

Camila Gonzaga da Silva

**ANÁLISE METABOLÔMICA URINÁRIA DE MULHERES COM CISTITE
INTERSTICIAL**

Tese apresentada à Universidade Federal
de São Paulo - Escola Paulista de
Medicina, para obtenção do Título de
Doutor em Ciências

São Paulo

2019

Camila Gonzaga da Silva

**ANÁLISE METABOLÔMICA URINÁRIA DE MULHERES COM CISTITE
INTERSTICIAL**

Tese apresentada à Universidade Federal
de São Paulo - Escola Paulista de
Medicina, para obtenção do Título de
Doutor em Ciências

Orientador:

Prof. Dr. Fernando Gonçalves de Almeida

Coorientador:

Dra. Letícia Siqueira de Sá Barretto

Pesquisador Associado:

Dr. Edson Guimarães Lo Turco

São Paulo

2019

Silva, Camila Gonzaga da

Análise metabolômica urinária de mulheres com cistite intersticial/ Camila Gonzaga da Silva. - São Paulo, 2019.
xiii, 48f

Dissertação (Doutorado)- Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Urologia.

Título em inglês: Urinary metabolomic analysis of women with interstitial cystitis.

1. Cistite Intersticial. 2. Síndrome da Bexiga Dolorosa. 3. Metabólitos-alvo. 4. Urina. 5. Metabolismo.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM UROLOGIA

Chefe do Departamento: Prof. Dr. José Luiz Gomes do Amaral

Coordenador do curso de pós-graduação: Prof. Dr. Ricardo Pimenta Bertolla

Dedicatória

Aos meus pais, Dalva e Lourival, que sempre confiaram nos meus sonhos.

A todos aqueles que acreditam na ciência.

Agradecimentos

À Deus, por guiar-me nesta e em todas as jornadas;

Aos meus pais, Dalva Orlando e Lourival Gonzaga, e às minhas irmãs, Janaína Gonzaga e Nádia Gonzaga, por todo carinho, apoio e incentivo nesta jornada.

Ao meu noivo, Caio H. Kusaba, pelo companheirismo e apoio, sendo um exemplo de força e determinação.

Ao orientador, Prof. Dr. Fernando Gonçalves de Almeida, e à coorientadora, Profa. Dra. Letícia Siqueira de Sá Barretto, pela oportunidade e confiança, além dos ensinamentos que foram essenciais para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Edson Guimarães Lo Turco, pela disposição e pelos ensinamentos sobre a metabolômica.

Ao Dr. Mário Augusto Izidoro, por todo o auxílio prestado na execução e análise metabolômica.

Ao coordenador curso de pós-graduação, Prof. Dr. Ricardo Pimenta Bertolla, pelo auxílio na realização da estatística.

À Dra. Márcia Eli Girotti, MSc. Mariana Rhein Felipe, Maíra Oshiros e Monique Rodrigues, por todo auxílio e informações prestadas durante a coleta das amostras.

As todas as mulheres que participaram deste estudo, que sem elas não seria possível a realização deste trabalho.

Ao apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Sumário

Dedicatória	v
Agradecimentos	vi
Lista de abreviaturas	viii
Lista de siglas.....	ix
Listas de símbolos.....	xi
Resumo	xii
Abstract	xiii
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	6
2.1 Objetivo geral.....	6
2.2 Objetivo específico	6
3 MÉTODOS	7
3.1 Reagentes e solventes	7
3.2 População de estudo e coleta de amostras de urina.....	7
3.2.1 Processamento das amostras de urina.....	8
3.2.2 Extração dos metabólitos por método de precipitação de proteínas	8
3.2.3 Calibração e controle de qualidade.....	8
3.2.4 Metabólitos-alvo na urina	9
3.2.4.1 Análise metabolômica por Cromatografia Líquida de Ultra Performance acoplada à espectrometria de massas (UHPLC-MS) com UF- Qarray™	9
3.2.4.2 Quantificação dos metabólitos-alvo por curva de calibração externa	10
3.3 Análise estatística.....	11
4 RESULTADOS	12
4.1 Características das participantes.....	12
4.2 Identificação e quantificação dos metabólitos-alvo	12
5 DISCUSSÃO	16
6 CONCLUSÃO.....	22
7 REFERÊNCIAS.....	23
Anexos	24

Lista de abreviaturas

Acetil-CoA	Acetil-Coenzima A
BCO	Branco
CONT	Controle
DP	Desvio Padrão
et al.	e outros
n	número
p-valor	Valor de probabilidade de significância
v/v	volume/volume

Lista de siglas

AMPK	Proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina
ALA	Alanina
ARG	Arginina
ASN	Aspargina
ASP	Aspartato
ATP	(Adenosine triphosphate) - Trifosfato de adenosina
AUA	American Urological Association
CI	Cistite Intersticial
CQ	Controle de Qualidade
CYS	Cisteína
C2	Acetilcarnitina
C8	Octanoilcarnitina
COLSAN	Associação Beneficente de Coleta de Sangue
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DMSO	Dimetilsulfóxido
ESI	Eletrospray
ESSIC	European Society for the Study of Interstitial Cystitis
FADH ₂	Dinucleótido de flavina adenina
GAG	Glicosaminoglicano
GLN	Glutamina
GLU	Glutamato
GLY	Glicina
GPR35	Receptor acoplado à proteína G-35
GPR91	Receptor acoplado à proteína G-91
HIS	Histidina
HO-PRO	Hidroxiprolina
IC	Intervalo de Confiança
ILE	Isoleucina
LEU	Leucina
LYS	Lisina
MET	Metionina

NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina
NIDDK	National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases
MS	Espectrometria de Massas
PHE	Fenilalanina
PRO	Prolina
SER	Serina
SBD	Síndrome da Bexiga Dolorosa
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
SUCNR1	Receptor do succinato 1
TCA	(Tricarboxylic acid cycle) - Ciclo de Ácidos Tricarboxílicos
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
THR	Treonina
TRP	Triptofano
TYR	Tirosina
UHPLC	Cromatografia Líquida de Ultra Performance
VAL	Valina

Listas de símbolos

Ar	Argônio
CO ₂	Gás carbônico, dióxido de carbono
g	grama
H ₂ O	Água
min	minuto
mL	mililitro
m/z	massa/carga
nM	nanoMolar
β	Beta
μM	microMolar
° C	grau Celsius

Resumo

Objetivos: Comparar os metabólitos urinários dos subconjuntos de ácidos orgânicos, acilcarnitinas, aminoácidos correlacionados ao metabolismo energético, além da creatinina, entre mulheres com e sem Cistite Intersticial (CI)/Síndrome da Bexiga Dolorosa (SBD). **Métodos:** O jato médio da primeira urina da manhã de 20 mulheres com CI e 20 mulheres saudáveis (sem queixa urinária) foi coletado e processado para obtenção de um filtrado da amostra. A partir deste, realizou-se a extração dos metabólitos através do método de precipitação de proteínas, seguido da análise de metabólitos-alvo com Cromatografia Líquida de Ultra Performance acoplada à Espectrometria de Massas (UHPLC-MS). A quantificação de cada metabólito-alvo foi realizada com base na curva de calibração externa de padrões analíticos e avaliada por testes estatísticos não-paramétricos. **Resultados:** As concentrações urinárias do ácido málico, ácido quinurênico, ácido succínico, ácido úrico, creatinina e leucina diferem para as mulheres com CI/SBD comparado às mulheres sem queixas urinárias, sendo maior a concentração urinária do ácido úrico para tais mulheres sintomáticas. **Conclusão:** As mulheres portadoras de CI/SBD apresentam na urina uma diferença de metabólitos correlacionados ao metabolismo energético, os quais podem ser possíveis candidatos a biomarcadores para tal síndrome.

PALAVRAS-CHAVE: Cistite Intersticial, Síndrome da Bexiga Dolorosa, urina, metabólitos-alvo, metabolismo.

Abstract

Objectives: To compare urinary metabolites subsets of organic acids, acylcarnitines and amino acids, and creatinine among women with and without interstitial cystitis (IC)/Painful Bladder Syndrome (PBS). **Methods:** The medium flow of the first-morning urine from 20 women with IC and 20 healthy women (without urinary complaint) was collection and processed to obtain a sample filtrate. From this, the metabolites were extracted through protein precipitation method, followed by metabolites target analysis with Ultra-Performance Liquid Chromatography - Mass Spectrometry (UPLC-MS). Quantification of targeted metabolites was performed based on external calibrations curve of analytical standards and the data were evaluated by non-parametric statistical tests. **Results:** Urinary concentrations of malic acid, kynurenic acid, succinic acid, uric acid, creatinine and leucine differ for women with IC/PBS compared to women without urinary complaints, being a higher urinary uric acid concentration for symptomatic women. **Conclusion:** Women with IC/PBS have in urine a difference of metabolites correlated with energetic metabolism which may be candidates for biomarkers for this syndrome.

KEYWORDS: Interstitial Cystitis, Painful Bladder Syndrome, urine, target metabolites, metabolism

1 INTRODUÇÃO

A Cistite Intersticial (CI), também conhecida por Síndrome da Bexiga Dolorosa (SBD), é uma condição crônica de etiologia desconhecida, mais comum entre as mulheres adultas.^(1,2) Até o momento, os critérios de diagnóstico são baseados nos parâmetros clínicos, tais como dor pélvica, urgência e aumento da frequência miccional, além de avaliação de exames de urina, exame físico, estudo urodinâmico, cistoscopia, e biópsia da bexiga e uretra.^(3,4) Entretanto, tal avaliação serve para excluir ou diagnosticar outras disfunções com sintomas semelhantes, ^(1,3,5) tais como bexiga hiperativa ⁽¹⁻³⁾ e prolapso genital. ⁽¹⁾ Não há um diagnóstico exclusivo para CI, pois existem variações de sintomas entre os pacientes ⁽⁵⁻⁶⁾ e principalmente, mecanismos fisiopatológicos não bem elucidados para a disfunção miccional ⁽⁷⁾ e dor pélvica. ^(5,7)

De acordo com o número populacional de 2007, estimou-se cerca de 3,3 a 7,9 milhões de mulheres com possível diagnóstico de CI apenas nos Estados Unidos. ^(5,8) A CI/SBD leva a efeitos adversos à qualidade de vida. Em alguns aspectos, a dor pélvica da CI/SBD pode interferir na função física e atividade social, ⁽¹⁻⁹⁾ ou ser ainda, mais severa que hemodiálise em doença renal terminal. ^(4,5,10) A intensidade da dor também pode oscilar no decorrer do tempo, mas dificilmente se resolve por completo. ⁽⁸⁾ Além do mais, a dor crônica pode estar relacionada com desfechos comportamentais e mentais. ⁽⁶⁾ Convém relatar que, mulheres portadoras de CI/SBD exibem, comumente, ansiedade e depressão. ⁽¹¹⁾

O diagnóstico é realizado de acordo as diretrizes do *National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIDDK)*, *American Urological Association (AUA)* ⁽⁴⁻⁹⁻¹¹⁾ e *European Society for the Study of Interstitial Cystitis (ESSIC)*.^(3,10) Dentre os exames avaliativos, a cistoscopia é um exemplo de método padrão utilizado para observar glomerulações - hemorragia da submucosa - e lesões vesicais na bexiga denominadas de "Úlcera"/Lesão de Hunner, os quais são considerados achados para a CI/SBD. ^(3,10,12) Porém, a significância da presença de glomerulações não está clara ⁽⁴⁾ e as lesões de Hunner são encontradas somente em 5-10% dos casos com CI/SBD. ⁽¹²⁾

Evidências na literatura têm sugerido alteração epitelial da bexiga e/ou distúrbios imunológicos decorrentes do aumento da permeabilidade urotelial e da infiltração de mastócitos. ⁽⁹⁾ Nesse sentido, surgiram-se hipóteses relacionadas à

perda da camada de glicosaminoglicanos (GAGs), que é o principal componente da barreira impermeável do urotélio, que o protege contra constituintes urinários. ^(13,14) Existem também outras teorias para a CI/SBD, ⁽⁹⁻¹⁰⁾ como predisposição genética, mecanismos neurogênicos centrais e psicossomáticos, ⁽¹⁰⁾ no entanto, o processo fisiopatológico permanece ainda incerto, não favorecendo um diagnóstico específico e uma uniformidade de tratamento. ^(1,4) Atualmente, o tratamento inclui uso de medicações orais como antidepressivos tricíclicos, anti-histamínicos e pentosano polissulfato de sódio; e terapias intravesicais com dimetilsulfóxido (DMSO), heparina ou lidocaína; e moduladores imunológicos; ⁽⁴⁻¹¹⁾ os quais aliviam os sintomas, mas não curam a CI/SBD. ⁽⁹⁾

Nos últimos anos, tornou-se crescente o interesse da metabolômica urinária para a CI/SBD. ^(9,12,15,16) A metabolômica trata-se de um estudo dos metabólitos em um sistema biológico, ⁽¹⁷⁻¹⁸⁾ usando técnicas analíticas como a espectrometria de massas (MS), que através da medição de massas moleculares, ⁽¹⁸⁾ proporciona a melhor sensibilidade e seletividade na identificação dos metabólitos. ^(17,18) Convém relatar que a sensibilidade da MS é maior que da Ressonância Magnética Nuclear, outra técnica analítica aplicada à metabolômica. ⁽⁹⁾ O estudo dos metabólitos é importante para encontrar sutis alterações em vias biológicas, fornecendo informações sobre as condições fisiológicas anormais. ⁽¹⁸⁾ De fato, os metabólitos são pequenas moléculas envolvidas diretamente na atividade bioquímica das células, ⁽¹⁹⁾ sendo substratos e produtos de vários processos celulares, ⁽¹⁻⁵⁾ como na produção e armazenamento de energia, transdução de sinal e apoptose, regulação de mecanismos epigenéticos e construção de proteínas. ⁽¹⁸⁾ Alterações no nível metabólico podem ser prognóstico de uma doença, que frequentemente, está presente em fluídos biológicos como a urina. ⁽¹⁷⁾ Tal fluído pode ser obtido em grandes quantidades, de forma não invasiva ⁽¹⁷⁻⁵⁾ e com grande concentração de metabólitos, ⁽¹⁷⁾ tais como ureia, aminoácidos, sais inorgânicos, ácidos orgânicos, creatinina, amônia e toxinas dissolvidas em água. ⁽²⁰⁾ Além disso, a urina é o fluído mais próximo da bexiga, ⁽⁵⁾ o que reforça a necessidade avaliativa deste fluído para a CI/SBD.

De acordo com a literatura, a dor na bexiga e frequência miccional dos portadores de CI/SBD podem estar associadas à acentuada liberação de trifosfato de adenosina (ATP) e apoptose no urotélio. ^(21,22) Sabe-se que o urotélio da bexiga é formado por um epitélio de transição, ⁽¹³⁾ capaz de detectar e responder a estímulos

químicos, mecânicos e térmicos liberando ATP. ⁽²³⁾ O ATP é fonte de energia metabólica para as células vivas e atua como uma molécula sinalizadora extracelular em vários processos biológicos, tais como transporte iônico, apoptose e contração da bexiga. ⁽²⁴⁾ A estimulação de ATP também medeia a liberação de acetilcolinas, ⁽²³⁾ além de citocinas pró-inflamatórias através da ativação de receptores purinérgicos. ^(22,23,25) Tais citocinas via receptores uroteliais podem contribuir com a liberação de outros mediadores inflamatórios ou aminoácidos excitatórios, que podem afetar a função do reflexo da micção. ⁽²⁶⁾

A produção central de ATP é realizada na matriz mitocondrial pela oxidação de acetil-coenzima A (acetil-CoA) em dióxido de carbono (CO₂) no ciclo de ácidos tricarboxílicos (TCA), também denominado de Ciclo do Ácido Cítrico/ Ciclo de Krebs. ^(27,28) Estudo anterior propôs o ácido alfa-cetoglutarico como biomarcador para CI/SBD. Tal ácido é um importante intermediário do ciclo TCA. ⁽¹²⁾ Tal ciclo consiste em uma série de reações bioquímicas ⁽²⁹⁾ em que metabólitos intermediários - ácidos orgânicos - são fundamentais para o fluxo de carbono, ⁽²⁸⁻²⁹⁾ o qual produz os equivalentes redutores dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADH) e dinucleótido de flavina adenina (FADH₂), que participam da cadeia respiratória/cadeia transportadora de elétrons na membrana interna da mitocôndria, onde ocorre a fosforilação oxidativa – síntese de ATP. ^(29,30) As reações do ciclo TCA são catalisadas por enzimas mitocondriais, ⁽²⁸⁻²⁹⁾ as quais estão relacionadas com enzimas de outras vias metabólicas. O ciclo da ureia, por exemplo, está fortemente ligado ao ciclo TCA. ⁽²⁹⁾

O ciclo TCA também funciona como uma via biossintética, em que metabólitos intermediários são convertidos em glicose, ácidos graxos e aminoácidos não essenciais. ⁽²⁸⁾ De modo inverso, o catabolismo de aminoácidos essenciais promove a entrada de metabólitos intermediários com 4 e 5 carbonos no ciclo TCA. ^(27,28) A degradação de vários aminoácidos e ácidos graxos fornecem acetil-CoA para o metabolismo oxidativo, assim como o piruvato via glicólise ⁽²⁹⁾ ou via ácido láctico (lactato). ⁽²⁸⁾ Além disso, os aminoácidos são importantes precursores de hormônios, neurotransmissores e metabólitos especializados, como a creatinina. ⁽³¹⁾ Recentemente, alterações no metabolismo de aminoácidos foram identificadas para a CI/SBD tais como a histina, valina ⁽⁵⁾ e tiramida - produto do metabolismo da tirosina. ⁽¹²⁾

A oxidação de ácidos graxos de cadeia longa é uma das principais vias de entrada de acetil-CoA no ciclo TCA. ⁽³²⁾ Esse processo ocorre quando um grupo acil é ativado pela CoA e transferido à carnitina, formando uma acilcarnitina na membrana externa da mitocôndria. ^(32,33) Por sua vez, a acilcarnitina é transportada para membrana interna desta organela, na qual tem acesso ao sistema β -oxidação mitocondrial, e subsequente, liberação de acetil-CoA. ^(32,34,35) O aumento da acilcarnitina em relação à carnitina na urina pode indicar um desequilíbrio na homeostase mitocondrial, ⁽³⁵⁾ implicando na produção de ATP. ⁽³²⁾ As acilcarnitinas também são usadas como marcadores da oxidação de ácidos graxos mitocondriais, assim como, de distúrbios no metabolismo de ácidos orgânicos. ⁽³³⁾

Diante das reações e conexões das vias metabólicas do Ciclo TCA (Figura 1), observe-se que desordens neste ciclo podem ocasionar doenças incomuns de alta complexidade. ⁽²⁹⁾ A partir dos achados metabólicos para CI/SBD, e de suas correlações com vias envolvidas no metabolismo energético, ainda não estudadas para tal síndrome, o presente estudo buscou analisar metabólitos-alvo (metabólitos pré-selecionados) dos subconjuntos ácidos orgânicos, aminoácidos, acilcarnitinas, além de creatinina na urina de mulheres com CI/SBD, a fim de auxiliar na compreensão fisiológica desta síndrome.

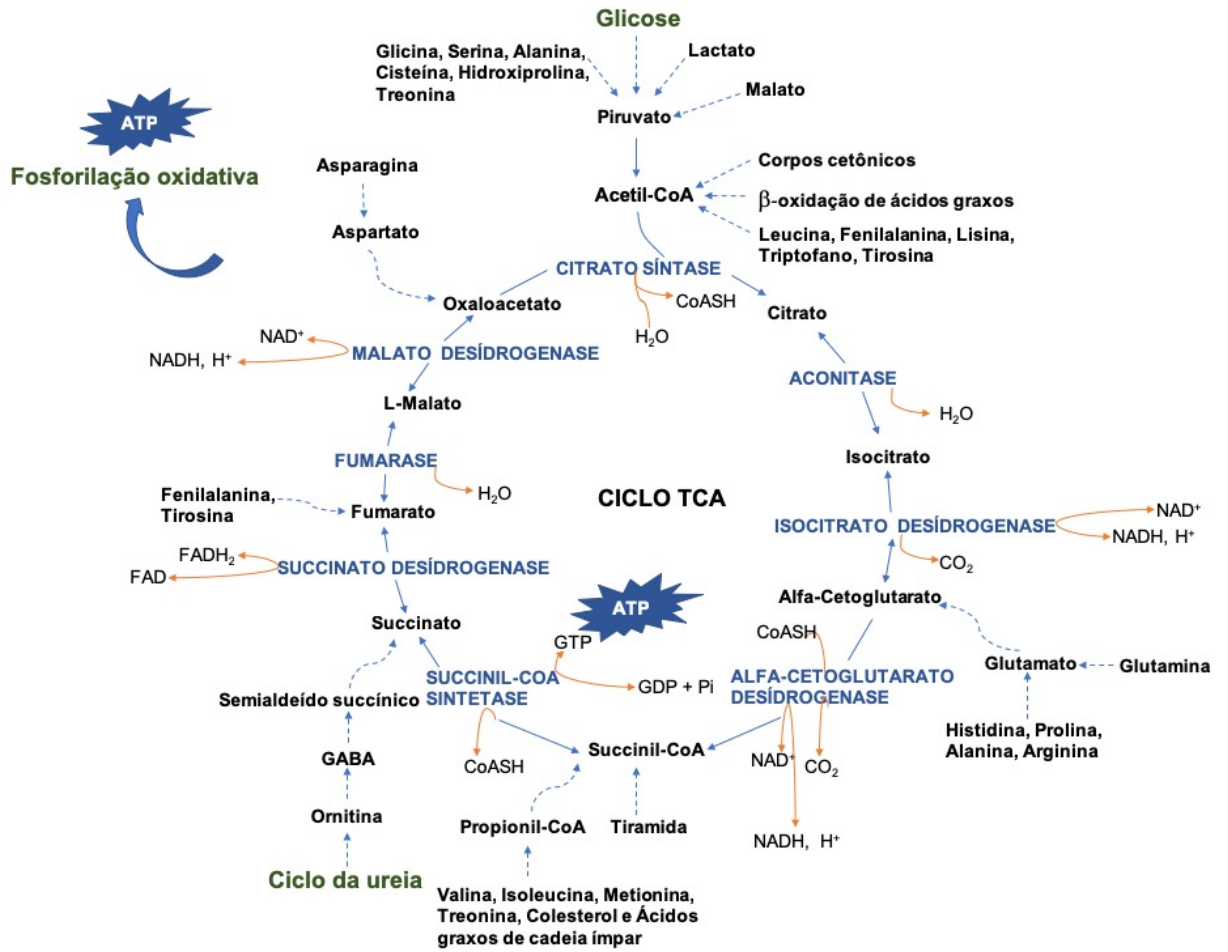


Figura 1. Reações e conexões das vias metabólicas do Ciclo TCA. Fonte: Adaptado de Rustin et al., (1997)

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Comparar metabólitos urinários de mulheres com e sem CI/SBD.

2.2 Objetivo específico

- Avaliar metabólitos-alvo urinários pertencentes aos subconjuntos de ácidos orgânicos, acilcarnitinas e aminoácidos, correlacionados ao metabolismo energético, além da creatinina.

3 MÉTODOS

3.1 Reagentes e solventes

Todas as substâncias utilizadas neste estudo foram adquiridas da LiChrosolv® (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), exceto aquelas especificadas no texto.

3.2 População de estudo e coleta de amostras de urina

O estudo consistiu em coletar uma amostra urinária de 20 mulheres portadoras de CI/SBD (grupo experimental) e 20 mulheres saudáveis (grupo controle). Todas as mulheres foram recrutadas por divulgação em rede social ou convidadas durante consulta médica. O diagnóstico das mulheres com CI/SBD foi realizado por exclusão após avaliar a história da paciente, exame físico e exames de urina tipo 1, urocultura e em alguns casos citoscopia e estudo urodinâmico. O grupo controle foi composto por mulheres sem queixas urinárias, com idade semelhante às pacientes do grupo CI/SBD.

Aquelas que aceitaram participar voluntariamente deste estudo assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 1), aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) sob o número do parecer 0908/2016. Para participação neste estudo, seguiu-se os seguintes critérios:

➤ **Critérios de inclusão:**

- Grupo experimental: Mulheres com idade entre 25-65 anos, com diagnóstico clínico de cistite intersticial, sem tratamento e com sintomas bem caracterizados há mais de seis meses.
- Grupo controle: Mulheres saudáveis com idade entre 25-65 anos, sem queixas urinárias.

➤ **Critérios de exclusão:**

Infecção urinária, tratamento de tumor de bexiga nos últimos 3 anos, radioterapia pélvica, gravidez, litíase urinária e história de tuberculose urinária.

Para a coleta de amostras, o jato médio de urina da primeira micção do dia foi coletado em frasco estéril de 50mL, seguindo orientações de higienização. Tais amostras foram acondicionadas em uma caixa de isopor com gelo e transportadas para o laboratório de pesquisa, onde foi efetuado o processamento do material.

3.2.1 Processamento das amostras de urina

As amostras de urina foram centrifugadas, em temperatura ambiente (25 °C), à 4000xg por 20 minutos, a fim de remover células e detritos. O *pellet* foi descartado e o sobrenadante foi transferido para um tubo de ultrafiltração da Amicon-15 com membrana de 3kDa (Merck, EMD Millipore, Billerica, MA, EUA), seguido de centrifugação à 4000xg por 40 minutos. O filtrado obtido foi alicotado em microtubos de 1mL e armazenados a -20 °C para análise posterior.

3.2.2 Extração dos metabólitos por método de precipitação de proteínas

Uma alíquota de 1mL de cada amostra foi descongelada, colocando-a no agitador de tubos por 1 minuto. A precipitação das proteínas foi realizada na proporção de 1:3, v/v, sendo 100 µL amostra: 300 µL da solução Metanol/Etanol 100% (1:1, v/v), resfriado a -20°C. Em seguida, a mistura foi homogeneizada no agitador de tubos por 1 minuto, seguindo a incubação em gelo por 5 minutos. Novamente, a mistura foi levada ao agitador de tubos por alguns segundos e centrifugada à 15700xg por 20 minutos em temperatura de 4°C. Um anel branco de proteína precipitada foi formado na superfície e 200µL abaixo disso foi retirado e transferido para um redutor de volume - *insert* (*Chromastore*, São Paulo, SP, Brasil) acoplado a um vial (*Chromastore*, São Paulo, SP, Brasil). Esse método de extração foi desenvolvido pelo *Centro de Excelencia en Metabómica y Bioanalysis CEMBIO, Universidad San Pablo CEU*, Madrid, Espanha. Tal procedimento foi realizado na Associação Beneficente de Coleta de Sangue - COLSAN, São Paulo, SP, Brasil.

3.2.3 Calibração e controle de qualidade

Antes do início da análise, amostras de branco (BCO) foram preparadas com os mesmos solventes utilizados na extração dos metabólitos, Metanol/Etanol 100% (1:1, v/v), para verificar possíveis impurezas e contaminações. Além disso, amostras de controle de qualidade (CQ) foram preparadas com um *pool* das alíquotas de todas as amostras, a fim de verificar a sensibilidade do equipamento, bem como a tendência da injeção. Ambas as soluções foram transferidas para o *insert* acoplado a um vial, como descrito no tópico acima.

3.2.4 Metabólitos-alvo na urina

A análise de metabólitos-alvo da urina foi realizada na COLSAN - SP, no qual foram avaliados os seguintes subconjuntos e seus respectivos metabólitos:

- **Ácidos orgânicos:** Ácido alfa-cetoglutárico (alfa-cetoglutarato), Ácido láctico (lactato), Ácido málico (malato), Ácido quinurênico, Ácido succínico (succinato) e Ácido úrico;
- **Acilcarnitinas:** Acetilcarnitina (C2) e Octanoilcarnitina (C8);
- **Aminoácidos:** Alanina (ALA), Arginina (ARG), Asparagina (ASN), Aspartato (ASP), Cisteína (CYS), Cistina, Fenilalanina (PHE), Glicina (GLY), Glutamato (GLU), Glutamina (GLN), Hidroxiprolina (HO-PRO), Histidina (HIS), Isoleucina (ILE), Leucina (LEU), Lisina (LYS), Metionina (MET), Prolina (PRO), Serina (SER), Tirosina (TYR), Treonina (THR), Triptofano (TRP) e Valina (VAL);
- **Composto de degradação:** Creatinina.

3.2.4.1 Análise metabolômica por Cromatografia Líquida de Ultra Performance acoplada à espectrometria de massas (UHPLC-MS) com UF-Qarray™

A análise metabolômica foi realizada em um cromatógrafo líquido de ultra performance (UHPLC) Nexera X2 com bomba LC-30AD e amostrador automático modelo SIL-30AC, acoplado ao espectrômetro de massas (MS) LCMS-8060, da *Shimadzu Prominence LC System* (Kyoto, Japan).

No sistema de cromatografia, a eluição foi realizada por gradiente com solvente A composto de 100% água ultrapura Milli-Q e 0,1% de ácido fórmico (*Carlo Erba*, Val-

de-Reuil, França), e solvente B composto de 100% de acetonitrila e 0,1% de ácido fórmico. A injeção foi de 0,2 μ L para os metabólitos, porém com fluxo total de 0,4 mL/min para os aminoácidos e 0,3 mL/min para as acilcarnitinas, ácidos orgânicos e creatinina, com temperatura da coluna estabilizada à 40°C. A coluna utilizada foi a ultra PFP com comprimento de 100mm, diâmetro interno 2,1mm e tamanho de partícula de 3 μ m (*Restek*, Bellefonte, PA, EUA) para os aminoácidos, e ácidos orgânicos e creatinina. Logo, a coluna C18 com comprimento de 50mm, diâmetro interno de 2mm e tamanho da partícula de 5 μ m (*Gemini Phenomenex*, Torrance, Califórnia, EUA) foi utilizada para a análise das acilcarnitinas. Por sua vez, cada coluna foi conectada diretamente à interface Eletrospray (ESI) do equipamento para a ionização, seguido da separação dos analitos.

Na ionização da fonte ESI, os parâmetros foram definidos com tensão da fonte de íon spray em 4kV, gás nebulizante em 3.0L/min, gás secante em 10.0L/min e temperatura à 250°C. A aquisição foi realizada no modo positivo (ESI+) para os aminoácidos e acilcarnitinas, e no modo positivo (ESI+) e negativo (ESI-) para os ácidos orgânicos e creatinina. A precisão de massa foi de $\pm 0,1$ Da. Os íons foram separados de acordo com a razão massa/carga (m/z), em um intervalo m/z de 2-2000Da e submetidos ao analisador de massas Triplo Quadrupolo (QqQ). Os íons precursores de interesse foram selecionados no primeiro quadrupolo (Q1), seguido da dissociação induzida por colisão com Argônio (Ar). A partir disso, os íons produtos foram selecionados no terceiro quadrupolo (Q3). Utilizou-se o Monitoramento de Reação Múltipla (MRM), em que os compostos foram constantemente monitorados, obtendo a transição de m/z específica de cada analito. A transição de m/z monitorada e o tempo de retenção permitiram a identificação dos metabólitos-alvo nas amostras estudadas. A aquisição e o processamento de dados foram realizados pelo *software LabSolutions LCMS versão 5.8 (Shimadzu Corporation)*, o qual permitiu o controle em tempo real.

3.2.4.2 Quantificação dos metabólitos-alvo por curva de calibração externa

A quantificação dos metabólitos-alvo foi realizada pela construção de curvas de calibração externa. Para verificar a linearidade de cada curva foi necessário medir 6 pontos experimentais (sinais analíticos) de soluções padrões em diferentes

concentrações para compará-los às concentrações desconhecidas dos analitos. Tais padrões foram preparados a partir de uma solução padrão estoque contendo a concentração conhecida de cada metabólito-alvo diluído em metanol:etanol ultrapuro (1:1, v/v). Esta mistura foi feita a partir das soluções de acilcarnitinas, aminoácidos, ácidos orgânicos e creatinina (*Sigma Aldrich*. St. Louis, MO, EUA). O nível de concentração de cada analito na amostra foi calculado por método dos mínimos quadrados, obtendo-se uma curva linear dentro de um limite de calibração de 0,95 a 7,6nM para as acilcarnitinas, 0,2 a 100µM para os aminoácidos e de 1 a 1000µM para os ácidos orgânicos e creatinina. As concentrações molares dos respectivos metabólitos-alvo foram exportadas do *Quantitative Browser* do *software LabSolutions LCMS* para o *software Excel*.

3.3 Análise estatística

Os dados foram previamente organizados no *software Microsoft Office Excel* e analisados no *software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS)*, versão 18.0 (SPSS Inc Chicago, EUA). Um valor extremo da MET, PRO, HO-PRO e ácido succínico do grupo de CI/SBD foram removidos na análise estatística por estar fora da normalidade dos demais dados. A distribuição dos dados foi avaliada por estatísticas descritivas, dentre as quais incluíram-se média, mediana, intervalo interquartil, dentre outros. Para comparar os metabólitos com suas respectivas concentrações foram utilizados os testes não-paramétrico de U de Mann-Whitney para averiguar as igualdades das medianas e W de Wilcoxon para classificar as posições (soma de postos/*ranks*) de cada metabólito entre os grupos controle e CI/SBD. O nível de significância adotado foi de 5% ($\alpha=0,05$), obtido a partir da estatística estandardizada Z (z-score).

4 RESULTADOS

4.1 Características das participantes

O estudo foi composto por 40 mulheres voluntárias, sendo 20 mulheres com CI/SBD com média de idade de $44,10 \pm 11,72$ anos (Média \pm DP) e 20 mulheres sem queixas urinárias com média de idade de $39,70 \pm 13,51$ (Média \pm DP). As mulheres com CI/SBD apresentavam um tempo de início dos sintomas entre 1,5 a 18 anos, com média de 4,9 anos.

Todas as mulheres com CI/SBD que participaram deste estudo já realizaram exames de urina 1, urocultura e exame físico. Algumas mulheres (n=9) relataram sentir dor no períneo (20%), períneo e lombar (20%), e lombar (5%), além da bexiga. Além disso, 18 (90%) e 13 (65%) destas pacientes já fizeram o estudo urodinâmico e a cistoscopia, respectivamente.

As mulheres com CI/SBD também relataram que já tentaram os seguintes tratamentos:

- Analgésico e antidepressivo;
- Terapia intravesical com DMSO, heparina ou ácido hialurônico (*Cystistat*);
- Aplicação de Botox;
- Remédios homeopáticos;
- Fisioterapia;
- Dieta alimentar.

4.2 Identificação e quantificação dos metabólitos-alvo

Os metabólitos-alvo foram selecionados e identificados pela transição de massa e tempo de retenção (Tabela 1).

Tabela 1. Metabólitos-alvo com suas respectivas transições de massa e tempo de retenção em modo MRM.

Metabólitos	Transição de massa/carga (<i>m/z</i>)		Tempo de retenção (min)
	Íon precursor <i>m/z</i>	Íon produto <i>m/z</i>	
Alanina (ALA)	90,10	44,00	0,685
Arginina (ARG)	175,00	70,00	0,637
Asparagina (ASN)	133,00	74,10	0,670
Aspartato (ASP)	134,00	74,05	0,690
Cisteína (CYS)	122,00	59,25	0,675
Cistina	240,90	73,95	0,655
Fenilalanina (PHE)	165,80	120,05	3,101
Glicina (GLY)	76,10	30,10	0,660
Glutamato (GLU)	147,80	84,05	0,700
Glutamina (GLN)	147,10	41,00	0,683
Hidroxiprolina (HO-PRO)	132,00	68,05	0,705
Histidina (HIS)	156,40	110,30	0,670
Isoleucina (ILE)	132,00	44,00	1,047
Leucina (LEU)	132,00	30,05	1,388
Lisina (LYS)	147,00	84,05	0,684
Metionina (MET)	150,00	61,05	1,062
Prolina (PRO)	116,00	70,00	0,798
Serina (SER)	106,10	60,05	0,660
Tirosina (TYR)	181,80	91,05	1,242
Treonina (THR)	120,00	74,00	0,693
Triptofano (TRP)	205,00	188,05	3,933
Valina (VAL)	118,00	72,00	0,919
Ácido alfa-cetoglutárico	145,20	100,95	1,305
Ácido láctico	89,15	42,90	1,278
Ácido málico	133,20	114,85	1,235
Ácido succínico	117,00	73,00	1,330
Ácido quinurênico	189,95	88,95	4,526
Ácido úrico	166,90	124,00	1,247
Creatinina	114,15	42,95	1,025
Acetilcarnitina (C2)	207,10	85,00	0,477
Octanoilcarnitina (C8)	291,20	85,05	2,299

Nota: min=minuto

A partir disso, as concentrações dos metabólitos foram quantificadas conforme a construção das curvas de calibração externa, sendo que algumas concentrações do ácido úrico excederam o limite de calibração (>1000) e tiveram o seu valor estimado. (Anexo 2 A e B). Os testes estatísticos permitiram comparar os valores medianos das concentrações de cada metabólito entre os grupos controle e CI/SBD (Tabela 2). As concentrações medianas dos metabólitos (leucina, creatinina, ácido málico, ácido quinurênico, ácido succínico e ácido úrico) que diferiram entre os grupos controle e CI/SBD podem ser observados junto ao intervalo interquartilico, o qual melhor explica a disseminação das concentrações do metabólito em torno da sua concentração mediana (Tabela 3). Tal intervalo é a diferença entre a mediana da metade superior (Q3) e a mediana da metade inferior (Q1).

Tabela 2. Valores estatísticos dos testes de U de Mann Whitney e W de Wilcoxon, e z-score com o respectivo p-valor na comparação da concentração mediana de cada metabólito entre os grupos controle e CI/SBD

Metabólitos	U de Mann-Whitney	Wilcoxon W	Z	p-valor
Alanina (ALA)	185,00	395,00	-0,1405	0,8883
Arginina (ARG)	168,00	339,00	-0,3508	0,7257
Asparagina (ASN)	172,00	382,00	-0,7574	0,4488
Aspartato (ASP)	176,00	386,00	-0,6492	0,5162
Cisteína (CYS)	39,50	84,50	-1,0308	0,3026
Cistina	155,00	365,00	-1,2173	0,2235
Fenilalanina (PHE)	124,00	334,00	-1,4019	0,1609
Glicina (GLY)	182,00	392,00	-0,4869	0,6263
Glutamato (GLU)	132,00	342,00	-1,4033	0,1605
Glutamina (GLN)	177,00	387,00	-0,6222	0,5338
Hidroxiprolina (HO-PRO)	144,00	334,00	-0,2649	0,7911
Histidina (HIS)	174,00	384,00	-0,7033	0,4819
Isoleucina (ILE)	115,00	325,00	-1,9003	0,0574
Leucina (LEU)	70,00	241,00	-2,1273	0,0334
Lisina (LYS)	186,00	396,00	-0,3787	0,7049
Metionina (MET)	97,00	287,00	-1,8212	0,0686
Prolina (PRO)	142,50	278,50	-0,3146	0,7531
Serina (SER)	185,00	395,00	-0,4058	0,6849
Tirosina (TYR)	199,00	409,00	-0,0271	0,9784
Treonina (THR)	188,00	398,00	-0,3246	0,7455
Triptofano (TRP)	186,00	396,00	-0,3787	0,7049
Valina (VAL)	167,00	377,00	-0,8927	0,3720
Ácido alfa-cetoglutárico	162,00	372,00	-0,5262	0,5987
Ácido láctico	163,00	373,00	-0,7586	0,4481
Ácido málico	103,00	313,00	-2,6239	0,0087
Ácido quinurênico	122,00	332,00	-2,1099	0,0349
Ácido succínico	45,00	216,00	-3,9468	<0,0001
Ácido úrico	106,00	316,00	-2,5427	0,0110
Creatinina	110,00	320,00	-2,4345	0,0149
Acetilcarnitina (C2)	144,50	354,50	-1,5018	0,1331
Octanoilcarnitina (C8)	157,00	328,00	-0,4254	0,6705

Nota: p-valor<0,05; os metabólitos em azul são estatisticamente diferentes entre os grupos controle e CI/SBD

Tabela 3. Comparação da distribuição das concentrações dos metabólitos que diferiram entre os grupos controle (CONT) e CI/SBD, conforme a mediana e o intervalo interquartilico

Metabólitos	Mediana		Intervalo Interquartilico		p-valor
	CONT	CI/SBD	CONT	CI/SBD	
Leucina (LEU)	25,77	14,71	32,06	18,73	0,0334
Creatinina	272,99	221,86	164,39	107,84	0,0149
Ácido málico	4,85	2,68	6,88	2,93	0,0087
Ácido quinurênico	105,27	79,03	41,12	53,90	0,0349
Ácido succínico	17,76	8,01	20,25	5,92	<0,0001
Ácido úrico	726,46	1074,03	490,27	616,26	0,0110

Nota: p-valor <0,05; concentração em microMolar (μM)

De acordo com os dados acima, observa-se que a maioria dos ácidos orgânicos avaliados foram diferentes para as mulheres com CI/SBD em relação ao grupo controle. As concentrações urinárias do ácido málico, ácido succínico e ácido quinurênico foram significativamente ($p<0,05$) menores no grupo de CI/SBD, exceto a

concentração do ácido úrico, o qual foi maior para este grupo. Da mesma forma, a leucina e creatinina demonstraram diferenças significativas, com menor concentração na urina das mulheres com CI/SBD. As distribuições destes metabólitos entre os grupos podem ser observadas pelos gráficos *Boxplots*, também chamado de gráfico de caixa (Figura 2).

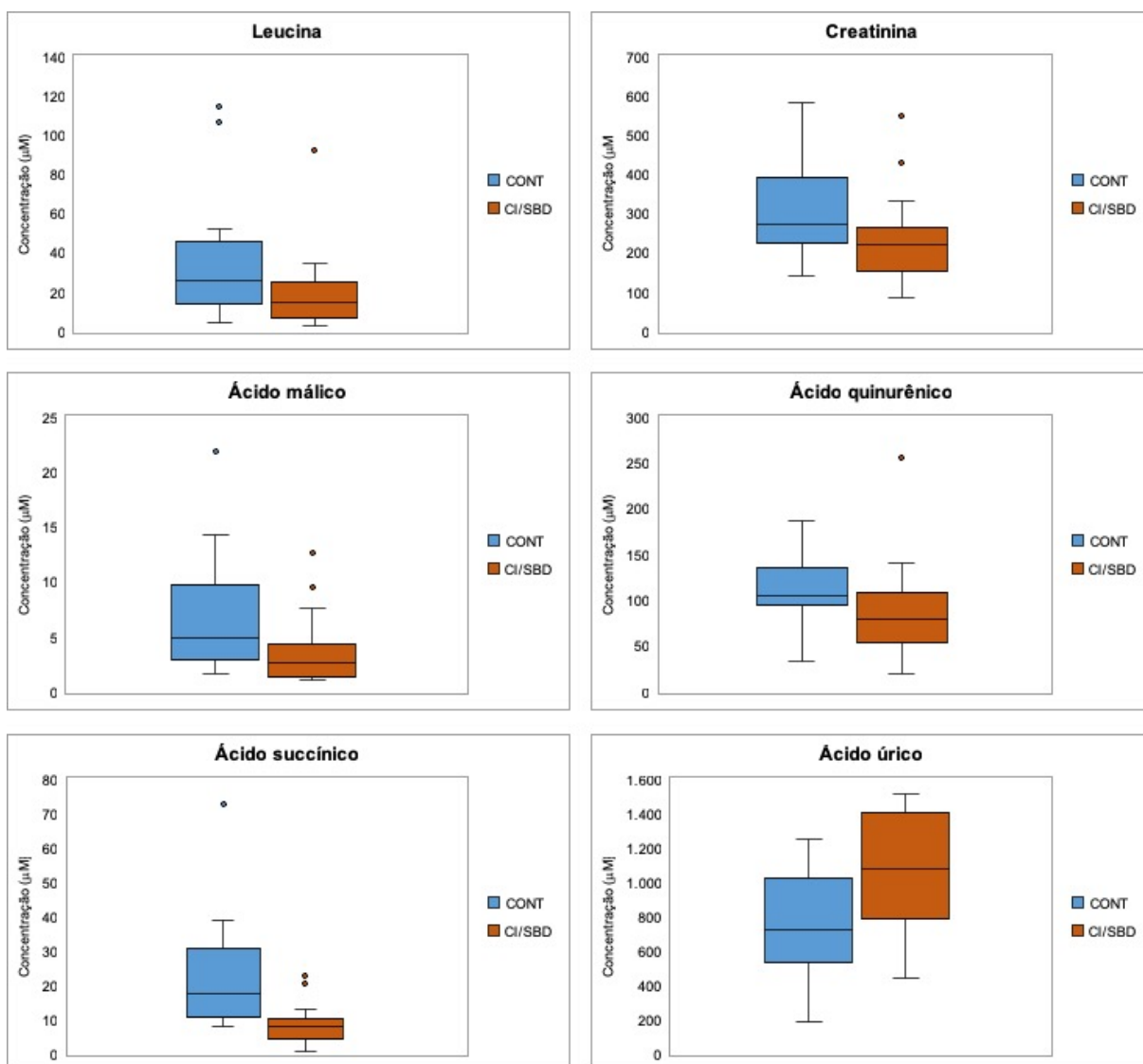


Figura 2. Comparação de *boxplots* das concentrações dos metabólitos estatisticamente diferente entre os grupos controle (CONT) e CI/SBD. Grupos comparados pelos testes U de Mann Whitney e W de Wilcoxon

5 DISCUSSÃO

O presente estudo buscou informações sobre alterações em vias metabólicas associadas à produção de energia mitocondrial para a CI/SBD. Neste estudo foram avaliados 31 metabólitos-alvo entre os subconjuntos de ácidos orgânicos, acilcarnitinas e aminoácidos, além de creatinina, que de certa forma, estão correlacionados ao metabolismo energético. Tais metabólitos foram analisados na urina de mulheres com e sem CI/SBD, a fim de obter maiores conhecimentos sobre os mecanismos moleculares que possam auxiliar na determinação da fisiopatologia e do diagnóstico desta síndrome.

Alguns estudos têm considerado o papel neurotransmissor do ATP na bexiga dos portadores de CI/SBD, ⁽²¹⁻²²⁾ além de alterações urinárias de aminoácidos e ácidos orgânicos. ^(5,12) Há, no entanto, falta de conhecimento sobre o impacto das disfunções mitocondriais envolvendo metabólitos para tal condição. Sabe-se que o ciclo TCA é crucial na regulação da homeostase energética e metabolismo celular. ⁽³⁶⁾ Nossos dados sugerem um desequilíbrio no ciclo TCA para as mulheres com CI/SBD, dentre os quais estão os metabólitos intermediários, ácido succínico (succinato) e ácido málico (malato).

O ácido succínico é formado a partir da succinil-coenzima A (succinil-CoA) pela succinil-CoA sintetase, subsequentemente convertido em fumarato pela succinato desidrogenase no ciclo TCA. ⁽³⁷⁾ Tal ácido também pode entrar neste ciclo pela conversão do semialdeído succínico via semialdeído succínico desidrogenase. ⁽³⁸⁾ Por sua vez, o semialdeído succínico é formado pela GABA transaminase, ⁽²⁹⁻³⁸⁾ a qual está associada com o ciclo da ureia. ⁽²⁹⁾ Além disso, o ácido succínico é um ligante fisiológico do receptor acoplado à proteína G-91(GPR91), atualmente chamada de receptor do succinato 1 (SUCNR1), ⁽³⁷⁻³⁸⁻⁴⁰⁾ que compartilha alta homologia com receptores purinérgicos P2Y e é considerado um receptor de perturbações energéticas. ⁽³⁷⁾ Entretanto, tal receptor pode estimular a liberação da enzima renina nos rins, que é fundamental para o sistema renina-angiotensina, o qual regula a pressão arterial. ^(36,37,38,39,40) Esse receptor pode ser uma ligação entre a homeostase energética e regulação hemodinâmica. ⁽³⁶⁾

A produção e liberação do ácido succínico podem ser afetadas pelo balanço energético. ^(37,40) Estudos têm demonstrado uma menor concentração urinária de

ácido succínico em doenças renais crônicas ⁽⁴¹⁾ e doenças inflamatórias intestinais (Doença de Crohn e Colite ulcerativa). Este último estudo relatou que há diminuição dos níveis de ácido succínico e creatina, que é reservatório de energia, relacionados à alta demanda energética e rápida utilização dos metabólitos. ⁽⁴²⁾ Embora a creatina não tenha sido avaliada para CI/SBD, alteração desta interfere no nível da creatinina, ⁽⁴³⁾ o que pode justificar também o declínio deste metabólito urinário para as mulheres com CI/SBD.

Alterações metabólicas em torno do ácido succínico podem influenciar os níveis de succinil-CoA. Uma das vias de entrada da succinil-CoA no ciclo TCA é através da propionil-CoA, que quando elevada pode provocar anormalidades metabólicas secundárias, inibindo etapas do ciclo da ureia e da gliconeogênese. ⁽³⁸⁾ Alterações enzimáticas mitocondriais também podem gerar mudanças no nível de metabólitos intermediários. ^(29,38,40) Enzimas do ciclo TCA estão suscetíveis à mutação que conduzem doenças, ⁽²⁹⁻³⁸⁾ incluindo estresse oxidativo e hipóxia. ⁽³⁸⁾ A succinato desidrogenase, conhecida por complexo II, é dependente de oxigênio para a sua manutenção eletroquímica. ^(37,38) Baixas tensões de oxigênio levam à inibição da succinato desidrogenase, que implica no aumento de ácido succínico intracelular, ⁽³⁷⁾ o qual indiretamente está relacionado com a elevação da propionil-CoA. ⁽³⁸⁾ Sucessivas diminuições e aumentos de oxigênio causam lesões mitocondriais, as quais podem ser controladas pelo metabolismo anaeróbico de metabólitos específicos do ciclo TCA, ⁽³⁸⁻⁴⁰⁻⁴⁴⁾ como ácido succínico ⁽³⁸⁻⁴⁰⁾ e ácido alfa-cetoglutárico (alfa-cetogluarato/2-oxogluarato). ^(40,44)

Convém relatar que pesquisadores têm revelado um aumento da concentração urinária do ácido alfa-cetoglutárico em mulheres com CI/SBD, ⁽⁵⁻¹²⁻²⁰⁾ correlacionando-o à supressão da proliferação das células epiteliais da bexiga. ^(12,20) Porém, o nosso estudo não encontrou alteração significativa do nível urinário deste para CI, e nem mesmo dos seus precursores glutamato e glutamina. De modo geral, o alfa-cetoglutárico contribui para a oxidação dos aminoácidos, além de reagir diretamente com o peróxido de hidrogênio para formação do ácido succínico. ⁽⁴⁵⁾ Segundo Rustin et al., ⁽²⁹⁾ a excreção urinária normal do ácido alfa-cetoglutárico é indicativa de que parte do ciclo TCA está metabolizando o piruvato.

O ácido málico é outro importante metabólito intermediário do ciclo TCA, formado a partir do fumarato. ⁽²⁹⁾ Esse ácido participa do sistema malato/aspartato

transportando elétrons dos equivalentes redutores, como NADH, do citosol à membrana mitocondrial interna. ⁽⁴⁶⁾ O ácido málico também é utilizado como molécula única de combustível para acelerar o ciclo TCA, sendo fonte de piruvato e oxaloacetato, os quais são catalisados pela enzima málica e malato desidrogenase respectivamente. ⁽²⁹⁾ De acordo com a literatura, a deficiência no catabolismo do ácido málico pode estar envolvida com bactérias, como a *Streptococcus agalactiae*, ⁽⁴⁷⁾ presente na cistite aguda, bacteriúria assintomática ⁽⁴⁷⁻⁴⁸⁾ e pielonefrite. ⁽⁴⁸⁾ Um estudo demonstrou que cepas de *Streptococcus agalactiae* causadoras da cistite aguda crescem muito pouco na urina, em comparação às *Streptococcus agalactiae* causadoras da bacteriúria assintomática. ⁽⁴⁷⁾ Porém, tais bactérias uropatogênicas são capazes de invadir as células uroteliais e modular as respostas imunes do hospedeiro na bexiga. ^(47,48) Embora pouco elucidado as diferenças do crescimento na urina, ⁽⁴⁷⁾ pesquisadores acreditam que algumas linhagens de *Streptococcus agalactiae* utilizam o ácido málico através da enzima málica para gerar piruvato, e conseqüentemente, sobreviver em pH mais baixo. ^(47,49)

Atualmente, há ausência de infecção bacteriana para CI/SBD, no entanto, não está descartado a possibilidade de existir uma contribuição destes agentes para tal condição. ^(10,50) A dor pélvica da CI/SBD já esteve associada à alteração da microbiota intestinal, em que houve aumento da bactéria *Eggerthella lenta*. ⁽⁵¹⁾ Apesar de ser parte do microbioma humano normal, tal bactéria é considerada um patógeno com histórico de difícil identificação fenotípica. ⁽⁵²⁾ Sabe-se que o metaboloma da microbiota intestinal interage com o metaboloma do hospedeiro, mas tal interação ainda é pouco elucidada. ⁽⁵³⁾

Em outros aspectos, a CI/SBD humana é similar com a CI/SBD felina. O urotélio de gatos com CI/SBD apresentam redução dos pequenos proteoglicanos ricos em leucina, que são formados por uma proteína central ligada a um ou dois glicosaminoglicanos (GAGs). ⁽⁵⁴⁾ Evidências histopatológicas têm demonstrado uma deficiência da camada de GAGs na mucosa da bexiga humana com CI/SBD. ^(13,22,54) Tal camada sofre alteração devido à apoptose que libera ATP, o qual estimula receptores purinérgicos P2, que conseqüentemente, aumentam a ativação nervosa da bexiga. ⁽²²⁾ Assim como na CI/SBD, estudos identificaram um menor nível urinário de leucina e ácido quinurênico durante a evolução da fibrose hepática, os quais afetavam o ciclo TCA. ⁽⁵⁵⁾ A leucina é aminoácido de cadeia ramificada com oxidação

terminal através do acetoacetato para acetil-CoA, com subsequente oxidação no ciclo TCA.^(28,29) Segundo Ravena et al.,⁽⁵⁶⁾ a leucina é capaz de melhorar o estresse energético reduzindo indiretamente a fosforilação da proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina (AMPK), que é uma proteína que estimula processos catabólicos, como a glicose, que atuam contra a restrição de energia.

O ácido quinurênico tem capacidade de influenciar parâmetros respiratórios mitocondriais, descritos até então, para o cérebro coração e fígado. Para o coração, por exemplo, estudos indicaram que o aumento da síntese de ácido quinurênico pode ser capaz de reduzir a síntese de ATP.⁽⁵⁷⁾ Esse ácido é um metabólito chave do catabolismo do triptofano via quinurenina,⁽⁵⁵⁻⁵⁷⁾ além de ser um importante antagonista dos receptores de aminoácidos excitatórios,⁽²⁶⁻⁵⁷⁾ os quais podem ser liberados por citocinas via expressão de receptores em células uroteliais.⁽²⁶⁾ Além disso, o ácido quinurênico é um antioxidante endógeno, que elimina os radicais hidroxila e peroxinitrito.⁽⁵⁵⁾ Tal ácido é também um ligante do receptor acoplado à proteína G-35 (GPR35), que inibe o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α)⁽⁵⁵⁾ liberado por macrófagos em condições inflamatórias.^(54,55) Assim, pesquisadores acreditam que o ácido quinurênico atua como um anti-inflamatório.⁽⁵⁵⁾ Convém relatar que o nosso estudo não encontrou alteração significativa do triptofano para a CI/SBD, mas alterações plasmáticas deste foram evidenciadas em gatos com CI/SBD,⁽⁵⁸⁾ no entanto, sem descrição do seu papel fisiopatológico.

Estudos têm confirmado a presença de macrófagos⁽⁵⁹⁾ e mastócitos no urotélio de pacientes com CI/SBD.^(7,9,59) Os macrófagos englobam os restos celulares e degradam o ácido desoxirribonucleico (DNA), produzindo ácido úrico.⁽⁶⁰⁾ Pesquisadores revelaram que a concentração aumentada do ácido úrico pode gerar um estresse oxidativo mitocondrial, resultando na inibição de processos no ciclo TCA, além de levar à formação de cálculos na bexiga.⁽⁶⁰⁾ Nossos dados demonstraram um aumento significativo da concentração de ácido úrico na urina das mulheres com CI/SBD. O ácido úrico é o composto final do catabolismo de purinas, as quais contribuem com a modulação do metabolismo energético e transdução de sinal.⁽⁶¹⁾ A elevação da concentração do ácido úrico também pode estar combinada com a degradação de ATP durante o metabolismo da frutose,⁽⁶²⁻⁶³⁻⁶⁴⁾ em que o monofosfato de adenosina (AMP) gerado entra na via de degradação da purina por ativação da AMP desaminase, causando à síntese de ácido úrico.⁽⁶²⁾ Outros pesquisadores

relataram que a produção excessiva de creatinina também resulta no aumento da degradação de S-adenosilmetionina e ATP, seguido do aumento da concentração do ácido úrico. ⁽⁶³⁾ Porém, como relatado anteriormente, não houve aumento da creatinina urinária para a CI/SBD.

É relevante relatar que existe uma dificuldade de se normalizar níveis das amostras, em razão das diferenças fisiológicas entre indivíduos estudados. Comumente as amostras são normalizadas a partir da creatinina, mas suposição sobre a secreção deste metabólito é constante e ainda pode variar conforme a resposta à doença. ^(65,66) Da mesma forma que outros pesquisadores, ⁽⁶⁶⁾ optamos em não normalizar as amostras por creatinina e sim pela uniformidade de diluição, pois como visto, esse metabólito também foi avaliado para a CI/SBD.

Vários estudos propuseram uma proporcionalidade constante entre o nível de creatinina e a quantidade de tecido corporal. ⁽⁴³⁾ Porém, alterações no nível de creatinina em fluídos biológicos são indicativos de disfunções renais. ^(43,67,68) A creatinina é produto final do metabolismo da creatina, ⁽⁴³⁻⁶⁷⁾ que é importante no fornecimento de energia ao músculo, ⁽⁶⁷⁾ além de ser um componente do metabolismo da arginina que faz parte do ciclo da ureia. Assim, alterações neste ciclo interferem no metabolismo da creatina. ⁽⁶⁹⁾

Bactérias e fungos, bem como bactérias da microbiota, são capazes de degradar tanto a creatina como a creatinina na urina e nas fezes. ⁽⁴³⁾ Em insuficiência renal, o crescimento bacteriano no intestino delgado leva à alta concentração de metilaminas tóxicas e ao alto consumo de creatinina nas fezes. ⁽⁶⁸⁾ Pesquisadores demonstraram *in vitro* que o processo de ciclização da creatina para creatinina é dependente de pH e temperatura, sendo que a creatinina é beneficiada pela temperatura alta e soluções ácidas. ⁽⁴³⁾ Ressalta-se que o ácido úrico é mais favorável em meio alcalino. ⁽⁷⁰⁾ Esses fatos nos remetem à reflexão sobre as bactérias dependentes de pH alcalino associadas à degradação do ácido málico, como citado anteriormente. Entretanto, uma coorte maior deve ser avaliada para validar possíveis biomarcadores ou modelo. ⁽⁵⁾

Em suma, o nosso estudo sugere que a CI/SBD está associada à desordem no metabolismo energético, envolvendo metabólitos relacionados e inter-relacionados com o ciclo TCA (Figura 3). Os achados fortalecem evidências da literatura sobre a capacidade sensorial do urotélio e proporcionam uma reflexão sobre uma possível

relação com outras doenças, bactérias uropatogênicas e microbiota intestinal, além dos processos enzimáticos deste ciclo envolvidos em outras vias metabólicas. Maiores estudos ainda são necessários para a compreensão da fisiopatologia da CI/SBD, que no futuro, permitirá obter um diagnóstico específico.

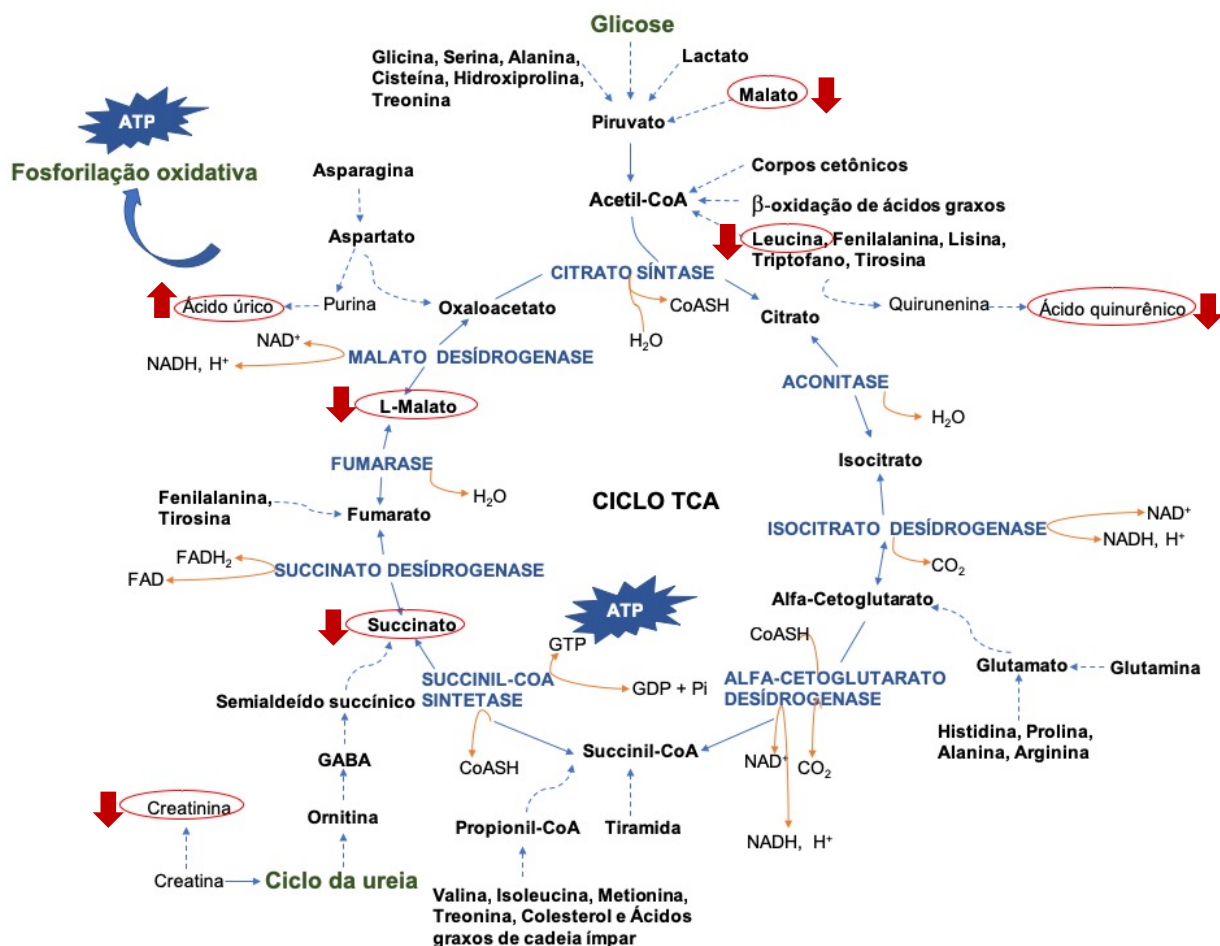


Figura 3. Reações e conexões das vias metabólicas do Ciclo TCA, destacando em vermelho os metabólitos que diferem na urina de mulheres com CI/SBD comparados ao grupo controle. Fonte: Adaptado de Rustin et al., (1997). Nota: A seta em vermelho para baixo=menor concentração e seta em vermelho para cima=maior concentração

6 CONCLUSÃO

Quando comparado às mulheres assintomáticas, as mulheres portadoras de CI/SBD apresentam na urina uma diferença de metabólitos correlacionados ao metabolismo energético. Tais metabólitos podem ser candidatos a biomarcadores para a CI/SBD, no entanto, maiores estudos moleculares ainda são necessários para a validação destes, bem como para o conhecimento de outras vias biológicas relacionadas com estes metabólitos. A metabolômica também se mostrou uma ótima ferramenta para o estudo da CI/SBD, assim como foi relevante a praticidade do método não invasivo usando a urina. Contudo, o estudo proporcionou a obtenção de informações moleculares que podem auxiliar na compreensão da fisiopatologia da CI/SBD e no futuro, no diagnóstico e tratamento desta síndrome.

7 REFERÊNCIAS

1. Fiehn O, Kim J. Metabolomics insights into pathophysiological mechanism of interstitial cystitis. *Int Neurourol J*. 2014; 18(3): 106-114.
2. Warren JW, Horne L, Diggs C, Greenberg P, Langenberg PW. Nocturia in interstitial cystitis/painful bladder syndrome. *Urology*. 2011;77(6): 1308-1312.
3. van de Merwe JP, Nordling J, Bouchelouche P, Bouchelouche K, Cervigni M, Daha LK, et al. Diagnostic criteria, classification, and nomenclature for painful bladder syndrome/interstitial cystitis: an ESSIC proposal. *Eur Urol*. 2008; 53: 60–67
4. Hanno PM, Burks DA, Clemens JQ, Dmochowski RR, Erickson D, Fitzgerald MP, et al. AUA guideline for the diagnosis and treatment of interstitial cystitis/bladder pain syndrome. *J Urol*. 2011;185: 2162–2170.
5. Kind T, Cho E, Park TD, Deng N, Liu Z, Lee T, Fiehn O, Kim J. Interstitial Cystitis-Associated Urinary Metabolites Identified by Mass-Spectrometry Based Metabolomics Analysis. *Scientific reports*. 2016; 6: 39227.
6. Stephens-Shields AJ, Clemens JQ, Jemielita T, Farrar J, Sutcliffe S, Hou X, et al. Symptom Variability and Early Symptom Regression in the MAPP Study: A Prospective Study of Urological Chronic Pelvic Pain Syndrome. *The Journal of Urology*. 2016; 196: 1450–1455
7. Kim, J, Freeman, MR. Antiproliferative Factor Signaling and Interstitial Cystitis/Painful Bladder Syndrome. *International Neurourology Journal*. 2011; 15(4): 184-91.
8. Berry SH, Elliott MN, Suttrop M, Bogart LM, Stoto MA, Eggers P, et al. Prevalence of symptoms of bladder pain syndrome/ interstitial cystitis among adult females in the United States. *The Journal of Urology*. 2011; 186: 540–544

9. You S, Yang W, Anger JT, Freeman MR, Kim J. 'Omics' approaches to understanding interstitial cystitis/painful bladder syndrome/bladder pain syndrome. *Int Neurourol J*. 2012;16: 159–168.
10. Dinis S, JT Oliveira, Pinto R, F Cruz, Buffington CT, Dinis P. From bladder to systemic syndrome: concept and treatment evolution of interstitial cystitis. *International journal of women's health*. 2015; 7: 735-44.
11. Hanno PM, Erickson D, Moldwin R, Faraday MM; American Urological Association. Diagnosis and treatment of interstitial cystitis/bladder pain syndrome: AUA guideline amendment. *J Urol*. 2015;193(5):1545-1553.
12. Wen H, Lee T, You S, Park SH, Song H, Eilber KS, et al. Urinary metabolite profiling combined with computational analysis predicts interstitial cystitis-associated candidate biomarkers. *J Proteome Res*. 2015;14(1):541-548.
13. Hurst RE, Van Meerveld BG, Wisniewski AB, VanGordon S, Lin H, Kropp BP, et al. Increased bladder permeability in interstitial cystitis/painful bladder syndrome. *Transl Androl Urol*. 2015; 4(5): 563-571.
14. Karamali M, Shafabakhsh R, Ghanbari Z, Eftekhari T, Asemi Z. Molecular pathogenesis of interstitial cystitis/bladder pain syndrome based on gene expression. *J Cell Physiol*. 2019; 1-8
15. Parker KS, Crowley JR, Stephens-Shields AJ, van Bokhoven A, Lucia MS, Lai HH, et al. Urinary Metabolomics Identifies a Molecular Correlate of Interstitial Cystitis/Bladder Pain Syndrome in a Multidisciplinary Approach to the Study of Chronic Pelvic Pain (MAPP) Research Network Cohort. *EBioMedicine*. 2016; 7:167–174.
16. Fukui Y, Kato M, Inoue Y, Matsubara A, Itoh K. A metabonomic approach identifies human urinary phenylacetylglutamine as a novel marker of interstitial

cystitis. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*. 2009; 877(30): 3806-12.

17. Khamis MM, Adamko DJ, El-Aneed A. Mass Spectrometric based approaches in urine metabolomics and biomarker discovery. *Mass Spectrometry Reviews*. 2017; 36: 115-134.

18. Johnson CH, Ivanisevic J, Siuzdak G. Metabolomics: beyond biomarkers and towards mechanism. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2016; 17(7): 451–459.

19. Patti GJ, Yanes O, Siuzdak G. Metabolomics: the apogee of the omic trilogy. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2013; 13(4): 263-269.

20. Shahid M, Gull N, Yeon A, Cho E, Bae J, Yoon HS, et al. Alpha-oxoglutarate inhibits the proliferation of immortalized normal bladder epithelial cells via an epigenetic switch involving ARID1A. *Scientific Reports*. 2018; 8(1): 6294.

21. Kumar V, Chapple CR, Surprenant AM, Chess-Williams R. Enhanced adenosine triphosphate release from the urothelium of patients with painful bladder syndrome: a possible pathophysiological explanation. *The Journal of Urology*. 2007;178(4):1533–1536.

22. Lee WY, Savage JR, Zhang J, Jia W, Oottarmasathien S, Prestwich GD. Prevention of anti-microbial peptide LL-37-induced apoptosis and ATP release in the urinary bladder by a modified glycosaminoglycan. *PLoS One*. 2014; 9(1): 10.1371.

23. Nakagomi H, Yoshiyama M, Mochizuki T, Miyamoto T, Komatsu R, Imura Y, et al. Urothelial ATP exocytosis: regulation of bladder compliance in the urine storage phase. *Scientific reports*. 2016; 6: 29761.

24. Wang EC, Lee JM, Ruiz WG, Balestreire EM, von Bodungen M, Barrick S, et al. ATP and purinergic receptor–dependent membrane traffic in bladder umbrella cells. *The Journal of clinical investigation*. 2005; 115(9): 2412-22.
25. Kruse R, Sävje S, Persson K. Adenosine triphosphate induced p2y₂ receptor activation induces proinflammatory cytokine release in uroepithelial cells. *The journal of urology*. 2012; 188(6): 2419-2425.
26. Gonzalez E, Arms L, Vizzard MA. The role (s) of cytokines/chemokines in urinary bladder inflammation and dysfunction. *BioMed research international*. 2014; 2014: 120525.
27. Sonnewald U. Glutamate synthesis has to be matched by its degradation where do all the carbons go? *Journal of Neurochemistry*. 2014; 131(4): 399-406
28. Owen OE, Kalhan SC, Hanson RW. The key role of anaplerosis and cataplerosis for citric acid cycle function. *The Journal of biological chemistry*. 2002; 277(34): 30409-12.
29. Rustin P, Bourgeron T, Parfait B, Chretien D, Munnich A, Rötig A. Inborn errors of the Krebs cycle: a group of unusual mitochondrial diseases in human. *Biochim Biophys Acta*. 1997; 1361(2): 185-97.
30. Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. Mitochondria, Oxidants, and Aging. *Cell*. 2005; 120(4): 438-95.
31. Bröer S, Bröer A. Amino acid homeostasis and signalling in mammalian cells and organisms. *Biochemical Journal*. 2017; 474(12): 1935-1963.
32. Ganti S, Taylor SL, Kim K, Hoppel CL, Guo L, Yang J, et al. Urinary acylcarnitines are altered in human kidney cancer. *International journal of cancer*. 2012; 130(12): 2791-800.

33. Makrecka-Kuka M, Sevostjanovs E, Vilks K, Volska K, Antone U, Kuka J, et al. Plasma acylcarnitine concentrations reflect the acylcarnitine profile in cardiac tissues. *Scientific Reports*. 2017; 7(1): 17528.
34. Giskeodegard GF, Hansen AF, Bertilsson H, Gonzalez SV, Kristiansen KA, Bruheim P, et al. Metabolic markers in blood can separate prostate cancer from benign prostatic hyperplasia. *British Journal of Cancer*. 2015; 113:1712–1719.
35. Chalmers RA, Roe CR, Stacey TE, Hoppel CL. Urinary excretion of L-carnitine and acylcarnitines by patients with disorders of organic acid metabolism: evidence for secondary insufficiency of L-carnitine. *Pediatric research*. 1984;18(12): 1325-8.
36. He W, Miao FJ, Lin DC, Schwandner RT, Wang Z, Gao J, et al. Citric acid cycle intermediates as ligands for orphan G-protein-coupled receptors. *Nature*. 2004; 429(6988): 188-93.
37. Deen PM, Robben JH. Succinate receptors in the kidney. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2011; 22(8): 1416-22.
38. Tretter L, Patocs A, Chinopoulos C. Succinate, an intermediate in metabolism, signal transduction, ROS, hypoxia, and tumorigenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2016; 1857(8): 1086-1101.
39. Toma I, Kang JJ, Sipos A, Vargas S, Bansal E, Hanner F, et al. Succinate receptor GPR91 provides a direct link between high glucose levels and renin release in murine and rabbit kidney. *The Journal of Clinical Investigation*. 2008; 118(7): 2526-34.
40. Hebert SC. Orphan detectors of metabolism. *Nature*. 2004; 429: 143-145.
41. Hallan S, Afkarian M, Zelnick LR, Kestenbaum B, Sharma S, Saito R, et al. Metabolomics and gene expression analysis reveal down-regulation of the citric acid (TCA) cycle in non-diabetic CKD patients. *EBioMedicine*. 2017; 26:68–77.

42. Dawiskiba T, Deja S, Mulak A, Zabek A, Jawien E, Pawelka D, et al. Serum and urine metabolomic fingerprinting in diagnostics of inflammatory bowel diseases. *World Journal of Gastroenterology*. 2014; 20(1): 163–74.
43. Wyss M, Kaddurah-Daouk R. Creatine and creatinine metabolism. *Physiological reviews*. 2000; 80(3): 1107-213.
44. Weinberg JM, Venkatachalam MA, Roeser NF, Nissim I. Mitochondrial dysfunction during hypoxia/reoxygenation and its correction by anaerobic metabolism of citric acid cycle intermediates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000; 97(6): 2826-31.
45. Liu S, He L, Yao K. The antioxidative function of alpha-ketoglutarate and its applications. *BioMed Research International*. 2018; 2018: 3408467.
46. Leverve XM, Fontaine E. Role of substrates in the regulation of mitochondrial function in situ. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*. 2001; 52(3-5): 221-9.
47. Ipe DS, Ben Zakour NL, Sullivan MJ, Beatson SA, Ulett KB, Benjamin Jr WH, et al. Discovery and characterization of human-urine utilization by asymptomatic-bacteriuria-causing *Streptococcus agalactiae*. *Infection and Immunity*. 2016; 84(1): 307–19
48. Leclercq SY, Sullivan MJ, Ipe DS, Smith JP, Cripps AW, Ullett GC. Pathogenesis of *Streptococcus* urinary tract infection depends on bacterial strain and β -hemolysin/cytolysin that mediates. *Scientific Reports*. 2016; 6:29000.
49. Landete JM, García-Haro L, Blasco A, Manzanares P, Berbegal C, Monedero V, et al. Requirement of the *Lactobacillus casei* MaeKR two-component system for L-malic acid utilization via a malic enzyme pathway. *Applied and Environmental Microbiology*. 2010; 76(1): 84-95.

50. Yoshimura N, Oguchi T, Yokoyama H, Funahashi Y, Yoshikawa S, Sugino Y, et al. Bladder afferent hyperexcitability in bladder pain syndrome/interstitial cystitis. *International Journal of Urology*. 2014; 21:18–25.
51. Braundmeier-Fleming A, Russell NT, Yang W, Nas MY, Yaggie RE, Berry M, et al. Stool-based biomarkers of interstitial cystitis/bladder pain syndrome. *Scientific Reports*. 2016; 6: 26083.
52. Gardiner BJ, Tai AY, Kotsanas D, Francis MJ, Roberts SA, Ballard SA, et al. Clinical and microbiological characteristics of *Eggerthella lenta* bacteremia. *Journal of Clinical Microbiology*. 2015; 53(2): 626-35.
53. Nicholson JK, Holmes E, Wilson ID. Gut microorganisms, mammalian metabolism and personalized health care. *Nature Reviews Microbiology*. 2005; 3(5): 431-8.
54. Hauser PJ, VanGordon SB, Seavey J, Sofinowski TM, Ramadan M, Abdullah S, et al. Abnormalities in expression of structural, barrier, and differentiation related proteins and chondroitin sulfate in the urothelium of cats with feline interstitial cystitis mimic those seen in human interstitial cystitis. *The Journal of Urology*. 2015; 194(2): 571-577.
55. Chang H, Meng H-yu, Liu mim, Wang Y, Lu F, Wang H-yu. Identification of key metabolic changes during liver fibrosis progression in rats using a urine and serum metabolomics approach. *Scientific Reports*. 2017; 7: 11433.
56. Ravena S, Dufour C, Cesaro S, Bottega R, Faleschini M, Cuccarolo P, et al. Evaluation of energy metabolism and calcium homeostasis in cells affected by Shwachman-Diamond syndrome. *Scientific Reports*. 2016; 6: 25441.
57. Baran H, Staniek K, Bertagnol-Spörr M, Attam M, Kronsteiner C, Kepplinger B. Effects of various kynurenine metabolites on respiratory parameters of rat brain, liver and heart mitochondria. *International journal of tryptophan research*. 2016; 9: 17-29.

58. Rubio-Diaz D, Pozza ME, Dimitrakov J, Gilleran JP, Giusti MM, Stella JL, et al. A candidate serum biomarker for bladder pain syndrome/interstitial cystitis. *Analyst*. 2009; 134(6): 1133-7.

59. Jhang JF, Kuo HC. Pathomechanism of Interstitial Cystitis/Bladder Pain Syndrome and Mapping the Heterogeneity of Disease. *International Neurourology Journal*. 2016; 20(Suppl 2): S95-104.

60. Butler R, Inzunza J, Suzuki H, Fujii-Kurlyama Y, Warner M, Gustafsson JA. Uric acid stones in the urinary bladder of aryl hydrocarbon receptor (AhR) knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012; 109(4): 1122-6.

61. Maiuolo J, Oppedisano F, Gratteri S, Muscoli C, Mollace V. Regulation of uric acid metabolism and excretion. *International journal of cardiology*. 2016; 213:8-14.

62. Lanaspá MA, Sanchez-Lozada LG, Choi YJ, Cicerchi C, Kanbay M, Roncal-Jimenez CA, et al. Uric acid induces hepatic steatosis by generation of mitochondrial oxidative stress: potential role in fructose-dependent and -independent fatty liver. *Journal of biological chemistry*. 2012; 287(48): 40732-44.

63. Nishida Y. Relation between creatinine and uric acid excretion. *Annals of the rheumatic diseases*. 1992; 51(1): 101-2.

64. Faller J, Fox IH. Ethanol-induced hyperuricemia: evidence for increase urate production by activation of adenine nucleotide turnover. *The New England journal of medicine*. 1982; 307(26):1598-602.

65. Wagner BD, Accurso, FJ, Laguna TA. The applicability of urinary creatinine as a method of specimen normalization in the cystic fibrosis population. *Journal of Cystic Fibrosis*. 2010; 9: 212–16.

66. Pegalajar-jurado A, Fitzgerald BL, Islam MN, Belisle JT, Wormser GP, Waller KS, et al. Identification of urine metabolites as biomarkers of Early Lyme Disease. *Scientific reports*. 2018; 8(1): 12204.
67. Duong HD, Rhee J 2nd. Development of Ratiometric Fluorescent Biosensors for the Determination of Creatine and Creatinine in Urine. *Sensors (Basel)*. 2017; 17(11): 2570.
68. Dunn SR, Gabuzda GM, Superdock KR, Kolecki RS, Schaedler RW, Simenhoff ML. Induction of creatininase activity in chronic renal failure: timing of creatinine degradation and effect of antibiotics. *American journal of kidney diseases*. 1997; 29(1): 72-7.
69. Brosnan JT, Brosnan ME. Creatine metabolism and the urea cycle. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2010; 100 Supl 1: S49-52.
70. Kanbara A, Miura Y, Hyogo H, Chayama K, Seyama I. Effect of urine pH changed by dietary intervention on uric acid clearance mechanism of pH-dependent excretion of urinary uric acid. *Nutrition Journal*. 2012; 11: 39.

Anexos

Anexo 1. Termo de consentimento livre e esclarecido

Pesquisadores Responsáveis: Prof. Dr. Fernando Gonçalves de Almeida, Camila Gonzaga da Silva e Letícia Siqueira de Sá Barretto.

Instituição a que pertence o Pesquisador Responsável: Departamento de Cirurgia/ Disciplina de Urologia da Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP.

A Sra./Srta está sendo convidada a participar do projeto de pesquisa intitulado como “Perfil metabólico urinário de mulheres com cistite intersticial”. Trata-se de um estudo sobre cistite Intersticial/ Síndrome da Bexiga Dolorosa (CI/SBD), que é uma doença muito comum em mulheres e de etiologia desconhecida, sendo uma patogênese crônica de difícil tratamento. No entanto, a descoberta de biomarcadores na urina, como de metabolitos, podem ser relevantes à pesquisa e ao diagnóstico da tal doença, uma vez que podem indicar alterações no funcionamento do metabolismo. Assim, o objetivo desse estudo é avaliar o perfil dos metabólitos da urina de mulheres com e sem cistite intersticial (CI), a fim de compará-los para estabelecer meios que possam ajudar no diagnóstico e tratamento dos indivíduos com cistite intersticial.

Para isso, a Sra/Srta que aceitar participar desse estudo precisará coletar o jato médio com 50mL da primeira urina do dia, em frasco transparente concedido pelo pesquisador. A amostra de urina coletada será processada, e seus metabolitos serão extraídos e analisados por uma técnica analítica molecular.

Esse projeto contará com a participação de 40 mulheres, as quais devem ter entre 25 - 65 anos, sendo 20 mulheres saudáveis, sem queixas urinárias, e 20 mulheres com sintomas de cistite intersticial já diagnosticada. Aquelas que apresentarem infecção urinária, tratamento de tumor de bexiga nos últimos 3 anos, radioterapia pélvica, gravidez, litíase urinária e história de tuberculose urinária não poderão participar desse estudo. Convém relatar que o procedimento da coleta de urina poderá lhe ocasionar um risco mínimo como um leve desconforto ao manusear o frasco.

A sua participação nessa pesquisa é voluntária e, embora tenha assinado o presente termo, a Sra/Srta pode retirar o seu consentimento e deixar de participar a qualquer momento, sem penalização alguma ou prejuízo à continuidade da pesquisa. Além disso, todos os dados obtidos ao seu respeito, assim como o material coletado só serão utilizados neste estudo.

A Sra./Srta. não receberá nenhuma compensação financeira relacionada à sua participação neste estudo, tampouco arcará com qualquer despesa. Todas as informações ao seu respeito serão analisadas em conjunto com as de outras voluntárias, não sendo divulgado a sua identificação, nem a das demais participantes, em nenhum momento, ou seja, serão mantidos o sigilo e a privacidade.

Antes de assinar o presente termo ou em qualquer momento, lhe será permitido sanar todas as dúvidas a respeito de sua participação e ou outros assuntos relacionados à pesquisa.

Para ter acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa, a Sra./Srta pode contatar o principal investigador, que é a Camila Gonzaga da Silva, podendo ser encontrada no endereço Rua Embaú, 231, telefone: (11) 98687-3315. Se Sra./Srta tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Botucatu, 572 -1º andar -cj 14, (11) 5571-1062, FAX: (11) 5539-7162 –E-mail:cepunifesp@unifesp.br.

Esse termo foi elaborado em duas vias devidamente assinadas, sendo que uma ficará com a Sra./Srta e a outra conosco.

Declaração do participante:

Eu, _____, portadora do documento de identidade nº _____, declaro ter sido suficientemente informada a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Perfil metabólico urinário de mulheres com cistite intersticial”. Os propósitos do estudo ficaram claros para mim, assim como os procedimentos a serem realizados, os seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e os demais esclarecimentos. Eu entendo também que a minha participação é isenta de despesas. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo.

Data: ____/____/____

Nome da participante da pesquisa

Assinatura

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária, o Consentimentos Livre e Esclarecido desta participante da pesquisa (ou representante legal) para a participação neste estudo. Declaro ainda que me comprometo a cumprir todos os termos aqui descritos.

Data: ____/____/____

Pesquisador Principal

Assinatura

B)

GRUPO	CREATININA	ÁCIDO ALFA-CETOGLUTÁRICO	ÁCIDO LÁCTICO	ÁCIDO MÁLICO	ÁCIDO SUCCÍNICO	ÁCIDO ÚRICO	ÁCIDO QUINURÊNICO	C2	C8
CI/SBD	330,739	7,330	50,691	3,172	7,032	1.086,918	78,192	0,421	-
CI/SBD	170,288	9,271	243,623	1,123	-0,807	926,647	40,530	0,690	0,272
CI/SBD	269,778	-	5,444	2,073	7,686	571,161	140,871	0,733	0,875
CI/SBD	145,067	6,957	17,619	1,930	2,662	908,262	53,486	0,744	0,449
CI/SBD	94,959	1,999	32,391	1,381	4,680	612,966	19,320	0,633	0,356
CI/SBD	150,385	16,174	46,149	2,670	8,948	1.272,143	54,376	0,677	-
CI/SBD	243,480	-	-	1,271	8,335	1.489,148	68,920	0,693	0,578
CI/SBD	220,886	7,753	40,884	1,240	9,194	1.459,741	67,972	0,748	0,617
CI/SBD	229,364	10,623	349,464	9,600	6,031	1.200,865	51,536	0,571	0,611
CI/SBD	548,687	23,271	35,364	2,697	12,800	1.511,168	254,979	0,636	2,606
CI/SBD	116,995	4,156	6,554	1,479	-	808,786	80,044	0,799	0,286
CI/SBD	233,175	64,736	79,579	6,601	463,230	1.307,451	96,660	0,583	0,562
CI/SBD	282,495	23,476	56,139	7,667	1,806	1.440,854	88,476	0,597	0,466
CI/SBD	181,823	32,678	14,171	4,491	13,215	1.061,149	79,865	0,657	0,896
CI/SBD	236,577	33,792	35,122	2,412	1,906	1.499,604	96,860	0,727	0,563
CI/SBD	181,757	70,314	39,404	3,384	7,575	462,956	116,913	0,710	0,799
CI/SBD	84,705	4,034	35,226	1,037	8,346	785,390	55,675	0,645	0,330
CI/SBD	222,826	3,613	30,652	3,869	8,650	1.282,586	36,399	0,639	0,590
CI/SBD	208,863	156,198	84,778	12,585	22,744	443,042	111,197	0,647	0,504
CI/SBD	428,262	76,127	32,161	3,840	20,441	857,176	131,180	0,677	0,937
CONT	239,843	7,411	28,759	1,590	10,162	681,083	34,151	0,799	0,324
CONT	460,556	12,271	30,481	2,192	7,896	1.201,629	98,011	0,859	0,567
CONT	400,626	6,760	42,399	5,969	16,724	1.173,549	96,812	0,414	-
CONT	316,952	21,318	28,092	5,143	9,991	1.247,605	97,784	0,748	0,960
CONT	294,382	15,037	19,247	4,517	38,967	1.081,666	106,238	0,734	0,684
CONT	182,402	6,253	325,814	21,848	72,515	918,218	102,729	0,656	0,296
CONT	309,432	6,621	85,587	2,681	18,790	707,963	104,310	0,666	1,182
CONT	179,761	4,131	3,876	3,704	16,335	524,864	93,973	0,804	0,600
CONT	459,106	31,161	49,824	11,893	37,550	274,644	186,653	0,704	1,257
CONT	557,518	4,515	57,064	4,553	30,880	555,045	108,486	0,712	0,493
CONT	205,100	4,728	40,463	2,728	8,982	1.003,916	68,707	0,757	0,347
CONT	580,914	7,614	31,651	9,937	30,560	607,267	172,976	0,633	0,624
CONT	143,443	15,023	32,447	2,481	8,589	1.026,761	45,517	0,633	0,320
CONT	249,166	9,248	6,753	5,192	16,066	532,951	149,207	0,752	0,959
CONT	333,212	24,346	1,935	13,998	32,286	191,545	187,416	0,685	0,826
CONT	251,606	18,757	49,910	4,453	23,246	744,958	118,362	0,680	0,587
CONT	224,028	40,591	59,784	3,492	11,713	831,203	49,267	0,690	0,634
CONT	238,625	19,311	35,951	5,307	20,287	499,497	135,881	0,637	0,296
CONT	233,740	57,805	20,815	14,226	13,556	530,056	121,012	0,769	0,446
CONT	361,522	23,395	31,161	9,402	27,298	766,320	135,583	0,631	0,628

Nota: Concentração em microMolar (μM) para a creatinina e ácidos orgânicos e em nanoMolar (nM) para acilcartinitinas.