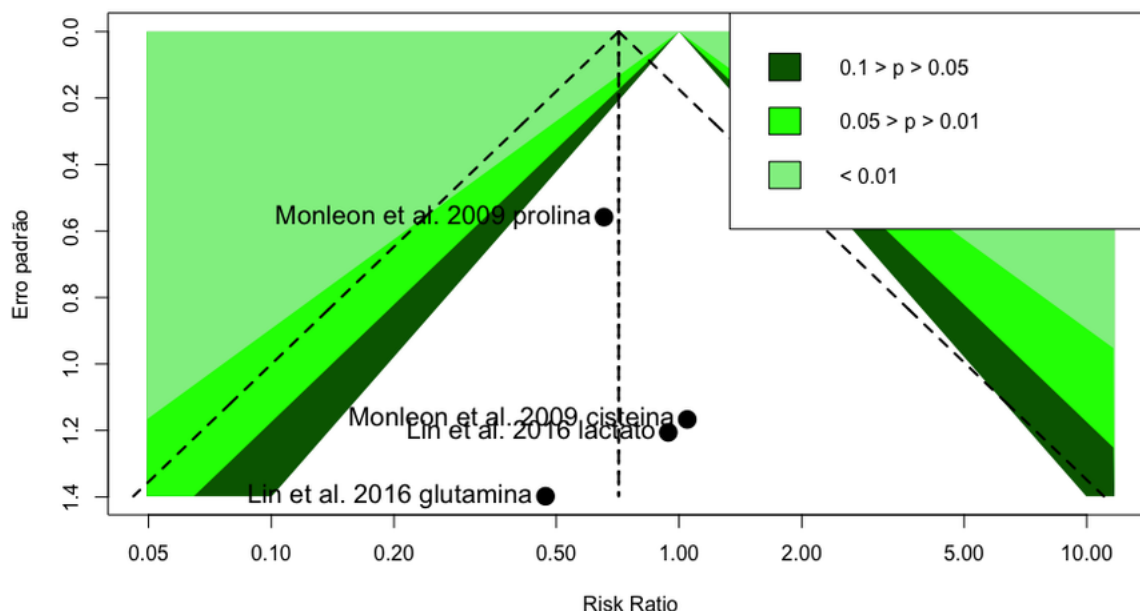
Na ausência de efeitos de estudos pequenos, os efeitos do tratamento de estudos grandes e pequenos se espalhariam em torno de um efeito comum de tratamento comum. Na figura 8 observamos alguma discrepância nos dados gerais, porém, nem todos os estudos disponibilizaram os dados dos metabólitos, motivo dessa discrepância, não obstante, no geral há um reduzido viés de publicação nos estudos selecionados.

Figura 8 – Funil de Begg dos estudos selecionados - variância dos metabólitos



Na figura 9 observamos a incidência dos metabólitos prolina, cisteína, lactato e glutamina como metabólitos com grandes concentrações em pacientes com CCR em relação ao grupo controle (cada área do gráfico mostra um limite de intervalo de confiança, sendo os mesmos 90%, 95% e 99%).

Figura 9 – Metabólitos que apresentam correlação com CCR nos estudos selecionados



2.5.1.1 Considerações sobre os estudos selecionados

Amiot et al. (77) realizaram uma análise dos metabólitos fecais usando ERNM e modelagem multivariada, descrevendo aumento de AGCC (valerato, acetato, propionato e butirato) e concentrações baixas de β -glicose, glutamina e glutamato em pacientes com CCR avançado. Os autores comparam, através da acurácia preditiva dos métodos diagnósticos, a maior capacidade da metabolômica de prever CCR em estádios avançados *versus* FOBT ou quantificação de metilação de gene Wif-1 (PCR). Análises de correlação evidenciaram fortes associações entre certos compostos e algumas bactérias. *Faecalibacterium prausnitzii* e *Clostridium leptum* estão correlacionadas com valerato e butirato enquanto que *Faecalibacterium prausnitzii* está inversamente relacionada com glicose. Os autores sugerem que o aumento do consumo de glicose (através da quebra de glicose em piruvato) por estas bactérias aumentam a produção de AGCC e que o butirato pode ter uma ação direta na carcinogênese colônica.

Le Gall et al. (78) apresentam resultados na metabolômica de amostras fecais de 50 pacientes portadores de CCR e 49 pacientes saudáveis. CCR é associado ao aumento nas concentrações fecais de AGCC, isovalerato, isobutirato com valerato e fenilacetato e redução nas taxas de aminoácidos, açúcares, metanol e ácidos biliares. Estes resultados sugerem alterações na microbiota intestinal, nas vilosidades intestinais e mucinas da mucosa colônica.

Monleon et al. (61) mostra que os metabólitos fecais apresentam um alto grau de

variabilidade provavelmente devido à: controle dietético inadequado dos pacientes, fatores ambientais e alterações no genoma. Monleon et al. ⁽⁶¹⁾ apresenta uma redução de acetato e butirato e aumento de leucina, prolina e cisteína nos pacientes com CCR frente ao GC. Segundo o autor, AGCC (particularmente butirato) podem ter um efeito protetor na mucosa colônica contra o CCR, efeito este de etiologia multifatorial ^(80, 81, 82).

Yan Lin et al. ⁽⁴⁰⁾ analisou o perfil metabólico de 68 pacientes com CCR no intuito de diferenciar o metaboloma por estadiamento clínico do tumor. O autor descreve uma redução progressiva na concentração de AGCC (butirato, acetato, propionato), glicose e glutamina nos pacientes com estadiamentos mais agressivos. Em contrapartida, com a piora do prognóstico, observa-se um aumento de aminoácidos, como: leucina, isoleucina, valina, alanina, dimetilglicina, prolina, succinato, lactato e glutamato. Sugere-se um aumento do consumo de AGCC pelas células tumorais e lesão celular colônica direta, culminando na malabsorção dos aminoácidos descritos. Também é aventada a hipótese da redução da glicose pelo consumo metabólico do tumor ocasionando maior produção e excreção de lactato, succinato e glutamato. Aumento na concentração de prolina, segundo o estudo, pode ser esclarecida por degradação de mucinas intestinais que recobrem o epitélio do cólon ⁽⁴⁰⁾.

Bezabeh et al. ⁽⁶²⁾ desenvolveu vários classificadores de metabólitos fecais mostrando que diferenças espectrais podem ser identificadas para detecção de CCR, obtendo uma sensibilidade média de 87,5% e especificidade média de 86,9%. No entanto, o autor não realiza a discriminação dos metabólitos em cada espectro na diferenciação entre pacientes do GC e com CCR.

2.6 Revisão geral da literatura

Após o coleta do biofluido deve-se ter cautela em relação à contaminação bacteriana ou o uso de aditivos ou conservantes químicos que possam alterar a análise dos espectros (glicerol, por exemplo). O armazenamento sob temperatura de -80 °C é sugerido para não promover alterações nas concentrações metabólicas ⁽⁸³⁾. Em seguida, seleciona-se o tipo de abordagem para análise dos metabólitos. Atualmente, são citados na literatura dois tipos: 1) perfil metabólico global e 2) perfil metabólico direcionado. O primeiro destina-se a análise de todos os metabólitos de uma amostra ⁽⁸⁴⁾. O segundo é uma análise mais elaborada para avaliação de determinada classe de metabólitos (lipídeos, por exemplo) a partir de inúmeras técnicas ⁽⁸⁵⁾.

PCA não é uma técnica de classificação, mas sim uma técnica de *clustering* (agrupamento) não-supervisionada, recentemente relacionada ao *k-means clustering* ⁽⁸⁶⁾. PCA pode ser utilizada através de inúmeros softwares, como o MATLAB

ou R usando seus comandos *prcomp* ou *princomp*. No entanto, softwares com maior poder de resolução gráfica e interfaces diferenciadas também são comercializados, como, por exemplo, o pacote UMETRICS (SIMCA-P). PCA permite traçar, visualizar e agrupar facilmente múltiplos conjuntos de dados metabômicos baseados em combinações lineares de seus recursos compartilhados. Para otimizar a análise estatística, utiliza-se atualmente uma técnica de caráter supervisionado: *orthogonal partial least squares-discriminant analysis* (OPLS-DA) ⁽⁶³⁾⁽⁹⁾.

Ácidos Graxos de Cadeia Curta (AGCC) apresentam cauda alifática constituída por esqueleto de 2 a 6 carbonos e são produzidos por fermentação de fibra dietética pelas bactérias do cólon. Os principais AGCC são: butirato, proprionato e acetato. A fermentação dos carboidratos que ocorre nas bactérias do cólon envolvem diversas reações metabólicas ⁽⁵⁰⁾. A maioria das bactérias usa a via glicolítica para a fermentação mas, dependendo do carboidrato, também podem haver bactérias que usam a via das pentoses ⁽⁵⁰⁾. Um dos produtos que se forma, como resultado destas vias, é o piruvato que, dependendo da bactéria, irá formar produtos dos quais se destacam o acetato, o proprionato e o butirato ^{(51) (50)}. A fermentação ocorre, na sua maior parte, no cólon ascendente, sendo os AGCC transportados para o cólon descendente pelo trânsito intestinal. A concentração e absorção de AGCC ao longo do intestino diminui com a proximidade do retossigmóide (local com maior incidência de CCR) ⁽⁵⁰⁾⁽⁵²⁾. AGCC apresentam importante papel anticarcinogênico no CCR através da redução da inflamação do colonócito e apoptose de células cancerígenas via atividade da p21 ⁽⁵³⁾.

A metabolômica para diagnóstico precoce do CCR têm base multifatorial. Os compostos orgânicos finais do metabolismo deste tumor são produtos de reações genéticas, dieta, exposição ambiental e alterações na microflora intestinal ^(15, 29, 17, 54). A literatura, porém, é discordante sobre quais perfis metabólicos podem ser encontrados a depender do método utilizado. Phua et al. ⁽⁵⁵⁾, através de CG-EM, realizou a análise de 11 pacientes portadores de CCR e 10 pacientes saudáveis. O autor encontrou níveis reduzidos de frutose, ácido linoléico e ácido nicotínico na análise metabolômica das fezes em comparação ao grupo controle. Walker et al. ⁽⁵⁶⁾ reproduziram os achados de Phua et al. com CG-EM, demonstrando concentrações reduzidas de ácido linoléico, frutose e ácido nicotínico. Montrose et al. ⁽⁵⁷⁾ obtiveram resultados de três matrizes de amostras de ratos com CCR induzidos por azoximetano (fezes, sangue e biópsia do tumor) as quais foram analisadas por CG-EM e CL-EM. Nos ratos com CCR foi identificado diminuição nas concentrações de dipeptídeos e aumento de aminoácidos, gama-glutamil e sarcosina. Goedert et al. ⁽⁵⁸⁾ realizaram estudo tipo caso-controle com 48 pacientes com CCR e 102 controles. Utilizando CG-EM e CL-EM verificaram aumento na correlação de CCR com níveis aumentado de triptofano, glicina e sitostanol. Brown et al. ⁽⁵⁹⁾ efetivaram o perfil metabólico da peça cirúrgica de CCR, margem de segurança de mucosa intestinal de 10 cm e fezes. Mediante CG-EM e CL-EM foram

separados 728 compostos de 17 indivíduos com CCR (anátomo-patológico e fezes). De 500 metabólitos descritos na literatura nas fezes, apenas 215 foram identificados nas peças cirúrgicas. Apenas 19 compostos foram isolados tanto nos cólons ressecados quanto nas margens de segurança e somente 7 foram encontrados nas três matrizes.

Sob utilização de ERNM, em indivíduos com CCR, foi encontrado um aumento na concentração de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) como valerato, propionato, butirato e acetato e redução nas concentrações de β -glicose, glutamato e glutamina (55). Estudo efetuou a análise de 68 pacientes com CCR através de ERNM (87). Acetato, butirato, propionato, glicose e glutamina encontraram-se reduzidos comparados com os pacientes controles. Lin et al.(63) descreveram aumento nos sinais de ERNM de butirato, acetato, propionato, glicose e glutamina e redução de lactato, glutamato e succinato nas fezes de indivíduos com CCR. Bertini et al.(88) efetuaram a análise sérica de pacientes com metástases de CCR na tentativa de indicar metabólitos que poderiam predizer agressividade tumoral. Baixas concentrações de creatina, lipídeo (-C=C-CH₂-C=C-), lipídeo (-CH=CH-) e valina associadas a altas concentrações de lipídeo (-CH₂-OCOR) e sinal N-acetil de glicoproteínas estão relacionadas com CCR metastáticos.

As concentrações de butirato em pacientes com CCR são discutidas. Foi relatada um aumento nas concentrações de butirato em pacientes com CCR com correlação positiva a bactérias produtoras deste AGCC: *Clostridium leptum* phyla e *Faecalibacterium prausnitzii* genus. Foi demonstrado que butirato pode modular a expressão de diversos genes envolvidos no ciclo celular e apoptose e, em menor extensão inflamação (80, 81, 82). Baseado nesta teoria de proteção da mucosa do cólon pelo butirato foi descrito reduções dos níveis de butirato demonstrados por ERNM em pacientes portadores de doença inflamatória intestinal e doenças metabólicas (diabetes mellitus tipo II e obesidade) . Logo, os resultados sobre butirato são controversos: hipótese de que este SCFA pode possuir um efeito antiproliferativo e protetor contra o CCR (89) como também um efeito carcinogênico (80).

3 Materiais e Métodos

Duas metodologias são descritas para análise metabolômica: metabolômica quimiométrica ou não-quantitativa e metabolômica quantitativa. Na quimiométrica são identificados inicialmente os padrões e intensidade dos espectros e logo após realizada o armazenamento dos dados, análise estatística, agrupamento ou correlação e, por fim, identificação de fenótipos e conclusões (20). Na metabolômica quantitativa os compostos são inicialmente identificados e quantificados e a lista de resultados é utilizada para fenotipagem e conclusões (7, 21).

3.1 – Pacientes

87 (oitenta e sete) pacientes foram alocados da seguinte forma: 60 pacientes para grupo controle (GC) e 27 pacientes com CCR.

Os pacientes do GC atenderam todas as exigências de inclusão: indivíduos sem histórico de doença gastrointestinal; antecedentes negativos para carcinoma gastrointestinal; ausência de histórico de cirurgias do aparelho digestivo.

Os pacientes com CCR foram selecionados no ambulatório de coloproctologia do Hospital Universitário Prof. Alberto Antunes (HUPAA). Todos os pacientes apresentavam diagnóstico prévio de carcinoma colorretal mediante biópsia dirigida por videocolonoscopia.

Entretanto, após a análise supervisionada dos dados dos metabólitos através de técnica supervisionada (OPLS-DA), o software SIMCA (umetrics.com) retirou 49 indivíduos do GC e 22 com CCR. OPLS-DA é utilizada na tentativa de otimizar ao máximo a acurácia do método e otimizar os resultados obtidos.

O perfil epidemiológico dos pacientes do GC é descrito na tabela 2 :

Tabela 2 – Perfil Epidemiológico Grupo Controle

Sexo (N)	Masculino: 6 ; Feminino: 5
Idade	30 - 62 anos
Análise Histopatológica	Pacientes sem histórico de doença gastrointestinal

O perfil epidemiológico dos pacientes com CCR é descrito na tabela 3. Cada paciente foi enumerado para análise em separado na figura 10 e 11 (análise por PCA e OPLS-DA).

Tabela 3 – Perfil Epidemiológico CCR

Paciente	Sexo	Idade	Localização do Câncer	Operação prévia?	Radioterapia?	Quimioterapia?	Exame Histopatológico e Estadiamento
1	F	62	Cólon Sigmóide	Sim	Não	Não	Adenocarcinoma de Cólon pT2
2	F	51	Reto	Não	Sim	Não	Adenocarcinoma de reto inferior pT3
3	M	42	Cólon Descendente	Sim	Não	Não	Adenocarcinoma de cólon bem diferenciado pT3N1bMx
4	F	71	Reto	Não	Não	Não	Adenoma viloso com área focal de transformação carcinomatosa. Fragmentos teciduais com necrose isquêmica.
5	F	60	Cólon Transverso	Não	Não	Não	Adenocarcinoma de cólon moderadamente diferenciado. pT2NxMx

3.2 – Metabolômica:

Cerca de 5g de fezes adicionadas de 10mL de água bidestilada e deionizada foram homogeneizadas em alta velocidade em homogeneizador por 45s. As soluções foram submetidas a dois ciclos de congelamento/descongelamento para proporcionar a ruptura da membrana celular e liberar os metabolitos citoplasmáticos. Finalmente, as amostras foram centrifugadas a 10krpm por 15min a 48oC, e os sobrenadantes coletados em tubos eppendorffs e guardados a -80oC até o dia da análise por RNM-H. Tubos eppendorffs contendo 300µl de águas fecais foram adicionados de 300µL de tampão fosfato (1.5 mM KH₂PO₄, 2 Mm NaN₃, 1mM 3-(trimetilsilil)propionato-d₄) de sódio em óxido de deutério (D₂O), e agitados em vortex e centrifugado a 10.000 rpm for 1 min. As amostras dos extratos fecais foram transferidas para tubos de RMN de 5 mm de diâmetro externo para análises.

3.3 - Obtenção dos espectros de RNM de H:

Os espectros de RNM de H foram obtidos em um espectrômetro de 600 MHz (Bruker Avance) ajustado a um probe de 5 mm TXI e um carretel para 60 amostras BACS autosampler (Bruker, Rheinstetten, Germany). A temperatura fora controlada a 22°C. Cada espectro consistiu de 256 escanes e os dados foram registrados em data pontos de 32K, com largura espectral de 14 ppm e tempo de aquisição de 1.95 s. A sequência de pulsos para a pré-saturação padrão para obtenção de espectros unidimensionais fora utilizadas para suprimir o sinal de água residual através de irradiação na frequência da água durante reciclo de 2 s e tempo de mistura de 0.15 s. Um pulso de 90° e de 8.8 μ foi ajustado para todos as amostras depois da otimização da intensidade do sinal na amostra representativa. Os espectros foram registrados com largura de banda de 0.3 Hz, a fase foi ajustada manualmente, e a linha base foi corrigida utilizando o software TOPSPIN 2.0. Os metabolitos foram identificados de acordo com dados da literatura 17-19, e na rede Human Metabolome Database, <http://hmdb.ca>, e pelo uso de Métodos de Espectroscopia de Correlação Estatística (STOCSY) através do software SIMCA (<https://umetrics.com/>).

4 Resultados e Discussão

4.1 Resultados

Os resultados encontrados foram analisados inicialmente pela técnica do PCA e *a posteriori* através de OPLS-DA. Desde a análise por intermédio do PCA já foi encontrada uma diferença nas vias metabólicas. Após análise supervisionada por OPLS-DA esta diferença tornou-se mais evidente, impulsionando o decréscimo de grande parte das vias metabólicas dos pacientes com CCR em relação ao grupo controle (figuras 10 e 11).

Figura 10 – Análise PCA Controle x CCR

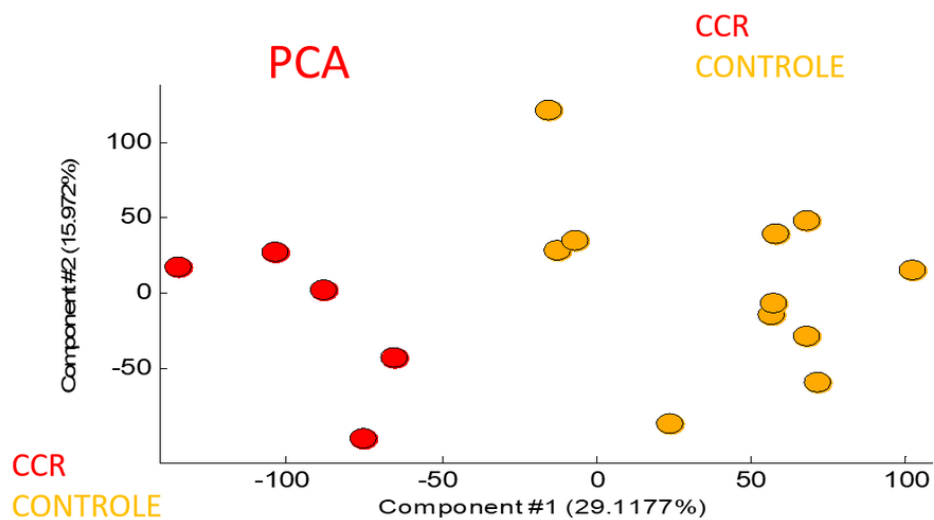
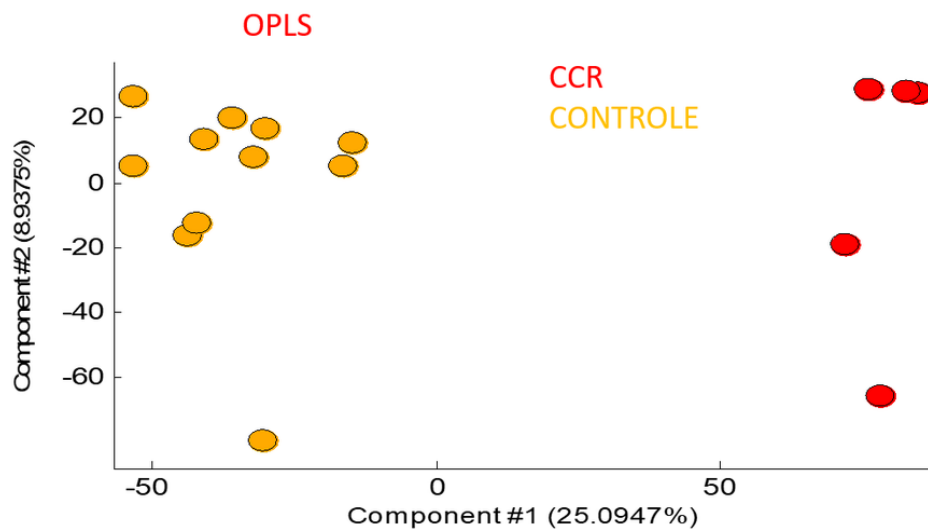
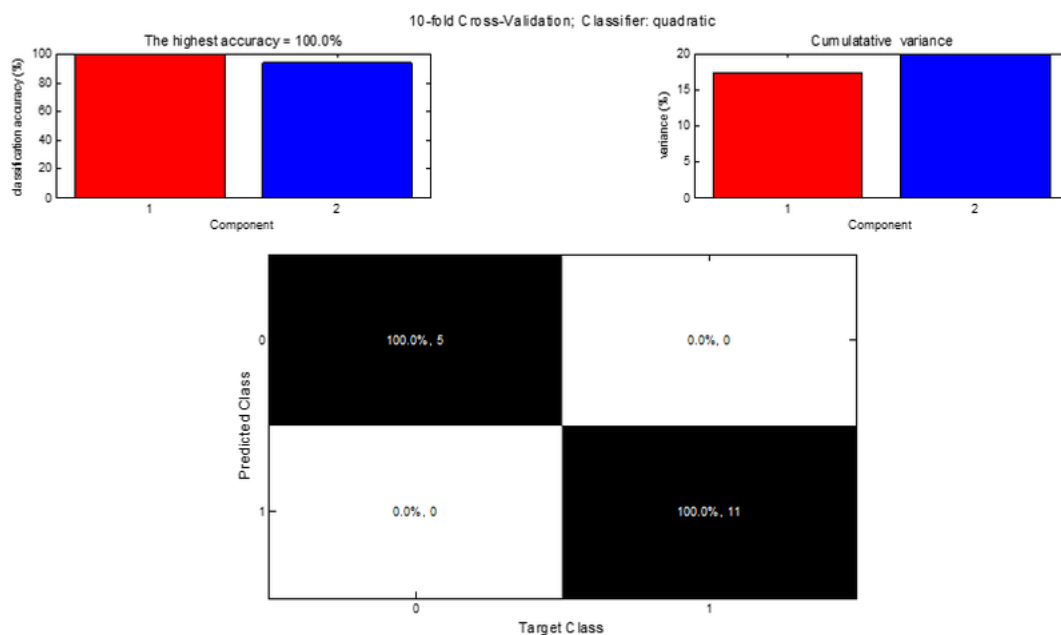


Figura 11 – Análise OPLS-DA Controle x CCR



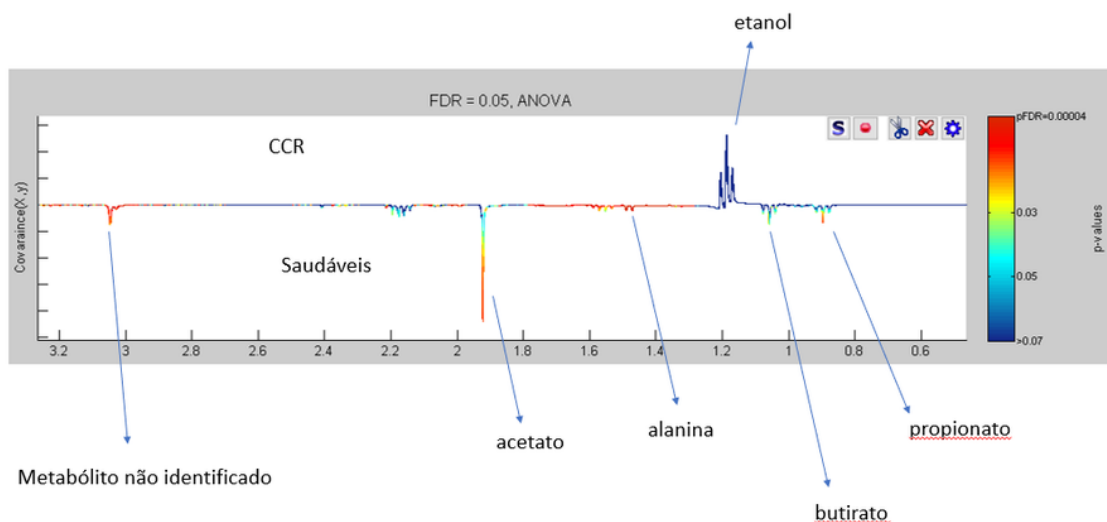
Através da validação cruzada Grupo controle *versus* CCR, obteve-se 100% de acurácia entre os grupos, conforme demonstrado na figura 12.

Figura 12 – Prova de validação cruzada Controle x CCR



Mediante a análise metabolômica das águas fecais de indivíduos saudáveis *versus* pacientes com CCR, encontrou-se uma redução ($p < 0,005$ ANOVA) dos seguintes metabólitos no grupo CCR: propionato, butirato, acetato, alanina, glicina, creatina e creatinina (de acordo com a figura 13). Um aumento sem inferência estatística do etanol nos pacientes com CCR foi encontrado frente ao grupo controle.

Figura 13 – Perfil metabólico CCR X Controle



Os resultados de cada metabólito foram analisados em separado e organizados através de diagramas de caixa, conforme exposto a seguir:

Figura 14 – Perfil do Propionato CCR x Controle

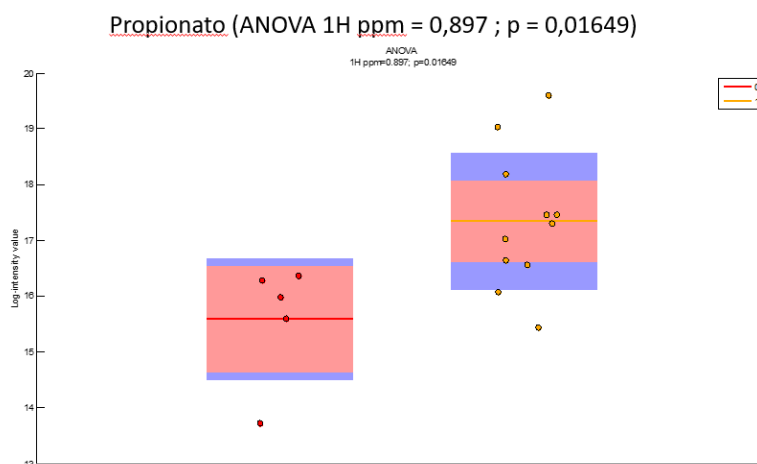


Figura 15 – Perfil do Butirato CCR x Controle

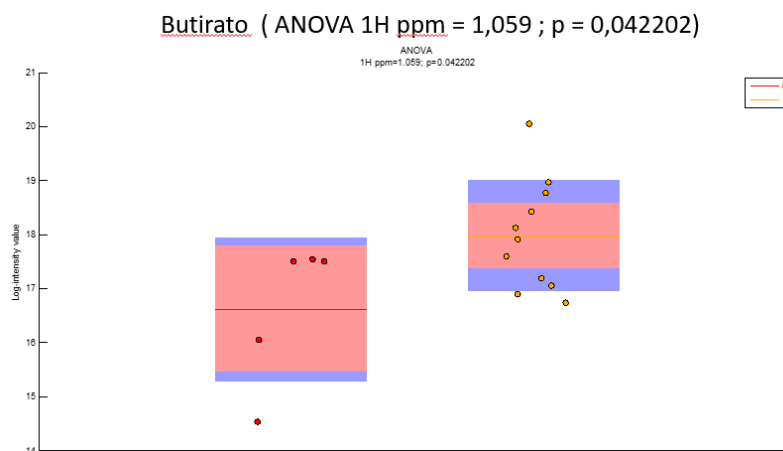


Figura 16 – Perfil do Acetato CCR x Controle

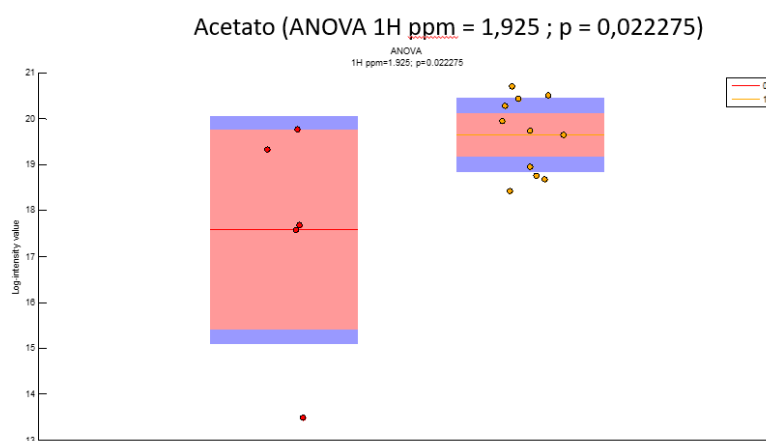


Figura 17 – Perfil da Alanina CCR x Controle

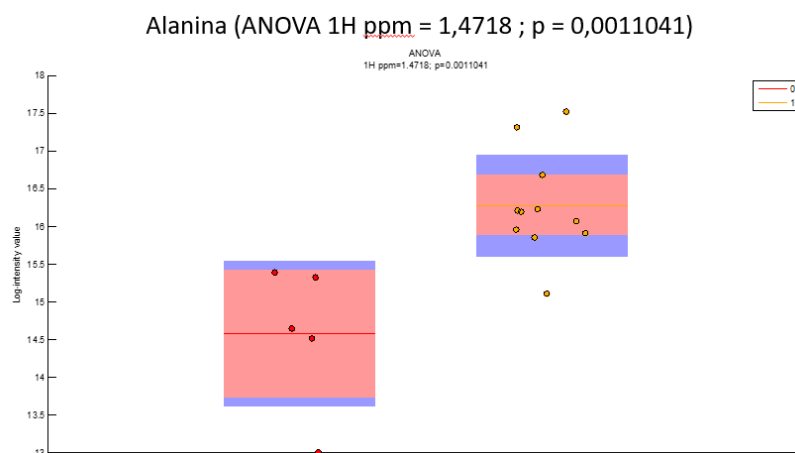


Figura 18 – Perfil metabólico da Glicina CCR x Controle

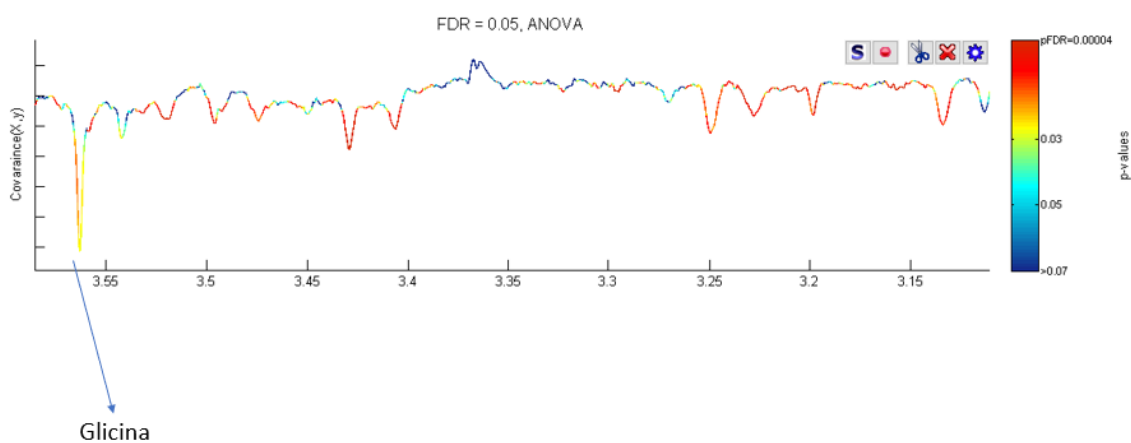


Figura 19 – Perfil da Glicina CCR x Controle

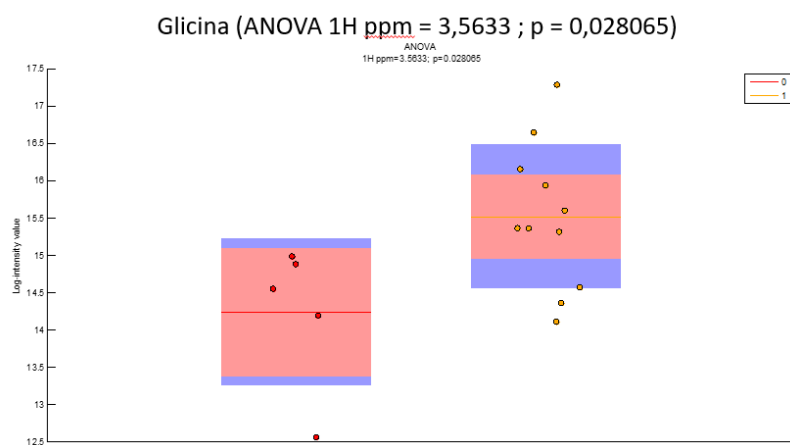


Figura 20 – Perfil Metabólico da Creatinina e Creatina CCR X Controle

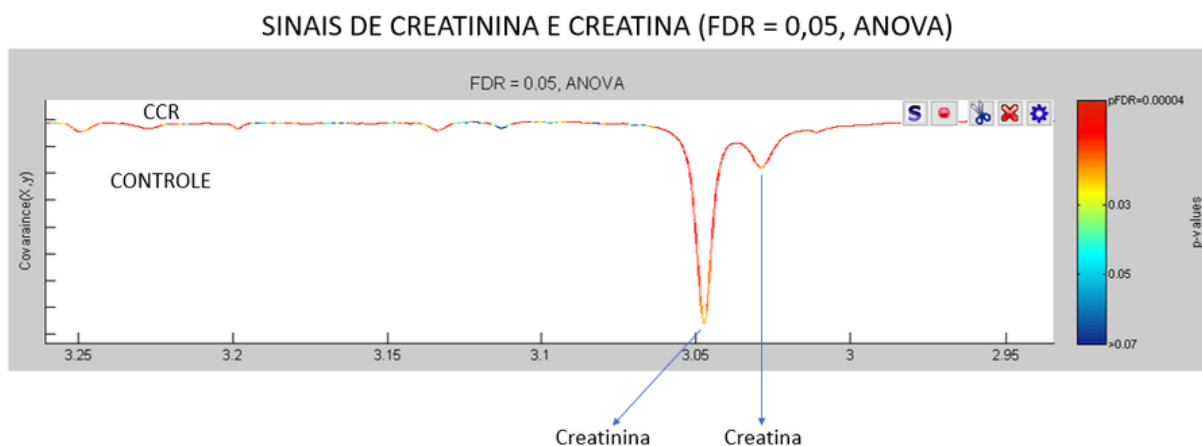


Figura 21 – Perfil da Creatinina CCR X Controle

Perfil da Creatinina CCR X Controle (ANOVA 1H ppm = 3,047 ; p = 0,021272)

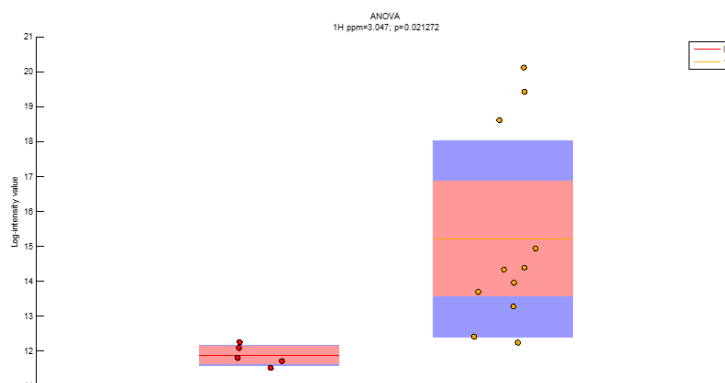
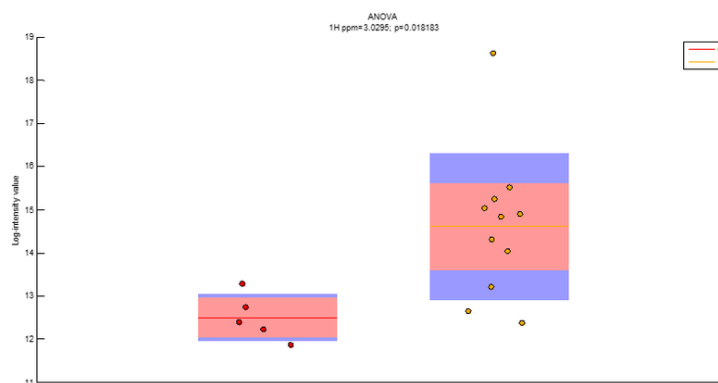


Figura 22 – Perfil da Creatina CCR X Controle

Perfil da Creatina CCR X Controle (ANOVA 1H ppm = 3,0295 ; p = 0,018183)



Dois metabólitos desconhecidos na literatura foram encontrados nas escalas de espectros. Fora realizada uma pesquisa exaustiva e os mesmos não foram identificados. Estes metabólitos encontram-se aumentados de forma significativa (ANOVA, $P < 0,005$) nos pacientes com CCR. As tabelas abaixo ilustram este achado.

Figura 23 – Perfil dos metabólitos desconhecidos

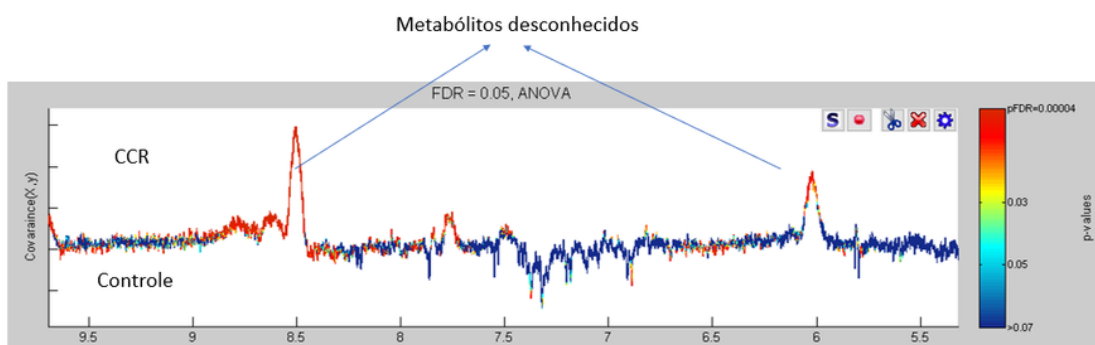


Figura 24 – Perfil do metabólito em 1H ppm = 8,5072

Perfil do metabólito desconhecidos em 1H ppm = 8,5072 ; ANOVA, $p = 0,00012959$)

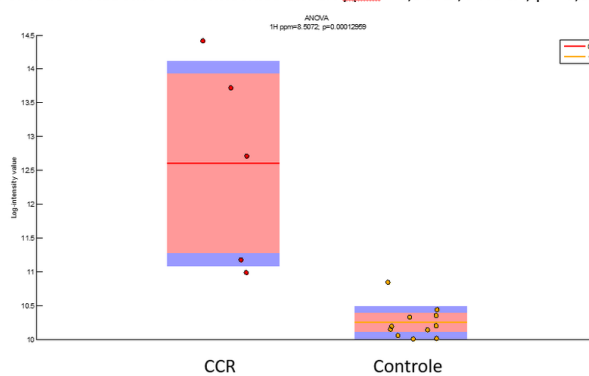
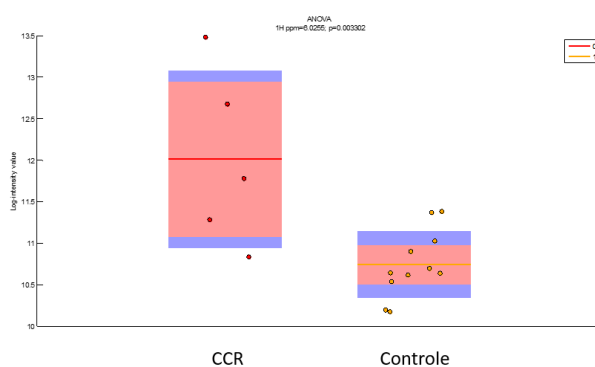


Figura 25 – Perfil do metabólito em 1H ppm = 6,0255

Perfil do metabólito desconhecidos em 1H ppm = 6,0255 ; ANOVA, $p = 0,003302$)



Em nosso estudo, o único metabólito que encontrou-se aumentado nos indivíduos com CCR foi o etanol. Entretanto, este aumento não foi estatisticamente significativo frente ao grupo controle ($P > 0,05$), conforme figura abaixo.

Figura 26 – Perfil Metabólico do Etanol CCR x Controle

Perfil do Etanol CCR X Controle (ANOVA 1H ppm = 1,2 ; $p > 0,05$)

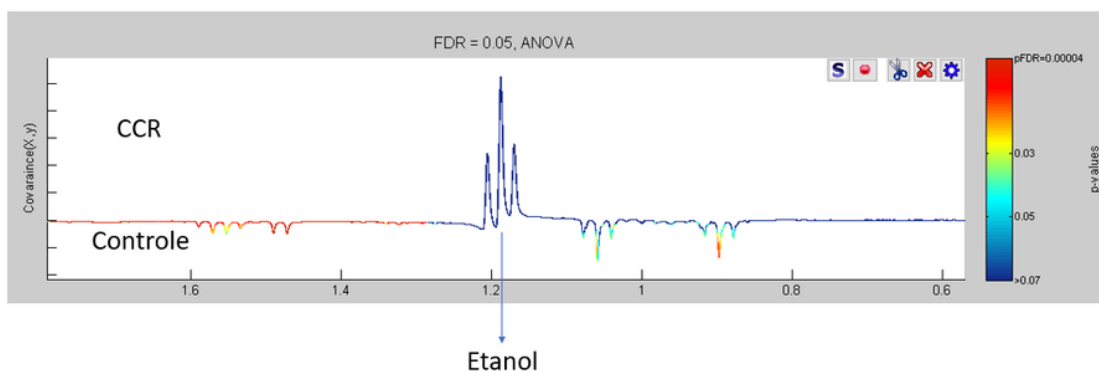
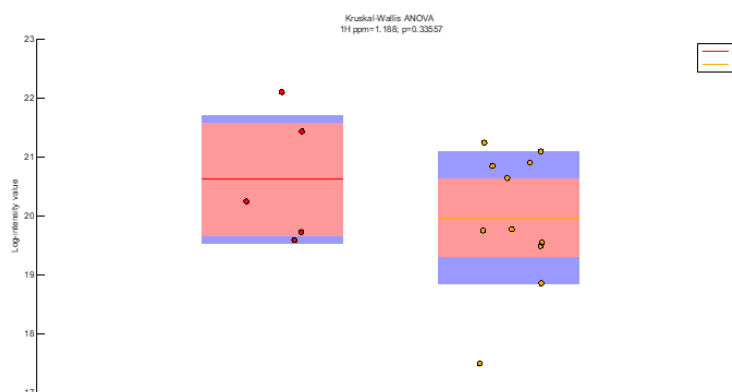


Figura 27 – Perfil do Etanol CCR X Controle

ETANOL (ANOVA 1H ppm = 1,188; $p = 0,33557$)



4.2 Discussão

Dados na literatura para suporte do uso, em *screening* do CCR, de ERNM por análise de material fecal são promissores (61, 62). A preferência no uso de material fecal para rastreamento de CCR pode ser justificada. Segundo Rowland et al. (10), as fezes podem ser capazes de demonstrar um perfil ideal da saúde do intestino grosso,

composição da microbiota colônica e estado inflamatório atual do cólon. Segundo Martn et al. ^(16,17), o estudo metabolômico de material fecal tem provado ter maior efetividade visto à proximidade com a mucosa do intestino grosso e por ser produto direto de interações entre compostos da dieta e microbiota intestinal.

O aumento da agressividade da celularidade tumoral é fator de mudança no perfil metabólico nas fezes de indivíduos com CCR. O aumento do estágio TNM de CCR leva a diminuição progressiva dos níveis de acetato, butirato, propionato, glicose e glutamina. Destes, acetato (1.92 ppm) e succinato (2.41 ppm) contiveram maior sensibilidade, especificidade e acurácia na distinção de estágios iniciais de CCR frente ao grupo controle ⁽⁸⁷⁾. Em contrapartida, foi encontrado aumento da concentração de succinato, prolina, alanina, dimetiglicina, valina, glutamato, leucina, isoleucina e lactato nos pacientes com CCR.

De acordo com nossos dados, não houve uma diferença inerente ao grau de estadiamento TNM e os metabólitos avaliados. De acordo com a tabela 3, os graus de estadiamento TNM identificados (T2 a T3) não apresentaram diferenças nas vias metabólicas isoladas. Vale salientar que, através da análise estatística supervisionada (OPLS-DA), o N do grupo controle e CCR reduziu consideravelmente. Ressalta-se que através desta metodologia estatística é possível alcançar valores consideráveis de acurácia do método e, traçar assim, um perfil metabolômico (*fingerprint*) ideal de pacientes sadios e com CCR ⁽⁷⁷⁾.

Porém, há uma discrepância na bibliografia coletada inerente à redução ou aumento de AGCC e aminoácidos em pacientes com CCR *versus* sadios ^{(63) (55) (4)}. Na RSL realizada neste estudo os resultados foram controversos. Amiot et al. ⁽⁷⁷⁾ através ERNM e modelagem multivariada descreveram aumento de AGCC (valerato, acetato, propionato e butirato) e concentrações baixas de β -glicose, glutamina e glutamato em pacientes com CCR avançado. Aumento de AGCC também foi exposto por Gall et al. ⁽⁷⁸⁾ cujos indivíduos com CCR são associados ao aumento nas concentrações fecais de AGCC, isovalerato, isobutirato com valerato e fenilacetato e redução nas taxas de aminoácidos, açúcares, metanol e ácidos biliares. Inúmeras hipóteses são formuladas para o aumento dos AGCC no CCR: 1) o aumento do consumo de glicose (através da quebra de glicose em piruvato) por bactérias (como *Faecalibacterium prausnitzii* e *Clostridium leptum*) aumentam a produção de AGCC; 2) o butirato pode ter uma ação direta na carcinogênese colônica ⁽⁸⁰⁾.

Todavia, a redução de AGCC no CCR é citada por Monleon et al. ⁽⁶¹⁾ e Yan Lin et al. ⁽⁴⁰⁾. De acordo com os autores, AGCC (particularmente butirato) podem ter um efeito protetor na mucosa do cólon contra o CCR ^(80, 81, 82). Em nosso estudo, as concentrações de acetato, propionato e butirato em pacientes com carcinoma colorretal foram estatisticamente inferiores em relação ao GC (ANOVA $P < 0,05$, conforme a

figura 13), alinhando nossos dados com alguns estudos selecionados por RSL. A redução de creatina no CCR está em conformidade com dados do artigo descrito por Bertini et al. ⁽⁸⁷⁾, relacionando baixas concentrações de creatina, lipídeo (-C=C-CH₂-C=C-), e valina com CCR metastáticos.

A utilização de ERNM vai além da identificação dos AGCC como preditores para o CCR. Inúmeros aminoácidos são citados na literatura ⁽⁴⁾. O desenvolvimento do câncer é acompanhado por mudanças metabólicas que são requisitos para a gênese tumoral, como síntese nucleotídica e protéica. A glutamina é aminoácido mais abundante e a principal fonte de nitrogênio do corpo humano, sendo muito utilizada em inúmeras vias biossintéticas e energéticas. Foi descrita uma redução na glutamina e glutamato em pacientes com CCR em análise por ERNM em comparação ao grupo controle sugerindo o uso destes aminoácidos na cascata energética de células tumorais ⁽⁴⁾. Yan Lin et al. ⁽⁴⁰⁾ também cita reduzidos níveis de succinato, prolina, alanina, dimetilglicina, valina, glutamato, leucina, isoleucina e lactato aumentados em pacientes com CCR. Contudo, Chan et al. e Qiu et al. ^(90,91) descrevem o aumento da quantidade de aminoácidos no tecido tumoral comparados com a mucosa normal do intestino grosso.

O aumento da concentração fecal de aminoácidos nas fezes de pacientes com CCR também pode ser explicado em estudos de Trinchieri et al ⁽⁹⁰⁾ e Lin et al ⁽⁴⁰⁾. Aumento de leucina, isoleucina, valina, alanina e dimetil-glicina podem ser explicados pela malabsorção de nutrientes pela lesão inflamatória tumoral das células colônicas.

No tocante a análise dos aminoácidos isolados em nosso estudo, alanina e glicina expressaram valores inferiores nos indivíduos com CCR comparados ao GC (ANOVA $P < 0,05$, conforme a figura 13). Dados da RSL também são divergentes quanto à elevação ou redução destes compostos orgânicos nas fezes de pacientes com CCR. Estes resultados sugerem: 1) alterações na microbiota intestinal; 2) lesão direta nas vilosidades intestinais por células tumorais; 3) déficit das mucinas da mucosa colônica por alterações metabólicas do CCR; 4) aumento da degradação de compostos orgânicos no cólon condicionados por mudanças expressivas na microflora intestinal; 5) uso de glutamato e glutamina como fonte energética da cascata tumoral ^(77, 40).

A maior parte das bactérias orgânicas humanas são representadas por duas filas: *Firmicutes* e *Bacteroidetes* ⁽⁹⁰⁾. A disbiose da mucosa do intestino grosso é preditora de carcinogênese através de: inflamação crônica, resposta imunológica, alteração na dinâmica de células-tronco e também biosíntese de metabólitos genotóxicos e tóxicos ⁽⁹¹⁾. Tsilimigras et al. ⁽⁹¹⁾, em artigo de revisão, descrevem aumento de *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*), *Escherichia coli* (*E. coli*), *Bacteriodes fragilis* e *Enterococcus faecalis* nos pacientes com CCR. Porém, houve redução na quantidade

de *Cloristidiales*, *Faecalibacterium*, *Blautia* e *Bifidobacterium*. Segundo Balamurugan et al. ⁽⁹²⁾ e Wang et al. ⁽⁵⁴⁾, nos paciente com CCR foi encontrada uma redução na quantidade de *Eubacterium rectale* e um aumento na quantidade de *Enterococcus*. Goedert et al. ⁽⁵⁸⁾ detectaram aumento na concentração de glicina-triptofano em pacientes com CRC, correlacionando este aminoácido na participação da mutagênese da enterobactéria *Salmonella typhimurium*. Hester et al. ⁽⁹²⁾ demonstraram aumento na concentração de *Firmicutes* e *Bacteriodes* e redução na concentração de acetato e butirato nas fezes.

Cada enterobactéria age de uma forma singular na mutagênese das células do epitélio colônico. DNA de *F. nucleatum* foi isolado em tecido tumoral colônico e linfonodos metastáticos e também relacionado com piora na sobrevida dos pacientes com CCR ^(93, 94). *F. nucleatum* foi encontrado em abundância em amostras fecais de indivíduos com adenomas e adenocarcinomas ⁽⁹⁵⁾. *E. coli* apresenta relação direta com a Doença de Crohn e CCR por meio do processo inflamatório crônico induzido por este microrganismo.

Em nossos pacientes com CCR, um aumento da concentração de etanol é descrita (ANOVA, P= 0,33). Processos fermentativos leveduriformes em maior proporção no interior do cólon de pacientes com CCR podem explicar este achado. A ingesta de etanol através de bebidas destiladas pode levar a carcinogênese de inúmeros tecidos do corpo humano de forma direta ou indireta ⁽⁹⁶⁾, por meio de reações, genéticas, epigenéticas, bioquímicas ou imunológicas ^{(97) (98)}. Acetaldeído é descrito como agente direto na mutação de células do cólon, por metabolismo oxidativo ou não oxidativo do etanol. ⁽⁹⁹⁾.

A associação de CCR e ingesta alcoólica é demonstrada em diversos artigos publicados na literatura. O aumento de ingesta de 10g/dia de álcool em bebidas destiladas aumentou em 7% a incidência de CCR (95% CI=5-9%, I²=25%, ph=0.21), contudo algumas séries demonstraram um acréscimo de até 60% ^{(96) (100)}.

Meta-análise recente, confirmaram um risco relativo de 1,21 para indivíduos com ingesta de 56,6/dia de álcool ⁽¹⁰¹⁾. O aumento da mortalidade do CRC associado com álcool também foi descrito. Estudo de Yang B et al. demonstrou um Hazard Ratio de 1,37 na mortalidade do CRC (95% CI, 1.06–1.78, p = 0.015) para homens com ingesta acima de 50g/dia e mulheres acima de 25g/dia ⁽¹⁰²⁾.

5 Conclusão

A análise metabólica de águas fecais para distinguir indivíduos saudáveis de pacientes com CCR é um método factível, apresentando uma boa sensibilidade para este fim. Todavia, para instituí-la como método *gold standard* (hoje representada pela videocolonosopia com biópsia) se faz necessário um aumento do número de publicações de estudos do método, no intuito de aumentar sua especificidade. Ressalta-se a questão do N de pacientes, visto que a análise estatística de dezenas a centenas de metabólitos por métodos de Espectroscopia de Correlação Estatística (STOCSY) através do software SIMCA (<https://umetrics.com/>) pode racionar de forma considerável este N após a análise supervisionada por OPLS-DA. Este ponto foi descrito e presenciado no presente estudo.

Por conseguinte, novas revisões sistemáticas e meta-análises desta literatura poderão ser efetuadas e, desta maneira, qualificar a ERNM como um método de diagnóstico precoce do CCR embasado em estudos com alto nível de evidência científica.

Referências

- 1 GERMAN, J. B.; HAMMOCK, B. D.; WATKINS, S. M. Metabolomics: building on a century of biochemistry to guide human health. *Metabolomics*, v. 1, n. 1, p. 3 – 9, Mar 2005. ISSN 1573-3882.
- 2 WISHART, D. S. Human Metabolome Database: completing the 'human parts list'. *Pharmacogenomics*, v. 8, n. 7, p. 683 – 686, Jul 2007a. ISSN 1744-8042.
- 3 WISHART, D. S. Current progress in computational metabolomics. *Brief Bioinform*, v. 8, n. 5, p. 279 – 293, Sep 2007b. ISSN 1477-4054.
- 4 AMIOT, A. et al. (1)H NMR Spectroscopy of Fecal Extracts Enables Detection of Advanced Colorectal Neoplasia. *J Proteome Res*, v. 14, n. 9, p. 3871 – 3881, Sep 2015. ISSN 1535-3907.
- 5 DUNN, W. B.; BAILEY, N. J. C.; JOHNSON, H. E. Measuring the metabolome: current analytical technologies. *The Analyst*, v. 130, p. 606 – 25, 4 2005.
- 6 COTTER, D. et al. LMPD: LIPID MAPS proteome database. *Nucleic Acids Res*, v. 34, n. Database issue, p. D507 – D510, Jan 2006. ISSN 1362-4962.
- 7 WISHART, D. S. et al. HMDB 4.0: the human metabolome database for 2018. *Nucleic acids research*, 11 2017.
- 8 SMITH, C. A. et al. METLIN: a metabolite mass spectral database. *Therapeutic drug monitoring*, v. 27, p. 747 – 51, 1 2006.
- 9 WISHART, D. S. Computational approaches to metabolomics. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, v. 593, p. 283 – 313, 12 2009.
- 10 ROWLAND, I. R. The role of the gastrointestinal microbiota in colorectal cancer. *Current pharmaceutical design*, v. 15, n. 13, p. 1524 – 7, 5 2009. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19442169>.
- 11 NICHOLSON, J. K.; LINDON, J. C.; HOLMES, E. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica*, v. 29, n. 11, p. 1181 – 1189, Nov 1999. ISSN 0049-8254.
- 12 DUMAS, M.; KINROSS, J.; NICHOLSON, J. K. Metabolic phenotyping and systems biology approaches to understanding metabolic syndrome and fatty liver disease. *Gastroenterology*, v. 146, n. 1, p. 46 – 62, Jan 2014. ISSN 1528-0012.
- 13 O'KEEFE, S. J. D. et al. Products of the colonic microbiota mediate the effects of diet on colon cancer risk. *J Nutr*, v. 139, n. 11, p. 2044 – 2048, Nov 2009. ISSN 1541-6100.
- 14 SOBHANI, I. et al. Microbial dysbiosis in colorectal cancer (CRC) patients. *PloS one*, v. 6, p. e16393 –, 2 2011.
- 15 SCHMIDT, C. W. Metabolomics: what's happening downstream of DNA. *Environ Health Perspect*, v. 112, n. 7, p. A410 – A415, May 2004.

- 16 MARTIN, F. J. et al. Dietary modulation of gut functional ecology studied by fecal metabonomics. *Journal of proteome research*, v. 9, n. 10, p. 5284 – 95, 9 2010.
- 17 SCHWABE, R. F.; JOBIN, C. The microbiome and cancer. *Nature reviews. Cancer*, v. 13, n. 11, p. 800 – 12, 10 2013.
- 18 WELJIE, A. M. et al. An inflammatory arthritis-associated metabolite biomarker pattern revealed by 1H NMR spectroscopy. *J Proteome Res*, v. 6, n. 9, p. 3456 – 3464, Sep 2007. ISSN 1535-3893.
- 19 WERF, M. J. van der et al. Microbial metabolomics: toward a platform with full metabolome coverage. *Anal Biochem*, v. 370, n. 1, p. 17 – 25, Nov 2007. ISSN 0003-2697.
- 20 TRYGG, J.; HOLMES, E.; LUNDSTEDT, T. Chemometrics in metabonomics. *J Proteome Res*, v. 6, n. 2, p. 469 – 479, Feb 2007. ISSN 1535-3893.
- 21 WELJIE, A. M. et al. Targeted profiling: quantitative analysis of 1H NMR metabolomics data. *Anal Chem*, v. 78, n. 13, p. 4430 – 4442, Jul 2006. ISSN 0003-2700.
- 22 LAVINE, B. K.; WORKMAN, J. Chemometrics. *Analytical chemistry*, v. 85, n. 2, p. 705 – 14, 11 2012.
- 23 KIND, T. et al. A comprehensive urinary metabolomic approach for identifying kidney cancer. *Analytical biochemistry*, v. 363, n. 2, p. 185 – 95, 2 2007.
- 24 DERRY, M. M. et al. Identifying molecular targets of lifestyle modifications in colon cancer prevention. *Frontiers in oncology*, v. 3, p. 119 –, 5 2013.
- 25 PARK, B. K. et al. Systemic inflammatory markers as prognostic factors in stage IIA colorectal cancer. *Journal of surgical oncology*, v. 114, n. 2, p. 216 – 21, 5 2016.
- 26 BULTMAN, S. J. Interplay between diet, gut microbiota, epigenetic events, and colorectal cancer. *Molecular nutrition & food research*, v. 61, n. 1, 5 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27138454>.
- 27 HIRAI, H. W. et al. Systematic review with meta-analysis: faecal occult blood tests show lower colorectal cancer detection rates in the proximal colon in colonoscopy-verified diagnostic studies. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, v. 43, n. 7, p. 755 – 64, 2 2016.
- 28 GIES, A. et al. Quantitative fecal immunochemical tests for colorectal cancer screening. *International Journal of Cancer*, 12 2017.
- 29 DAS, V.; KALITA, J.; PAL, M. Predictive and prognostic biomarkers in colorectal cancer: A systematic review of recent advances and challenges. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, v. 87, p. 8 – 19, 1 2017.
- 30 RASMUSSEN, S. L. et al. Hypermethylated DNA, a circulating biomarker for colorectal cancer detection. *PloS one*, v. 12, n. 7, p. e0180809 –, 7 2017.
- 31 IMPERIALE, T. F. et al. Fecal DNA versus fecal occult blood for colorectal-cancer screening in an average-risk population. *N Engl J Med*, v. 351, n. 26, p. 2704 – 2714, Dec 2004. ISSN 1533-4406.

- 32 MEULEN, M. P. van der et al. Colorectal Cancer: Cost-effectiveness of Colonoscopy versus CT Colonography Screening with Participation Rates and Costs. *Radiology*, p. 162359 –, 2 2018.
- 33 OBARO, A. E. et al. Post-imaging colorectal cancer or interval cancer rates after CT colonography: a systematic review and meta-analysis. *The lancet. Gastroenterology & hepatology*, 2 2018.
- 34 ATKIN, W. S. et al. Once-only flexible sigmoidoscopy screening in prevention of colorectal cancer: a multicentre randomised controlled trial. *Lancet (London, England)*, v. 375, p. 1624 – 33, 5 2010.
- 35 J, D. V. F. Reduction in colorectal cancer mortality by fecal occult blood screening in a French controlled study. *Gastroenterology*, v. 126, n. 7, p. 1674 – 1680, 2004 Jun.
- 36 SINGH, H. et al. Risk of developing colorectal cancer following a negative colonoscopy examination: evidence for a 10-year interval between colonoscopies. *JAMA*, v. 295, p. 2366 – 73, 5 2006.
- 37 D., S. A. . M. A. Prevention of colorectal cancer by flexible endoscopy and polypectomy. A case-control study of 32,702 veterans. *Ann. Intern. Med*, v. 123, n. 12, p. 904 – 910, 2005.
- 38 BINGHAM, S. A. et al. Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study. *Lancet*, v. 361, n. 9368, p. 1496 – 1501, May 2003.
- 39 GREER, J. B.; O'KEEFE, S. J. Microbial induction of immunity, inflammation, and cancer. *Front Physiol*, v. 1, Jan 2011. ISSN 1664-042X.
- 40 LIN, Y. et al. NMR-based fecal metabolomics fingerprinting as predictors of earlier diagnosis in patients with colorectal cancer. *Oncotarget*, v. 7, n. 20, p. 29454 – 64, 4 2016.
- 41 INADOMI, J. M. Screening for Colorectal Neoplasia. *The New England journal of medicine*, v. 376, n. 2, p. 149 – 156, 1 2017.
- 42 MORIKAWA, T. et al. A comparison of the immunochemical fecal occult blood test and total colonoscopy in the asymptomatic population. *Gastroenterology*, v. 129, n. 2, p. 422 – 428, Aug 2005. ISSN 0016-5085.
- 43 ALLISON, J. E. et al. A comparison of fecal occult-blood tests for colorectal-cancer screening. *N Engl J Med*, v. 334, n. 3, p. 155 – 159, Jan 1996. ISSN 0028-4793.
- 44 LEE, J. K. et al. Accuracy of fecal immunochemical tests for colorectal cancer: systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med*, v. 160, n. 3, Feb 2014. ISSN 1539-3704.
- 45 IMPERIALE, T. F.; RANSOHOFF, D. F.; ITZKOWITZ, S. H. Multitarget stool DNA testing for colorectal-cancer screening. *N Engl J Med*, v. 371, n. 2, p. 187 – 188, Jul 2014. ISSN 1533-4406.
- 46 ZHENG, X. et al. The footprints of gut microbial-mammalian co-metabolism. *Journal of proteome research*, v. 10, n. 12, p. 5512 – 22, 10 2011.

- 47 DIGGS, D. L. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons and digestive tract cancers: a perspective. *Journal of environmental science and health. Part C, Environmental carcinogenesis & ecotoxicology reviews*, v. 29, n. 4, p. 324 – 57, 11 2011.
- 48 LOUIS, P.; FLINT, H. J. Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine. *FEMS Microbiol Lett*, v. 294, n. 1, p. 1 – 8, May 2009. ISSN 1574-6968.
- 49 SCHEPPACH, W.; WEILER, F. The butyrate story: old wine in new bottles? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, v. 7, n. 5, p. 563 – 567, Sep 2004.
- 50 GONÇALVES, T. J. D. *Efeito do Butirato no Metabolismo do Cancro Colorretal*. 2014. 133 p. Dissertação (Mestrado) — Universidade de Coimbra. Disponível em: https://estudogeral.sib.uc.pt/bitstream/10316/28119/1/tese_refs_13.pdf.
- 51 HIJOVA, E.; CHMELAROVA, A. Short chain fatty acids and colonic health. *Bratisl Lek Listy*, v. 108, n. 8, p. 354 – 358, 2007.
- 52 TOPPING, D. L.; CLIFTON, P. M. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol Rev*, v. 81, n. 3, p. 1031 – 1064, Jul 2001. ISSN 0031-9333.
- 53 YANG, Y. et al. Metabonomic studies of human hepatocellular carcinoma using high-resolution magic-angle spinning 1H NMR spectroscopy in conjunction with multivariate data analysis. *J Proteome Res*, v. 6, n. 7, p. 2605 – 2614, Jul 2007. ISSN 1535-3893.
- 54 WANG, T. et al. Structural segregation of gut microbiota between colorectal cancer patients and healthy volunteers. *ISME J*, v. 6, n. 2, p. 320 – 329, Feb 2012. ISSN 1751-7370.
- 55 PHUA, L. C. et al. Non-invasive fecal metabonomic detection of colorectal cancer. *Cancer Biol Ther*, v. 15, n. 4, p. 389 – 397, Apr 2014. ISSN 1555-8576.
- 56 WALKER, A. W. et al. pH and peptide supply can radically alter bacterial populations and short-chain fatty acid ratios within microbial communities from the human colon. *Appl Environ Microbiol*, v. 71, n. 7, p. 3692 – 3700, Jul 2005. ISSN 0099-2240.
- 57 MONTROSE, D. C. et al. Metabolic profiling, a noninvasive approach for the detection of experimental colorectal neoplasia. *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.)*, v. 5, n. 12, p. 1358 – 67, 9 2012.
- 58 GOEDERT, J. J. et al. Fecal metabolomics: assay performance and association with colorectal cancer. *Carcinogenesis*, v. 35, n. 9, p. 2089 – 96, 7 2014.
- 59 BROWN, D. G. et al. Metabolomics and metabolic pathway networks from human colorectal cancers, adjacent mucosa, and stool. *Cancer & metabolism*, v. 4, n. 11, p. 11 –, 6 2016.
- 60 LI, R. W.; LI, C. Butyrate induces profound changes in gene expression related to multiple signal pathways in bovine kidney epithelial cells. *BMC Genomics*, v. 7, Sep 2006. ISSN 1471-2164.

- 61 MONLEON, D. et al. Metabolite profiling of fecal water extracts from human colorectal cancer. *NMR in Biomedicine: An International Journal Devoted to the Development and Application of Magnetic Resonance In vivo*, Wiley Online Library, v. 22, n. 3, p. 342 – 348, 2009.
- 62 BEZABEH, T. et al. Detecting colorectal cancer by ¹H magnetic resonance spectroscopy of fecal extracts. *NMR in Biomedicine: An International Journal Devoted to the Development and Application of Magnetic Resonance In vivo*, Wiley Online Library, v. 22, n. 6, p. 593 – 600, 2009.
- 63 LIN, Y. et al. [Proton nuclear magnetic resonance spectroscopy recognition of metabolic patterns in fecal extracts for early diagnosis of colorectal cancer]. *Zhonghua yu fang yi xue za zhi [Chinese journal of preventive medicine]*, v. 50, n. 9, p. 788 – 793, 9 2016.
- 64 GOPALAKRISHNAN, S.; GANESHKUMAR, P. Systematic Reviews and Meta-analysis: Understanding the Best Evidence in Primary Healthcare. *J Family Med Prim Care*, p. 9 – 14, 3 2013. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.4103%2F2249-4863.109934>.
- 65 HIGGINS, J. P.; THOMPSON, S. G. Quantifying heterogeneity in a meta-analysis. *Statistics in medicine*, v. 21, n. 11, p. 1539 – 1558, 2002.
- 66 OXMAN, A. D.; GUYATT, G. H. The Science of Reviewing Research. *Annals of the New York Academy of Sciences*, Wiley Online Library, v. 703, n. 1, p. 125 – 134, 1993.
- 67 LIPSEY, M. W.; WILSON, D. B. *Practical meta-analysis*. [S.l.]: Thousand Oaks, CA, US: Sage Publications, Inc., 2001. v. 49.
- 68 ZHANG, F. et al. Metabolomics for biomarker discovery in the diagnosis, prognosis, survival and recurrence of colorectal cancer: a systematic review. *Oncotarget*, v. 8, n. 21, p. 35460 –, 2017.
- 69 WANG, H. et al. Metabolomics and detection of colorectal cancer in humans: a systematic review. *Future Oncology*, v. 6, n. 9, p. 1395 – 1406, 2010.
- 70 ANTONOWICZ, S. et al. Diagnostic metabolomic blood tests for endoluminal gastrointestinal cancer—a systematic review and assessment of quality. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, AACR, v. 25, n. 1, p. 6 – 15, 2016.
- 71 STONE, P. Popping the (PICO) question in research and evidence-based practice. *Nurs Res*, v. 15, n. 3, p. 197 – 198, 2002.
- 72 GROUP, T. P. PRISMA 2009 Flow Diagram. 2009. Disponível em: <http://www.prisma-statement.org/PRISMAStatement/FlowDiagram>.
- 73 GRIMSHAW, J. M.; RUSSELL, I. T. Effect of clinical guidelines on medical practice: a systematic review of rigorous evaluations. *The Lancet*, v. 342, n. 8883, p. 1317 – 1322, 1993.
- 74 CHEUNG, M. W.; VIJAYAKUMAR, R. A guide to conducting a meta-analysis. *Neuropsychology Review*, v. 26, n. 2, p. 121 – 128, 6 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11065-016-9319-z>. Acesso em: 30 Nov 2018.

- 75 DICKERSIN, K.; SCHERER, R.; LEFEBVRE, C. Systematic Reviews - Identifying Relevant Studies For Systematic Reviews. *BMJ-BRITISH MEDICAL JOURNAL*, v. 309, n. 6964, p. 1286 – 1291, 11 1994.
- 76 ELLEGAARD, O.; WALLIN, J. A. The bibliometric analysis of scholarly production: How great is the impact? *Scientometrics*, Springer, v. 105, n. 3, p. 1809 – 1831, 2015.
- 77 AMIOT, A. et al. ¹H NMR spectroscopy of fecal extracts enables detection of advanced colorectal neoplasia. *Journal of proteome research*, ACS Publications, v. 14, n. 9, p. 3871 – 3881, 2015.
- 78 GALL, . L. et al. Metabolite quantification of faecal extracts from colorectal cancer patients and healthy controls. *Oncotarget*, Impact Journals, LLC, v. 9, n. 70, p. 33278 – , 2018.
- 79 SOMORJAI, R. L. et al. *A data-driven, flexible machine learning strategy for the classification of biomedical data*. Springer Netherlands, 2004. ISBN 978-1-4020-2865-6. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5811-0_5.
- 80 PAJAK, B.; ORZECZOWSKI, A.; GAJKOWSKA, B. Molecular basis of sodium butyrate-dependent proapoptotic activity in cancer cells. *Adv Med Sci*, v. 52, p. 83 – 88, 2007.
- 81 SOKOL, H. et al. Specificities of the fecal microbiota in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*, v. 12, n. 2, p. 106 – 111, Feb 2006. ISSN 1078-0998.
- 82 TILG, H.; MOSCHEN, A. R. Microbiota and diabetes: an evolving relationship. *Gut*, v. 63, n. 9, p. 1513 – 1521, Sep 2014. ISSN 1468-3288.
- 83 ROTTER, M. et al. Stability of targeted metabolite profiles of urine samples under different storage conditions. *Metabolomics : Official journal of the Metabolomic Society*, v. 13, n. 1, p. 4 – , 12 2016.
- 84 SCHNACKENBERG, L. K.; BEGER, R. D. Monitoring the health to disease continuum with global metabolic profiling and systems biology. *Pharmacogenomics*, v. 7, n. 7, p. 1077 – 1086, Oct 2006. ISSN 1462-2416.
- 85 GERMAN, J. B. et al. Lipidomics and lipid profiling in metabolomics. *Curr Opin Lipidol*, v. 18, n. 1, p. 66 – 71, Feb 2007. ISSN 0957-9672.
- 86 ZHENG, A. et al. Elastic K-means using posterior probability. *PloS one*, v. 12, p. e0188252 – , 12 2017.
- 87 LIN, Y. et al. NMR-based fecal metabolomics fingerprinting as predictors of earlier diagnosis in patients with colorectal cancer. *Oncotarget*, Impact Journals, LLC, v. 7, n. 20, p. 29454 – , 2016.
- 88 BERTINI, I. et al. Metabolomic NMR fingerprinting to identify and predict survival of patients with metastatic colorectal cancer. *Cancer research*, v. 72, n. 1, p. 356 – 64, 11 2011.
- 89 HAGUE, A. et al. Sodium butyrate induces apoptosis in human colonic tumour cell lines in a p53-independent pathway: implications for the possible role of dietary fibre in the prevention of large-bowel cancer. *Int J Cancer*, v. 55, n. 3, p. 498 – 505, Sep 1993.

- 90 ZOU, S.; FANG, L.; LEE, M. Dysbiosis of gut microbiota in promoting the development of colorectal cancer. *Gastroenterology report*, v. 6, n. 1, p. 1 – 12, 2 2018.
- 91 TSILIMIGRAS, M. C. B.; FODOR, A.; JOBIN, C. Carcinogenesis and therapeutics: the microbiota perspective. *Nature microbiology*, v. 2, n. 22, p. 17008 –, 2 2017.
- 92 HESTER, C. M. et al. Fecal microbes, short chain fatty acids, and colorectal cancer across racial/ethnic groups. *World J Gastroenterol*, v. 21, n. 9, p. 2759 – 2769, Mar 2015. ISSN 2219-2840.
- 93 CASTELLARIN, M. et al. Fusobacterium nucleatum infection is prevalent in human colorectal carcinoma. *Genome research*, v. 22, n. 2, p. 299 – 306, 10 2011.
- 94 MIMA, K. et al. Fusobacterium nucleatum in colorectal carcinoma tissue and patient prognosis. *Gut*, v. 65, n. 12, p. 1973 – 1980, 8 2015.
- 95 KOSTIC, A. D. et al. Fusobacterium nucleatum potentiates intestinal tumorigenesis and modulates the tumor-immune microenvironment. *Cell host & microbe*, v. 14, n. 2, p. 207 – 15, 8 2013.
- 96 MARCO, R. et al. Colorectal Cancer and Alcohol Consumption—Populations to Molecules. *Cancers*, v. 10, n. 2, p. 38 –, 2018.
- 97 BISHEHSARI, F. et al. Alcohol and Gut-Derived Inflammation. *Alcohol research : current reviews*, v. 38, p. 163 – 171, 10 2017.
- 98 SHUKLA, S. D.; LIM, R. W. Epigenetic effects of ethanol on the liver and gastrointestinal system. *Alcohol research : current reviews*, v. 35, p. 47 – 55, 12 2013.
- 99 DINIS-OLIVEIRA, R. J. Oxidative and Non-Oxidative Metabolomics of Ethanol. *Current drug metabolism*, v. 17, n. 4, p. 327 – 35, 1 2016.
- 100 VIEIRA, A. R. et al. Foods and beverages and colorectal cancer risk: a systematic review and meta-analysis of cohort studies, an update of the evidence of the WCRF-AICR Continuous Update Project. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, v. 28, n. 8, p. 1788 – 1802, 4 2017.
- 101 CAI, S. et al. Alcohol drinking and the risk of colorectal cancer death: a meta-analysis. *European journal of cancer prevention : the official journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)*, v. 23, n. 6, p. 532 – 9, 8 2014.
- 102 YANG, B. et al. Alcohol intake and mortality among survivors of colorectal cancer: The Cancer Prevention Study II Nutrition Cohort. *Cancer*, v. 123, n. 11, p. 2006 – 2013, Jun 2017. ISSN 1097-0142.