



## Investigação de biomarcadores putativos na urina de pacientes com linfoma não-Hodgkin antes da quimioterapia.

*Alessandra de Sousa Mesquita\**; *Hans Zamora-Obando*; *Fábio Neves dos Santos*; *Jayr Schmidt-Filho*; *Vladimir Cordeiro de Lima*; *Felipe D'Almeida*; *Victor Piana de Andrade*; *Marcos Nogueira Eberlin*; *Ana Valéria Colnaghi Simionato\**.

### Abstract

O Linfoma não-Hodgkin (NHL) é uma neoplasia que acomete linfócitos, sendo registrada como a décima primeira causa mais frequente de morte por câncer no mundo em 2018. Essa doença é diagnosticada e classificada para fornecer uma melhor abordagem de tratamento, por meio de uma combinação de histopatologia, análise laboratorial e genética após anamnese de sintomas e diversos exames de imagem para definir o melhor local para biópsia, bem como a extensão da doença que informará o risco de progressão e recorrência. O diagnóstico e o estadiamento podem levar várias semanas antes que os pacientes recebam quimioterapia e/ou anticorpos monoclonais e/ou radioterapia e/ou imunoterapia. Uma alternativa mais barata e menos invasiva para diagnóstico e prognóstico como o monitoramento de metabólitos produzidos e secretados em fluidos ou tecidos biológicos seria útil, uma vez que os linfomas são doenças sistêmicas com células neoplásicas circulando na corrente sanguínea e gerando alterações metabólicas de fácil acesso. Neste trabalho, uma abordagem Metabolômica global foi usada para avaliar se os compostos orgânicos voláteis (VOCs) presentes na urina levariam ao diagnóstico ou prognóstico de NHL. Essa abordagem parece promissora por contribuir para o prognóstico e escolha do tratamento adequado do NHL para cada indivíduo.

**Palavras-Chave:** *Metabolômica, Compostos Orgânicos Voláteis, Biomarcadores, Linfoma não-Hodgkin*

### 1. Introdução

O linfoma é uma neoplasia que acomete um grupo de células do sistema imune que sofreram mutações, sendo classificados em linfoma de Hodgkin (HL) e linfoma Não-Hodgkin (NHL) [1]. Uma possibilidade de diagnóstico das neoplasias linfoides é o monitoramento de biomarcadores sintetizados e secretados em material biológico (tecidos ou fluidos), devido aos linfomas serem gerados por alterações e mutações no organismo [2,3]. Algumas variações na homeostase como respostas imunes e inflamatórias, metabolismo do carbono, estresse oxidativo, reparação do DNA, e metabolismo de desintoxicação - variações na codificação de genes de enzimas fase I e fase II, são sugeridos como fatores contribuintes para neoplasias linfoides [3].

Alguns biomarcadores podem ser compostos orgânicos voláteis (VOCs), sendo produzidos pelo organismo e excretados na respiração humana, no sangue e na urina. A análise de VOCs é uma abordagem alternativa para a investigação de biomarcadores de neoplasias devido a ser um método não invasivo, com custo potencialmente baixo e proporcionar simplicidade de análise [4].

Para a extração dos VOCs é realizada a técnica de microextração em fase sólida e headspace (SPME-HS) [4]. O dispositivo de SPME-HS consiste em um bastão de fibra ótica de sílica fundida, recoberto com um filme fino de polímero ou de um sólido adsorvente [5]. Em seguida, os analitos podem ser analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS), onde a separação ocorre de acordo com a volatilidade dos analitos, sua polaridade e força de interação com a fase estacionária e a detecção é feita por MS de acordo com a razão massa/carga ( $m/z$ ) dos íons gerados na fonte de ionização [6, 7]. Desta forma, os potenciais metabólitos (*molecular features*)

podem ser identificados de acordo com seus respectivos tempos de retenção, m/z e abundância, após um tratamento de dados adequado a análise metabolômica global. O objetivo deste trabalho foi investigar os potenciais biomarcadores presentes em amostras de urina de pacientes com linfoma não-Hodgkin antes da quimioterapia, comparando com um grupo controle de pacientes saudáveis.

## 2. Materiais e métodos

Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo CEP sob o código CAAE 35481614.7.0000.5404. Para esse estudo dois grupos foram comparados: Grupo 1- composto por 40 voluntários saudáveis (codificados como H, sendo 20 mulheres e 20 homens, com idades entre 18 a 66 anos), cujas amostras de urina foram coletadas no Hemocentro de Campinas e armazenadas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; e Grupo 2: composto por 18 pacientes diagnosticados com linfoma não-Hodgkin antes de iniciarem o tratamento de quimioterapia no Hospital AC Camargo (São Paulo, Brasil) (codificados como L, sendo 7 mulheres e 11 homens, com idades dentre 29 a 78 anos).

O preparo da amostra foi realizado pela eliminação de biomoléculas de alta massa molecular por *salting out*, através da adição de 0,5g de cloreto de sódio (NaCl) em 3,5 mL de amostra de urina, seguido de extração por SPME, utilizando uma fibra OtableFlex de carboxeno/divinilbenzeno/polidimetilsiloxano (CAR/DVB/PDMS), selecionando os metabólitos naturalmente voláteis e termicamente estáveis. As condições de extração previamente otimizadas foram: tempo de incubação 15 min, tempo de agitação 19 s, temperatura de incubação  $90\text{ }^{\circ}\text{C}$  e tempo de extração 15 min. O tempo de dessorção foi de 5 min a  $250\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Após a extração por HS-SPME, os VOCs foram analisados por GC-MS.

As análises por GC-MS foram feitas no equipamento Agilent 7595 com um analisador de massas quadrupolo, instalado no Laboratório Institucional do IQ-Unicamp, com uma coluna HP-5MS ( $30\text{m} \times 0,25\text{mm} \times 0,25\mu\text{m}$ ), com fase estacionária composta por 5% fenil e 95% dimetilpolisiloxano (Agilent Technologies). As condições cromatográficas avaliadas são as indicadas pela Biblioteca Fiehn (que caracteriza os metabólitos de acordo com o tempo de retenção e os espectros de massa correspondentes): volume de injeção  $1\ \mu\text{L}$  (modo splitless), análise por gradiente de temperatura (temperatura inicial  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ , seguida de elevação de  $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  até  $325\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), temperatura da linha de transferência MSD  $290\text{ }^{\circ}\text{C}$ , scan 50,0 – 600,00 Daltons; [8]. O *batch* incluiu a injeção de 3 amostras branco, seguido da injeção de 12 amostras de controle de qualidade (QCs) para equilibrar o equipamento; 1 QC era injetado a cada 5 amostras, totalizando 8 QCs.

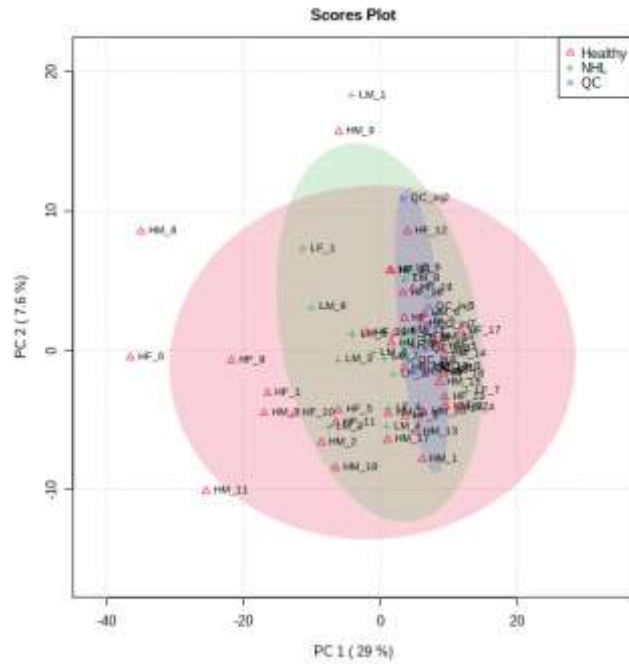
Os espectros adquiridos no GC-MS foram pré-tratados pelo software MS-DIAL (versão 3.66).. A análise estatística das amostras de pacientes com NHL e indivíduos saudáveis foram realizadas com o software MetaboAnalyst 4.0. Um teste-t foi utilizado para comparar a concentração de metabólitos na urina entre voluntários saudáveis e pacientes com NHL.

## 3. Resultados e Discussões

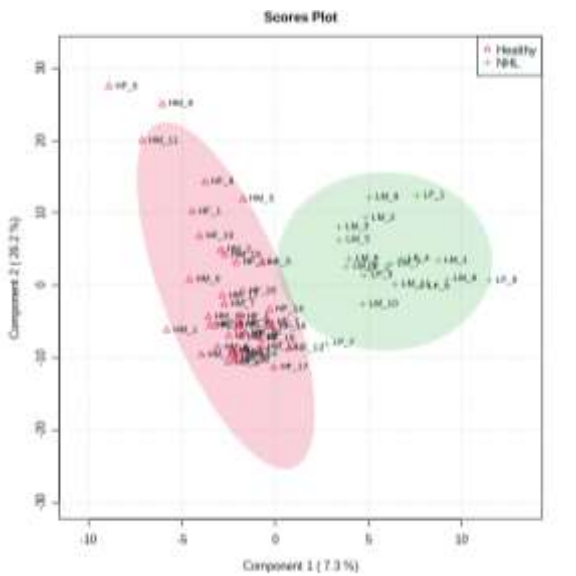
Um teste t foi aplicado para verificar se a concentração de algum dos metabólitos identificados eram estatisticamente diferentes entre os grupos L e H, resultando na identificação de 28 metabólitos com significância estatística (Tabela 1), sendo 12 deles identificados pela biblioteca Fiehn e NIST. A análise de componentes principais (PCA) não apresentou separação entre ambos os grupos (Figura 1), no entanto as amostras de QCs se apresentam bem agrupadas, principalmente de acordo com o PC1, sendo um indicativo de que as variações instrumentais foram controladas, e qualquer variação de sinal observada no tratamento dos dados é decorrente de causas biológicas. A análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) mostra um gráfico de pontuação (Figura 2- A) e um de projeção de variáveis importantes (VIP scores) (Figura 2 - B). Neste caso, o grupo saudável foi claramente separado do doente, e a pontuação VIP apontou para 43 metabólitos estatisticamente diferentes entre os dois grupos.

**Tabela 1.** Metabólitos significativos em amostras de urina de pacientes com diagnóstico de Linfoma Não-Hodgkin comparado com pacientes saudáveis pelo teste t.

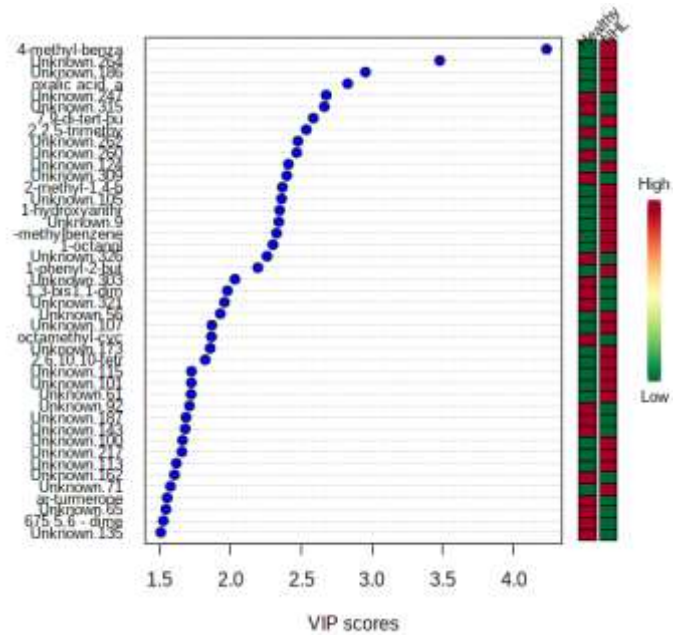
<b>ID</b>	<b>Nome do Composto</b>	<b>t<sub>r</sub> (min)</b>	<b>p-valor</b>
1	4-metil-benzaldeído	7.14	1.70*10 <sup>-16</sup>
2	Desconhecido.264	15.92	8.54*10 <sup>-8</sup>
3	Desconhecido.186	13.18	2.21*10 <sup>-3</sup>
4	Éster alil octadecil de ácido oxálico	22.01	9.49*10 <sup>-3</sup>
5	Desconhecido.247	15.15	4.68*10 <sup>-2</sup>
6	Desconhecido.315	19.09	5.30*10 <sup>-3</sup>
7	7,9-di-terc-butil-1-oxaspiro-4,5-deca-6,9-dieno-2,8-diona	17.58	1.12*10 <sup>-1</sup>
8	2,2,5-trimetil-3,4-hexanodiona	18.19	1.78*10 <sup>-1</sup>
9	Desconhecido.262	15.87	2.99*10 <sup>-1</sup>
10	Desconhecido.260	15.79	3.22*10 <sup>-1</sup>
11	Desconhecido.124	11.41	5.32*10 <sup>-1</sup>
12	Desconhecido.309	18.54	5.86*10 <sup>-1</sup>
13	2-metil-1,4-benzenodicarboxaldeído	9.93	7.51*10 <sup>-1</sup>
14	Desconhecido.105	10.86	7.91*10 <sup>-1</sup>
15	1-hidroxiantraquinona	8.94	8.79*10 <sup>-5</sup>
16	Desconhecido.9	7.26	9.20*10 <sup>-1</sup>
17	α-metilbenzenoacetaldeído	7.44	0.0001043
18	1-octanol	9.75	0.00012782
19	Desconhecido.326	20.93	0.00017604
20	1-fenil-2-butanona	9.16	0.00028461
21	Desconhecido.303	18.17	0.00086584
22	1,3-bis(1,1-dimetiletil)benzeno	9.33	0.0012214
23	Desconhecido.321	19.86	0.0013842
24	Desconhecido.56	9.23	0.001663
25	Desconhecido.107	10.90	0.0023801
26	Octametil-ciclotetrasiloxano	7.97	0.0024214
27	Desconhecido.173	12.83	0.0025481
28	2,6,10,10-tetrametil-1-oxaspiro[4.5]dec-6-eno	10.23	0.0031179



**Figura 1:** Gráfico de pontuação de PCA de amostras de urina de indivíduos saudáveis e pacientes com diagnóstico de NHL



**Figura 2-A:** Gráfico de pontuação PLS-DA



**Figura 2-B:** Índice VIP mostrando as características moleculares que melhor diferenciaram cada grupo (VIP > 1,5, Total = 43)

Três dos 28 metabólitos significativos encontrados neste estudo apresentam correlação com o metabolismo do câncer, sendo eles: 1-octanol [9, 10]; 7,9-di-terc-butil-1-oxaspiro-4,5-deca-6,9-dieno-2,8-diona [11]; e 1-hidroxiantraquinona [12, 13, 14].

#### 4. Conclusão

Foram encontrados vinte e oito potenciais biomarcadores para o diagnóstico de NHL. Embora um estudo com coorte amostral maior certamente seja necessário para confirmar os achados, esses metabólitos parecem promissores para um diagnóstico e prognóstico não invasivo e bastante acessível do NHL, orientando a seleção do tratamento mais adequado.

#### Agradecimentos

Ao Hemocentro de Campinas (Campinas, São Paulo, Brasil); ao AC Camargo Cancer Center (São Paulo, Brasil); ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico o apoio financeiro da bolsa (Processos 2016/07014-5 e 117757/2018-7); à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo 2017/09726-5); à Universidade da Costa Rica (OAICE-159-2019).

#### Referências

- [1] Fisher, R. I.; Mauch, P. M.; Harris, N. L.; Friedberg, J. W. Non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer: principles and practice of oncology*. 7th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 1957-7, 2005.
- [2] Li, X.; Asmitanda, T.; Gao, L.; Gai, D.; Song, Z.; Zhang, Y.; Ren, H.; Yang, T.; Chen, T.; Chen, M. Biomarkers in the Lung Cancer Diagnosis: A Clinical Perspective. *Neoplasma* 59, 5, 2012.
- [3] Kelly, R. S.; Vineis, P. Biomarkers of susceptibility to chemical carcinogens: the example of non-Hodgkin lymphomas. *British Medical Bulletin*, 111:89–100, 2014.
- [4] Schmidt, K.; Podmore, I. Solid Phase Microextraction (SPME) Method Development in Analysis of Volatile Organic Compounds (VOCS) as Potential Biomarkers of Cancer. *Journal of Molecular Biomarkers & Diagnosis*, 6, 1-16, 2015.
- [5] Augusto, F.; Valente, Microextração por Fase Sólida. *Química Nova*, 23, 523-530, 2000.
- [6] Zhang, Z; Li, G. A review of advances and new developments in the analysis of biological volatile organic compounds. *Microchemical Journal*, 95, 127-139, 2010.
- [7] Wilson, K.; Walker, J. Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology, 7th ed., Cambridge, 3-52, 2010.
- [8] O. Fiehn, J. Kopka, R. N. Trethewey, L. Willmitzer, Identification of Uncommon Plant Metabolites Based on Calculation of Elemental Compositions Using Gas Chromatography and Quadrupole Mass Spectrometry, *Anal. Chem*, 72 (2000) 3573–3580.
- [9] C. L. Silva, M. Passos, J. S. Câmara, Investigation of Urinary Volatile Organic Metabolites as Potential Cancer Biomarkers by Solid-Phase Microextraction in Combination with Gas Chromatography-Mass Spectrometry, *Br. J. Cancer*, 105 (2011) 1894-18904
- [10] The Human Metabolome Database, Octanol (HMDB0001183). <https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0001183>, 2018 (accessed 28 June 2020).
- [11] ChEBI, CHEBI:88174 - 7,9-di-tert-butyl-1-oxaspiro[4.5]deca-6,9-diene-2,8-dione. <https://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:88174>, 2016 (accessed 28 June 2020).
- [12] T. Valarmathi, R. Premkumar, A. M. F. Benial, 2020. Spectroscopic and molecular docking studies on 1-Hydroxyanthraquinone: A potent ovarian cancer drug, 1213, 128163.
- [13] KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, Compound: C02980. [https://www.genome.jp/dbget-bin/www\\_bget?cpd:C02980](https://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?cpd:C02980), 2020 (accessed 30 June 2020).
- [14] KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, Reaction: R04108. [https://www.genome.jp/dbget-bin/www\\_bget?rn:R04108](https://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?rn:R04108), 2020 (accessed 30 June 2020).