

Diagnóstico precoce do cancro do pulmão com a respiração

CITAÇÃO

Cruz, J., Gil, N., Raimundo, B., Vaz, P. D. (2021). Diagnóstico precoce com a respiração, *Rev. Ciência Elem.*, V9(02):034. doi.org/10.24927/rce2021.034

EDITOR

José Ferreira Gomes,
Universidade do Porto

EDITOR CONVIDADO

Paulo Ribeiro-Claro
Universidade de Aveiro

RECEBIDO EM

25 de abril de 2021

ACEITE EM

16 de maio de 2021

PUBLICADO EM

15 de junho de 2021

COPYRIGHT

© Casa das Ciências 2021.
Este artigo é de acesso livre, distribuído sob licença Creative Commons com a designação [CC-BY-NC-SA 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/), que permite a utilização e a partilha para fins não comerciais, desde que citado o autor e a fonte original do artigo.

rce.casadasciencias.org



Jorge Cruz, Nuno Gil, Bernardo Raimundo, Pedro Duarte Vaz
Unidade de Pulmão, Fundação Champalimaud

O ar exalado da respiração não é apenas ar. Contém milhares de compostos orgânicos voláteis que têm origem no metabolismo do organismo humano e refletem, direta ou indiretamente, a condição de saúde desse organismo.

Explorando os perfis metabólicos do ar exalado da respiração é possível, numa abordagem simples, estabelecer uma relação direta entre esses perfis e uma determinada doença. Uma das mais importantes é o cancro do pulmão, que é muito difícil de diagnosticar precocemente, e é responsável pelo maior número de mortes, mundialmente, por doença oncológica. Ora, utilizar o ar exalado da respiração para triar ou diagnosticar de forma indolor e não invasiva esta doença (e outras) é a essência da medicina de precisão, cujo maior objetivo é salvar vidas.

A respiração não é meramente uma função vital, é certo, em que um volume de ar é inspirado e expirado para promover a oxigenação dos tecidos e remoção do dióxido de carbono formado. Este processo é muito mais complexo e cumpre outras funções. Nomeadamente, durante o processo de respiração, o ar exalado dos pulmões contém milhares de Compostos Orgânicos Voláteis (COVs ou VOCs – do inglês *Volatile Organic Compounds*) sendo exalados pelo ar expirado no processo da respiração.

Indo por partes, qual a origem destes COVs? O termo *metabolómica* refere-se ao estudo em larga escala de moléculas pequenas, normalmente conhecidas como metabolitos, dentro das células, fluidos biológicos, tecidos ou organismos. Ao conjunto dessas pequenas moléculas e das suas interações dentro de um sistema biológico dá-se o nome de *metaboloma*. A metabolómica é uma abordagem poderosa porque os metabolitos e as suas concentrações, ao contrário de outras *ómicas* (por exemplo proteómica e genómica), refletem directamente a atividade bioquímica subjacente e o estado de células e dos tecidos. Assim, a metabolómica, ao estudar os substratos e produtos do metabolismo de um organismo, que são influenciados por fatores genéticos e ambientais, representa melhor o fenótipo molecular.

A utilização da análise de COVs na deteção de doenças não é propriamente uma novidade. O uso eficaz de cães na deteção de condições médicas e doenças como cancro, diabetes, malária, doença de Parkinson e muitas outras já se encontra documentada. Para se perceber isto, é necessário compreender a relação entre COVs e odor. Os COVs são os

componentes moleculares dos odores, que são associados a uma determinada origem. Por exemplo, o cheiro a café, que todos conseguimos identificar, é dado por perfis específicos de COVs libertados pelo grão ou pela bebida e que o nosso cérebro reconhece como sendo o característico odor a café. Ao inalarem o ar e partículas suspensas, os cães podem detectar moléculas de odor humano que podem ter origem em amostras de pele, sangue, respiração, saliva, suor, lágrimas, muco nasal, urina, sêmen ou fezes. Mais especificamente, os cães podem detetar odores/COVs que são produzidos pelos tecidos humanos que evoluem para estados patológicos particulares associados a doenças específicas, de acordo com as alterações metabólicas, conforme mencionado atrás. Os cães também se mostraram bem-sucedidos na deteção de cancro do pulmão (entre outros), tendo sido capazes de diferenciar o odor do soro sanguíneo de pacientes com cancro de pulmão do soro sanguíneo de controlos saudáveis. Esta vantagem dos cães provém do facto de possuírem: (i) 1094 genes olfativos (os humanos têm apenas 802); (ii) 125-300 milhões de células olfativas (os humanos têm apenas 5-6 milhões); (iii) um terço do cérebro dedicado à interpretação de odores (os humanos apenas dedicam 5%); (iv) terem narizes mais proeminentes e uma cavidade (epitélio) nasal com área tripla à dos humanos. Ora replicar e mimetizar esta capacidade é o que se pretende fazer com a análise do ar exalado da respiração com métodos instrumentais de análise de COVs, conforme será explicado mais à frente neste artigo.

Do ponto de vista da saúde, as análises para avaliação do metabolismo são realizadas sobre fluídos corporais, como o sangue e a urina. No entanto, mais recentemente, a análise do ar exalado da respiração tem ganho relevância, porque a sua colheita é completamente não-invasiva, mas mais importante é o facto de o ar exalado da respiração conter uma riqueza de metabolitos que correspondem direta ou indiretamente à condição de saúde do organismo, permitindo fácil e rapidamente aferir essa mesma condição. O ar exalado, por conter milhares de COVs, permite que a análise do perfil dos COV exalados sugira que existam diferenças entre os organismos saudáveis e outros com doença respiratória ou não. Por exemplo, quando existe uma descompensação grave de diabetes, os doentes têm um hálito com cheiro a maçãs.

Tomando como exemplo a pneumologia, existem diversas patologias que afetam o sistema respiratório, sendo conhecidas como as *big five* de acordo com um relatório da Organização Mundial de Saúde (OMS):

- Asma
- Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica (DPOC)
- Infecções Agudas das Vias Respiratórias Inferiores (p.e., pneumonia) (D. Inf.)
- Tuberculose (TB)
- Cancro de Pulmão (CP)

Todas estas doenças podem ser monitorizadas utilizando a análise do ar exalado da respiração. De facto, uma pesquisa na base de dados *PubMed* utilizando as palavras-chave "(volatile organic compound OR volatile organic compounds OR voc OR vocs) AND (breath OR asthma OR lung cancer OR tuberculosis OR COPD OR respiratory infection)" originou 13127 resultados, o que demonstra o interesse neste tipo de abordagem utilizando a análise dos metabolitos do ar exalado da respiração no diagnóstico precoce daquelas doenças, sendo que a maior fatia corresponde a estudos centrados no cancro do pulmão com aproximadamente 60% (FIGURA 1).

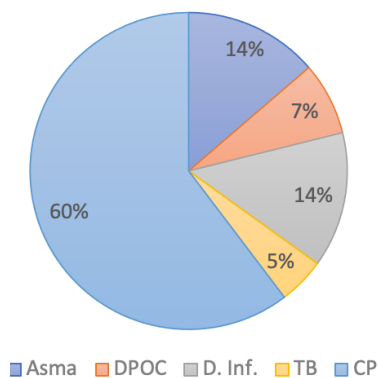


FIGURA 1. Distribuição dos artigos publicados sobre estudos de utilização do ar exalado da respiração para triagem/diagnóstico das 5 principais doenças respiratórias, de acordo com pesquisa na base de dados *PubMed* (ver texto principal).

Deste conjunto de doenças, o cancro do pulmão é um flagelo mundial. Esta doença mata mais do que qualquer outro tipo de cancro e, em 2020, os dados mostraram que foi responsável pelo segundo maior número de novos casos em todas as idades de ambos os sexos, em todo o mundo de acordo com o observatório mundial do cancro (GloboCan), FIGURA 2.

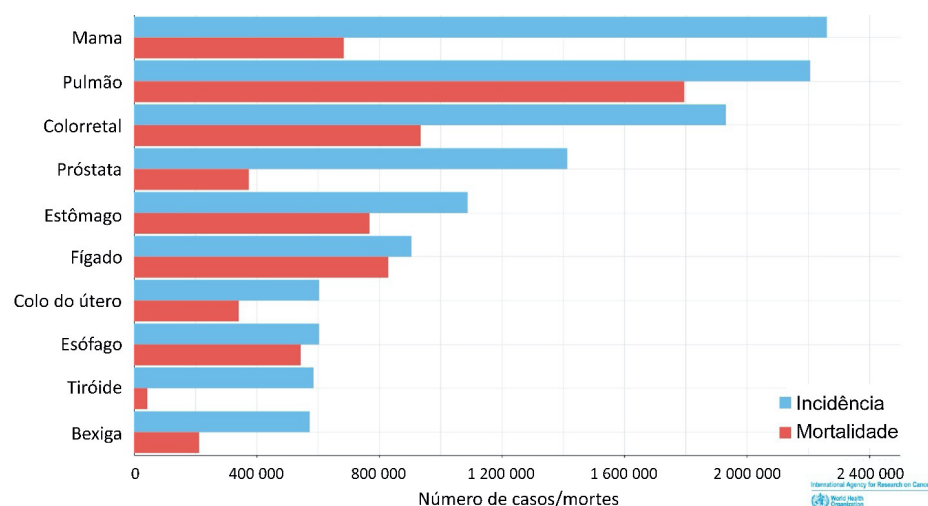


FIGURA 2. Número estimado de incidência e mortes em 2020 em todo o mundo, ambos os sexos, todas as idades (0 – 85+) para os tipos de cancro indicados, de acordo com o observatório mundial do cancro (GloboCan).

Estima-se também que os números continuarão a crescer a um ritmo constante. A incidência prevista para 2040 representa um aumento previsto de 58,8% face aos valores de 2020. A mesma tendência é, infelizmente, seguida pela mortalidade, prevendo-se que tal atinja um aumento de 63,8% (FIGURA 3).

Atualmente, cerca de 75% dos pacientes com cancro de pulmão apresentam a doença em estado avançado. Para aqueles com doença em estadio I, a probabilidade de cura pode chegar a 70%. Se o pressuposto de qualquer programa de rastreio é a redução da mortalidade por esta doença, então novos métodos de rastreio em cancro do pulmão têm de ser desenvolvidos, os quais permitam identificar cada vez mais casos em estadios mais precoces.

Esta abordagem inovadora decorre do facto de, atualmente, a medicina de precisão estabelecer novas fronteiras no cuidado prestado ao paciente e no tratamento da doença em prática clínica. Os fundamentos desta abordagem centram-se na genética, onde modelos

podem prever um determinado estado de doença e qual o nível de resposta terapêutica, com grande relevância na oncologia.

Por outro lado, como já mencionado atrás, a metabolómica é de particular relevância para estratificar os pacientes, fornecendo abordagens terapêuticas precisas e, ao mesmo tempo, permitir reunir informações sobre os metabolitos de moléculas pequenas, os quais podem estar intimamente ligados a uma condição de doença, funcionando como biomarcadores.

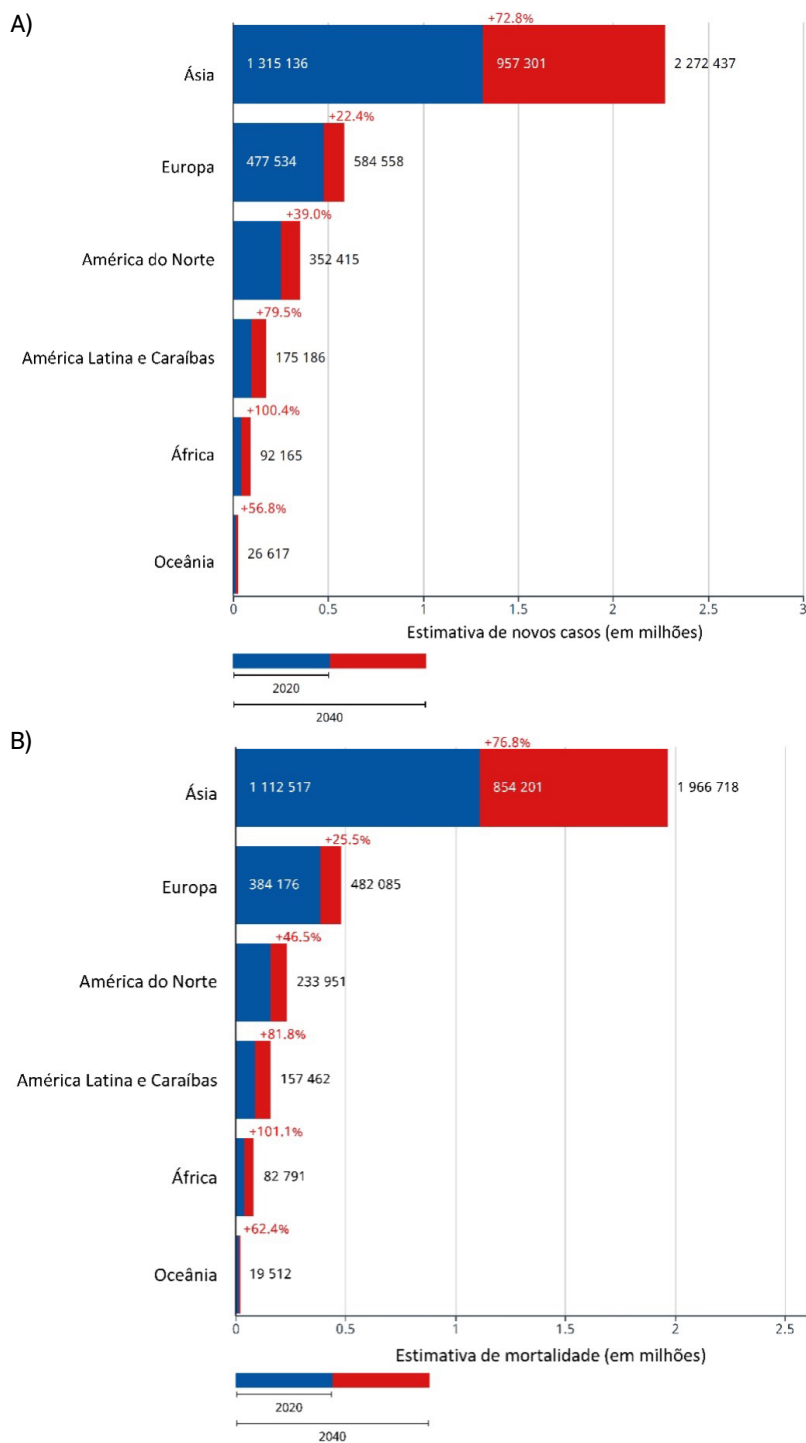


FIGURA 3. A) Incidência. B) Mortes por cancro de pulmão em 2020, ambos os sexos, todas as idades (0 – 85+). A previsão de crescimento para 2040 de novos casos incidentes e da mortalidade por cancro de pulmão mostra um cenário pouco animador com especial incidência na Ásia, de acordo com o observatório mundial do cancro (GloboCan).

Todas as células cancerígenas são caracterizadas por uma alteração no seu metabolismo relacionada com o seu crescimento descontrolado. Como tal, a deteção dos metabolitos resultantes dessa atividade metabólica que refletem, directamente, o estado atual de células, tecidos e do microbioma (o conjunto de microorganismos que coabitam connosco em todos os nossos órgãos) será uma nova ferramenta de diagnóstico para o cancro do pulmão em fase inicial. Como muitos desses metabolitos são voláteis, portanto "cheiráveis", então torna-se fácil a sua amostragem e posterior análise a partir do ar exalado da respiração. De forma semelhante à metabolómica, a *volatilómica* (definida como o estudo metabolómico do ar exalado na respiração) tem sido desenvolvida em paralelo, com o objectivo de encontrar COVs relacionados com condições de saúde, com particular incidência na deteção do cancro do pulmão.

Mas qual a vantagem de utilizar o ar exalado da respiração para diagnóstico? Adicionalmente à facilidade de colheita, que é absolutamente não invasiva conforme já mencionado, a grande vantagem é que fazendo a colheita do ar exalado durante um determinado período de tempo é possível obter uma amostragem de metabolitos de todo o organismo. Ou seja, cada volume de ar exalado é extremamente rico em COVs derivados de diversas partes do organismo (incluindo do sangue), devido à eficiente troca de compostos químicos entre os sistemas pulmonar e circulatório, conforme mostra a FIGURA 4.

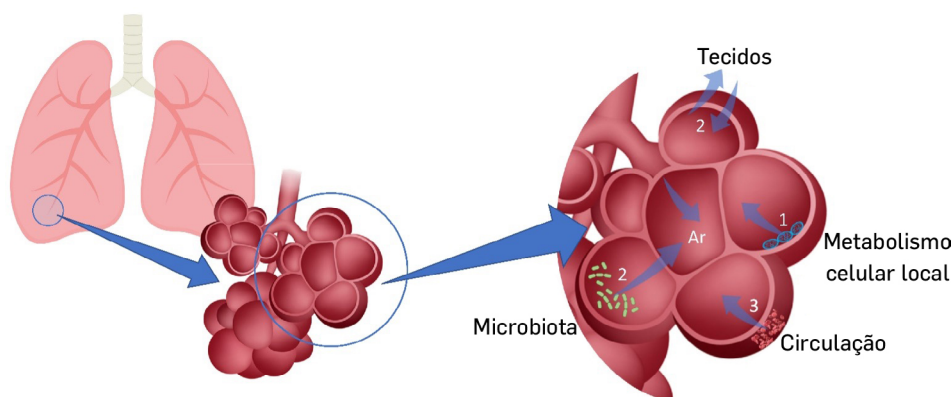


FIGURA 4. Representação esquemática das origens dos COVs na respiração: 1. metabolitos celulares locais; 2. Compostos exógenos (por exemplo microbiota); 3. Os compostos com origem noutras partes do corpo são transferidos, igualmente, para a fase gasosa nos alvéolos.

O volume total de sangue demora aproximadamente 1 minuto a circular pelo corpo humano. A cada minuto, portanto, os COVs provenientes de diversas fontes por todo o organismo atingem os alvéolos nos pulmões, onde passam com eficiência do sangue para o ar alveolar, sendo então exalados durante a expiração. Ao recolher e pré-concentrar continuamente o ar exalado da respiração durante alguns minutos (por exemplo 5-10 minutos), pode-se ter acesso ao perfil de COVs, mesmo em baixa concentração, com origem em todo o corpo de forma não invasiva, e quantificados com precisão.

Os metabolitos biomarcadores derivados de COVs são alterados nos estádios iniciais da doença, relativamente ao organismo com ausência de doença. Na doença oncológica, uma das alterações metabólicas mais bem descritas é o *Efeito de Warburg*, quando as células cancerosas têm taxas glicolíticas (velocidade de conversão de glucose em piruvato ou lactato numa célula) até 200 vezes acima daquela observada nas células normais,

mesmo quando há oxigénio suficiente disponível. Esta é uma mudança vital que ajuda a impulsionar e manter o rápido crescimento de tumores. O *Efeito de Warburg* é um contribuidor-chave de metabolitos voláteis característicos de cancros e, concomitantemente, afeta os perfis de COVs na respiração.

A biópsia respiratória visa detetar e quantificar os COVs que podem ser considerados como um “alerta precoce” e que estão presentes em concentrações extremamente baixas. Isso é possível porque, ao contrário do sangue, as amostras de respiração podem ser recolhidas em volumes quase ilimitados e (quase) sempre que necessário. Por apresentar esta característica, a utilização do ar exalado na biópsia respiratória como fonte inesgotável de informação biológica, além de servir para triagem ou diagnóstico, permite também que seja utilizada para avaliação regular de pacientes na progressão da doença, medir a resposta ou detetar os primeiros sinais de resistência ao tratamento. É possível imaginar a colheita de amostras de respiração de forma semelhante à forma como os hospitais monitorizam a temperatura corporal.

Tais factos contrapõem com muitos testes atuais que são inadequados para o acompanhamento frequente e de longo prazo de biomarcadores relacionados com a progressão de doença ou às respostas ao tratamento. Os procedimentos podem ser muito invasivos, caros, requerem o uso de recursos limitados ou trazem riscos à saúde do paciente que aumentam com exposições repetidas à radiação ionizante (como acontece por exemplo com a tomografia – TAC). Por outro lado, no caso de biópsias de tecido e sangue, a quantidade de material disponível para análise também é limitada. Isso significa que os testes são usados com moderação, muitas vezes apenas em casos avançados para fornecer um diagnóstico confirmatório.

As análises do ar exalado requerem uma abordagem com muitos cuidados no procedimento de amostragem e instrumentação adequada para análise de COVs. Assim, para a recolha do ar exalado, os pacientes sopram para uns sacos plásticos adequados (sacos Tedlar), até este encher por completo. Esta técnica apesar de simples e fácil de executar tem limitações devido às interferências que pode introduzir na análise dos perfis de COVs, pelo facto de os sacos conterem, eles próprios, COVs, mesmo tendo o cuidado de utilizar ar filtrado. As contaminações existem sempre em qualquer método, mas podem ser mitigadas utilizando o método de treino para a identificação pretendida. Para tal, durante a fase de análise é de extrema importância conhecer e compreender as contaminações para que sejam descartadas.

O volume de ar é depois analisado diretamente. No entanto, recentemente, foi desenvolvida uma técnica de recolha do ar exalado diretamente para tubos de dessorção térmica (tubos TD), que contêm no seu interior polímeros que retêm COVs ao mesmo tempo que reduzem a adsorção de água da humidade do ar exalado. Esta abordagem revolucionou a amostragem ao permitir a pré-concentração dos COVs provenientes de um grande volume de ar em tubos cilíndricos, que cabem na palma da mão e são completamente padronizados pela indústria.

A análise dos COVs no ar exalado da respiração realiza-se recorrendo a métodos instrumentais de análise química, que “mimetizam” o que os cães fazem com o olfato, conforme já mencionado anteriormente neste artigo. Assim, a análise dos COVs realiza-se, maioritariamente, recorrendo a espectrómetros de massa mais ou menos sofisticados, acoplados ou não a cromatógrafos gasosos, que permitem um superior grau de separação dos meta-

bolitos da mistura. A análise dos dados recolhidos é realizada recorrendo a pré-processamento e subsequente filtragem dos dados, por forma a apenas os sinais mais relevantes serem selecionados. Posteriormente, os resultados são processados através da utilização de métodos estatísticos adequados, por exemplo análise de componentes principais (PCA, do inglês *principal component analysis*), floresta aleatória (RF, do inglês *random forest*) ou máquina de vetores de suporte (SVM, do inglês: *support vector machine*), que recorrem já a técnicas de inteligência artificial (IA), pois só assim se conseguirão resultados fiáveis e validados. As técnicas de IA permitem identificar e classificar perfis de COVs, tal como o nosso cérebro identifica e associa odores a uma determinada origem. Globalmente, o protocolo de recolha, análise e classificação da biópsia respiratória está representado na FIGURA 5.

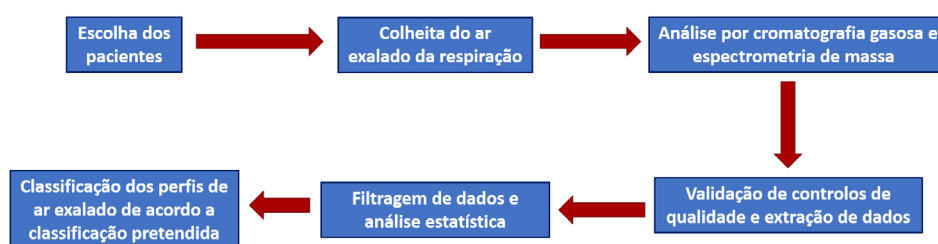


FIGURA 5. Fluxo de trabalho na biópsia respiratória para classificação de perfis de ar exalado da respiração para triagem/diagnóstico de doenças (por exemplo, cancro de pulmão).

Como ficou demonstrado, esta é uma área relativamente nova, a qual tem sofrido rápidos e significativos avanços, apresentando resultados cada vez mais promissores e consolidados. Embora este artigo tenha abordado apenas as doenças respiratórias com ênfase no cancro do pulmão, existem já exemplos de utilização do ar exalado da respiração no diagnóstico de outras doenças, como os cancros colorretal e da mama.

Tal facto levou a *European Respiratory Society* a criar um documento abrangente que funciona como uma norma técnica com vista à implementação das técnicas de análise do ar exalado da respiração de forma padronizada, abrangendo todo o processo, desde a amostragem até ao reporte de resultados.

Até agora, muitos compostos foram identificados, embora a sua origem bioquímica seja (ainda) desconhecida. Ensaio em pacientes com cancro demonstraram que as concentrações de compostos específicos aumentam, ao passo que diminuíram noutros, quando comparados com indivíduos de controlo, considerados saudáveis. O interesse demonstrado nesta abordagem está patente no número crescente não só de publicações científicas, mas sobretudo de ensaios clínicos, conforme mencionado atrás. No entanto, a (ainda) falta de padronização de certos procedimentos, como por exemplo, aqueles respeitantes à amostragem, tem levado à falta de consenso entre os estudos realizados no que concerne à correlação qualitativa e quantitativa entre metabolitos e condição de saúde de forma inequívoca.

Uma coisa parece certa: a forma como o diagnóstico do cancro de pulmão (e outros) será feita num futuro próximo irá seguramente mudar, possibilitando salvar um grande número de vidas, ao permitir tratamentos com maior sucesso e ao baixar custos dos sistemas de saúde. E esse futuro estará já ao virar da esquina...

REFERÊNCIAS

- ¹ JUNQUEIRA, H., et al., *Accuracy of canine scent detection of non-small cell lung cancer in blood serum*, J. Am. Osteopath. Assoc., V1, 19, 7, 413-418, DOI: [10.7556/jaoa.2019.077](https://doi.org/10.7556/jaoa.2019.077). 2019.
- ² *Global Cancer Observatory*.
- ³ NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE, *PubMed (nih.gov)*, acessado em Abril 2021.
- ⁴ "Biópsias respiratórias": o futuro da detecção precoce do cancro do pulmão?, Champalimaud Foundation.
- ⁵ HORVÁTH I., et al., *A European Respiratory Society technical standard: exhaled biomarkers in lung disease*, Eur. Respir. J., V49, 1600965, DOI: [10.1183/13993003.00965-2016](https://doi.org/10.1183/13993003.00965-2016). 2017.
- ⁶ DE LACY COSTELLO, B., et al., *A review of the volatiles from the healthy human body*, J. Breath Res., V8, 014001, DOI: [10.1088/1752-7155/8/1/014001](https://doi.org/10.1088/1752-7155/8/1/014001). 2014.
- ⁷ FILIPIAK, W., et al., *Comparative analyses of volatile organic compounds (VOCs) from patients, tumors and transformed cell lines for the validation of lung cancer-derived breath markers*, J. Breath Res., V8, 027111, DOI: [10.1088/1752-7155/8/2/027111](https://doi.org/10.1088/1752-7155/8/2/027111). 2014.