



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

**EMPREGO DA METABONÔMICA NO DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS
HEPÁTICAS EM AMOSTRAS DE URINA**

MICHELE MARIA GONÇALVES DE GODOY

Recife – 2015

MICHELE MARIA GONÇALVES DE GODOY



**EMPREGO DA METABONÔMICA NO DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS
HEPÁTICAS EM AMOSTRAS DE URINA**

Tese apresentada a Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutor em Medicina Tropical.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Edmundo Pessoa Lopes

Co-orientador: Prof. Dr. Ricardo Oliveira Silva

Ficha catalográfica elaborada pela
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

G589e Godoy, Michele Maria Gonçalves de.
 Emprego da metabonômica no diagnóstico de doenças hepáticas em
 amostras de urina / Michele Maria Gonçalves de Godoy. – Recife: O autor,
 2015.
 138 f.: il. tab.; quad.; 30 cm.

 Orientador: Edmundo Pessoa Lopes.
 Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
 Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2015.
 Inclui referências, apêndices e anexos.

 1. Metabonômica. 2. RMN. 3. Doença hepática gordurosa não alcoólica. 4.
 Hepatite. 5. Esteatose. I. Lopes, Edmundo Pessoa (Orientador). II. Título.

618.9883 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2015-140)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)
PRÓ-REITORIA PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO (PROPESQ)
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE (CCS)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL (PPGMEDTROP)

RELATÓRIO DA BANCA EXAMINADORA DA TESE DA DOUTORANDA

MICHELE MARIA GONÇALVES DE GODOY

No dia 27 de fevereiro de 2015, às 14h00, na Sala Prof. Murillo La Greca - no 3º. and. do CCS/UFPE, os Membros Doutores: a Profa. Dra. Ana Lúcia Coutinho Domingues (Presidente da Banca – UFPE), a Profa. Dra. Vera Magalhães da Silveira (UFPE), o Prof. Dr. Álvaro Antônio Bandeira Ferraz (UFPE), o Prof. Dr. José Angelo Rizzo (UFPE) e o Prof. Dr. Severino Alves Júnior (UFPE), componentes da Banca Examinadora, em sessão pública, arguíram a doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical MICHELE MARIA GONÇALVES DE GODOY sobre a sua Tese intitulada “EMPREGO DA METABONÔMICA NO DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS HEPÁTICAS EM AMOSTRAS DE URINA”, a qual foi orientada pelo Prof. Dr. Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto (UFPE) e coorientada pelo Prof. Dr. Ricardo Oliveira da Silva (UFPE). Ao final da arguição de cada membro da Banca Examinadora e resposta da doutoranda, as seguintes menções foram publicamente fornecidas.

Profa. Dra. Ana Lúcia Coutinho Domingues

APROVADA

Profa. Dra. Vera Magalhães da Silveira

APROVADA

Prof. Dr. Álvaro Antônio Bandeira Ferraz

APROVADA

Prof. Dr. José Angelo Rizzo

APROVADO

Prof. Dr. Severino Alves Júnior

APROVADO

Profa. Dra. Ana Lúcia Coutinho Domingues

Profa. Dra. Vera Magalhães da Silveira

Prof. Dr. Álvaro Antônio Bandeira Ferraz

Prof. Dr. José Angelo Rizzo

Prof. Dr. Severino Alves Júnior



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

REITOR

Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Francisco de Souza Ramos

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Nicodemos Teles Pontes Filho

**COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM MEDICINA TROPICAL**

Valdênia Maria Oliveira de Souza

**VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM MEDICINA TROPICAL**

Vera Magalhães da Silveira

CORPO DOCENTE PERMANENTE

Ana Catarina de Souza Lopes
Ana Lúcia Coutinho Domingues
Célia Maria Machado Barbosa de Castro
Celina Maria Turchi Martelli
Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto
Fábio André Brayner dos Santos
Heloísa Ramos Lacerda de Melo
Maria Amélia Vieira Maciel
Maria Rosângela Cunha Duarte Coelho
Marli Tenório Cordeiro
Rejane Pereira Neves
Ricardo Arraes de Alencar Ximenes
Valdênia Maria Oliveira de Souza
Vera Magalhães de Silveira
Vlúdia Maria Assis Costa

CORPO DOCENTE COLABORADOR

Maria de Fátima Pessoa Militão de Albuquerque
Rejane Pereira Neves

Ao meu marido e filhas, Stenio, Carolina, Mariana e Beatriz, pela compreensão, apoio e amor incondicional. Sem vocês nada seria possível.

Aos meus pais, exemplos de dedicação à família, eternos entusiastas e incentivadores do conhecimento, do desenvolvimento da ciência. Devo a vocês essa herança de amor à família e paixão pela ciência.

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores: Prof. Edmundo Lopes pelo incentivo, confiança, paciência, por acreditar na possibilidade de conclusão do estudo a despeito de todas as dificuldades encontradas, pelos constantes ensinamentos, pelo exemplo de dedicação à pesquisa.

Ao Prof. Ricardo Silva pelos preciosos ensinamentos de metabonômica, pela paciência com minhas indagações, incentivo, dedicação à pesquisa e disponibilidade infindáveis.

À Prof. Ana Lúcia Coutinho Domingues pela disponibilidade na realização dos exames de ultrassonografia, pelo exemplo de dedicação a assistência e a pesquisa.

À minha colega de doutorado, Andréa Dória, pela colaboração com a coleta de dados, sempre disposta e dedicada ao trabalho e pesquisa, compartilhando conhecimentos, apoiando, incentivando, nos momentos mais difíceis, a continuar nossa caminhada.

Aos colegas do grupo metabonômica, em especial a Carlos, Tássia, Ronaldo e Joana, por todo o trabalho realizado junto à Central Analítica, pela disponibilidade, amizade, conhecimentos compartilhados, momentos inesquecíveis. Vocês foram dez!

A todos os amigos da UTI do Hospital das Clínicas por aceitarem com compreensão as minhas ausências. Em especial, a Bárbara colocando-se sempre à disposição para cobrir minhas faltas que este projeto requereu.

A Izolda Fernandes pelo apoio e facilitação para realização dos exames no Laboratório Central do HC-UFPE.

Aos meus irmãos e amigos queridos, pelo incentivo e torcida.

Sr. Walter Leite, secretário do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, pela dedicação, compreensão e facilitação nas rotinas dos pós-graduandos.

Ao Dr. Eniedson Barros pelo apoio ao viabilizar minha licença para realização deste estudo.

Às minhas colegas e gerentes, Dras. Monica Rayol, Rosana Eloi e Adriana Reis pelo apoio, compreensão e facilitação da licença no Hospital dos Servidores do Estado.

À colega do doutorado Dayse, que facilitou o elo com os indivíduos do grupo controle.

A Cícera pelo auxílio na coleta e no processamento de sangue e urina para realização dos exames laboratoriais no Laboratório Central do HC-UFPE.

A todas as pessoas que, mesmo não citadas nominalmente, direta ou indiretamente contribuíram de alguma maneira para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

RESUMO

Recentemente novos métodos para o diagnóstico e seguimento das doenças hepáticas vêm sendo avaliados. A estratégia metabonômica tem atraído diversos pesquisadores por dispor da capacidade de detectar mudanças no perfil de metabólitos dos biofluidos analisados em diferentes processos fisiopatológicos. A espectroscopia de ressonância nuclear magnética (RNM) é uma das principais ferramentas utilizadas para análise dessas alterações, permitindo identificação, classificação e monitoramento de doenças de forma rápida, não invasiva e reprodutível. Este trabalho teve como objetivo identificar pacientes com infecção crônica pelo HBV, HCV e doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), a partir de modelo metabonômico obtido da análise das amostras de urina utilizando a espectroscopia de RNM de hidrogênio (^1H). Os resultados deste estudo deram origem a três artigos: ARTIGO 1: **Emprego da metabonômica no diagnóstico da doença hepática gordurosa não alcoólica em amostras de urina.** Estudo piloto com objetivo de diagnosticar a DHGNA através da metabonômica utilizando amostras de urina. Foram estudados 30 indivíduos, sendo 20 pacientes com DHGNA e 10 indivíduos controles. O modelo metabonômico obtido foi capaz de diferenciar os dois grupos de estudo com sensibilidade de 95% e especificidade de 90%. Também foram identificados os principais metabólitos responsáveis por essa discriminação. Concluiu-se que a espectroscopia de RNM possibilitou o diagnóstico, por meio de análise da urina, da DHGNA com elevada acurácia. ARTIGO 2: **Emprego da metabonômica no diagnóstico das hepatites virais B e C em amostras de urina.** Estudo piloto realizado para avaliação de teste diagnóstico das hepatites B e C em amostras de urina de 77 pacientes, sendo 32 com infecção pelo HBV, 27 com infecção pelo HCV e 18 indivíduos saudáveis, através da espectroscopia de RNM. Foram construídos três modelos metabonômicos: o Modelo 1 possibilitou diferenciação entre o grupo HBV e grupo controle com 100% de sensibilidade e 77,8% de especificidade. O Modelo 2 distinguiu o grupo HCV do controle,

com 92,6% de sensibilidade e 77,8% de especificidade. E, o Modelo 3 permitiu separação entre os grupos de pacientes infectados (grupos HBV e HCV) e Controle, com 94,9% de sensibilidade e 77,8% de especificidade. Resultados surpreendentes encontrados, indicando que aplicação da estratégia metabonômica em uma simples análise da urina obteve-se acurácia suficiente para diferenciar indivíduos saudáveis de pacientes com infecção hepática viral. ARTIGO 3: **Metabonômica aplicada às doenças hepáticas**, de revisão, teve como objetivos apresentar os fundamentos da metabonômica e realizar revisão bibliográfica a respeito da aplicação da espectroscopia de RNM nas doenças hepáticas, utilizando a plataforma PubMed, no período de janeiro/2010 a dezembro/2014, com os termos de busca: “*metabonomic or metabonomics*, “*metabolomic or metabolomics and liver disease*”. Encontrados 467 artigos. Restringindo-se aos estudos que empregaram a espectroscopia de RNM, foram identificados 80 artigos. Desses, apenas 13 aplicavam a RNM em amostras de sangue ou urina para avaliação das doenças hepáticas. Conclusão final: a espectroscopia de RNM acoplada a métodos de análise estatística multivariada tem potencial para rastrear, por meio de uma única amostra de urina, três doenças hepáticas simultaneamente, infecção pelo HBV, HCV e DHGNA.

Palavras chave: Metabonômica. RMN. Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica. Hepatite. Esteatose.

ABSTRACT

In recent years, new methods for the diagnosis and monitoring of liver diseases have been evaluated. Metabonomics has attracted several researchers, due to its ability to detect alterations in metabolite profile of biofluid samples on different pathophysiological processes. Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy is one of the main tools used for analyses of these changes, allowing the diagnosis and monitoring of diseases, promptly, in a non-invasive and reproducible manner. The aim of this work is to diagnosis patients with chronic infection by HBV, HCV and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) by proton NMR based on urine samples applying metabonomics. ARTICLE 1: **Nonalcoholic Fatty Liver Disease diagnosis by ^1H NMR based on urine metabonomics.** A pilot study that aimed to diagnose NAFLD by metabonomics using urine samples by NMR spectroscopy analyses. In a total of 30 individuals studied, 20 patients had non-alcoholic fatty liver disease and 10 were healthy controls. Metabonomics model was able to differentiate the groups with sensitivity of 95% and specificity of 90%. It also identified the main metabolites responsible for such discrimination. Based on these data it was possible to conclude that NMR spectroscopy makes possible a diagnosis, through urine analysis, of NAFLD with high accuracy. ARTICLE 2: **Hepatitis B and hepatitis C diagnosis by ^1H NMR spectroscopy based on urine metabonomics.** A pilot study to assess a diagnostic test, which studied a group of 77 patients, of which 32 had HBV infection, 27 had HCV infection, and 18 constituted a healthy individual control group. Urine samples were analyzed by ^1H NMR combined with multivariate statistical tools in order to classify them. Three metabonomics models were obtained. Model 1, differentiated the HBV group from Control group with 100% sensitivity and 77.8% of specificity. Model 2, distinguished the HCV group with 92.6% of sensitivity and 77.8% of specificity. Model 3, identified the group with all the infected patients (HBV

and HCV + group) from control group with 94.9% of sensitivity and 77.8% of specificity. These results indicate that urine analysis based on metabonomics is sufficiently accurate to differentiate patients with viral liver infection. Based on our findings, nuclear magnetic resonance spectroscopy coupled with multivariate statistical analysis techniques has the potential to be developed in a simple urinary screening tests. **ARTICLE 3: Metabonomics applied to liver diseases**, a review article aimed to present the fundamentals of metabonomics and review the literature regarding the application of nuclear magnetic resonance spectroscopy to liver diseases. A bibliographic search in PubMed platform, from January 2010 to December 2014. The search terms used were "*metabonomic OR metabonomics OR metabolomic OR metabolomics AND liver disease*" from which four hundred and sixty seven articles were found. When the search was restricted to the use of NMR spectroscopy, 80 articles were identified. From these, only 13 were selected, which applied NMR spectroscopy in blood or urine samples for evaluation of liver disease. In conclusion, the patient can be screened to three liver diseases simultaneously: hepatitis B, hepatitis C and non-alcoholic fatty liver disease, with only a single urine sample.

Keywords: Metabonomics. NMR. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. Hepatitis. Steatosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Quantitativo anual de publicações encontradas no banco de dados Scopus, no período de 1999 a 2014, utilizando os termos de busca “ <i>metabonomics</i> OR <i>metabonomic</i> OR <i>metabolomics</i> OR <i>metabolomic</i> . Acessado em 06.de janeiro de 2015.....	23
Figura 2.	Espectroscopia de ressonância magnética da lesão, glioma, mostrando um aumento no pico de colina com diminuição no pico de N-acetil-aspartato (NAA). Níveis elevados de colina e da relação colina/creatinina e diminuição dos níveis de NAA. Fonte: MR spectroscopy. Knipe H, Gaillard F; 2008.....	26
Figura 3.	Espectros de RNM de ^1H (300 MHz) das amostras de urina (A) sem pré saturação do sinal da água, (B) com PRESAT, e identificação de alguns metabólitos.....	28
Figura 4.	Algoritmo para seleção dos estudos da revisão.....	44
Figura 5.	Seleção de variáveis. (A) Resultados da subtração da média dos espectros de RNM de ^1H da urina do grupo doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) e do grupo Controle. Os sinais negativos implicam em altos valores das variáveis no grupo Controle e os sinais positivos indicam altos valores das variáveis no grupo DHGNA. (B) Escores de importância das variáveis para projeção (VIP) obtidas pela PLS-DA.....	66

Tabela 1.	Média dos níveis séricos de AST, ALT, GGT, glicose, TGR, CT, LDL e HDL dos 30 indivíduos, sendo 20 com diagnóstico de Doença Gordurosa Hepática Não Alcoólica e 10 do grupo Controle, atendidos no Ambulatório de Hepatites do Hospital das Clínicas – UFPE.....	65
Tabela 2.	Identificação dos principais metabólitos discriminantes, seus deslocamentos químicos e seus níveis urinários relativos em cada grupo.....	67
Tabela 3.	Resultados do modelo metabonômico LDA para discriminação dos grupos DHGNA e Controle.....	67
Tabela 4.	Características clínicas e bioquímicas de 59 pacientes com infecção crônica pelo HBV e HCV e dos 18 indivíduos do grupo Controle.....	69
Tabela 5.	Resultados do modelo metabonômico baseado na Análise Discriminante Linear (LDA) para discriminação dos grupos HBV e Controle	70
Tabela 6.	Resultados do modelo metabonômico baseado na Análise Discriminante Linear (LDA) para discriminação dos grupos HCV e Controle.....	70
Tabela 7.	Resultados do modelo metabonômico baseado na Análise Discriminante Linear (LDA) para discriminação dos grupos HBV + HCV (doença) e Controle (saudável).....	71

Quadro1. Sumário dos artigos que aplicaram a metabonômica no estudo de doenças hepáticas, no período compreendido entre janeiro de 2010 e dezembro de 2014.....	51
--	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	– Alanina aminotransferase
Anti-HBc	– Anticorpo contra o antígeno core do vírus da hepatite B
Anti-HBeAg	– Anticorpo contra o antígeno <i>e</i> do vírus da hepatite B
Anti-HBs	– Anticorpo contra o antígeno de superfície do vírus da hepatite B
Anti-HCV	– Anticorpo contra o vírus da hepatite C
Anti-HIV	– Anticorpo contra o vírus da imunodeficiência humana
AST	– Aspartato aminotransferase
CHC	– Carcinoma hepatocelular
CT	– Colesterol total
CTP	– Do inglês, Child-Turcotte-Pugh
DA	– Análise discriminante
DHGNA	– Doença hepática gordurosa não alcoólica
DNA	– Ácido dexossirribonucléico
DQF	– Departamento de Química Fundamental
EH	– Esteato-hepatite
EHM	– Encefalopatia hepática mínima
EIE	– Ensaio imunoenzimático
ELF	– do inglês, <i>enhanced liver fibrosis</i>
FA	– Fosfatase alcalina
GC	– Cromatografia gasosa
GGT	– Gama glutamiltranspeptidase
HBsAg	– Antígeno de superfície do vírus da hepatite B
HBeAg	– Antígeno <i>e</i> do vírus da hepatite B

HBV	– Vírus da hepatite B
HC	– Hospital das Clínicas
HCV	– Vírus da hepatite C
HDL	– Lipoproteína de alta densidade
HIV	– Vírus da imunodeficiência humana
IMC	– Índice de massa corpórea
INR	– Razão normalizada internacional
LDA	– Análise discriminante linear
LDL	– Lipoproteína de baixa densidade
MELD	– do inglês, <i>Model for End-Stage Liver Disease</i>
MS	– Espectrometria de massa
PCA	– Análise de componentes principais
PCR	– Reação em Cadeia de Polimerase
PLS	– Mínimos quadrados parciais
ppm	– partes por milhão
RF	– Radio-frequência
RMI	– Ressonância magnética de imagem
RNM	– Ressonância nuclear magnética
RNM de ^1H	– Ressonância nuclear magnética de Hidrogênio-1
RMS	– Espectroscopia de ressonância magnética <i>in vivo</i>
RNA	– Ácido Ribonucléico
ROC	– Do inglês, <i>receiver operating characteristic</i>
TCLE	– Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGR	– Triglicerídeo
UFPE	– Universidade Federal de Pernambuco

US	– Ultrassonografia
VIP	– do inglês <i>Variable Importance in the Projection</i>
VLDL	– Lipoproteína de muito baixa densidade
VMN	– Valor Máximo da Normalidade

SUMÁRIO

1.	APRESENTAÇÃO.....	20
2.	REVISAO DA LITERATURA.....	22
2.1.	METABONÔMICA.....	22
2.2.	RESSONÂNCIA NUCLEAR MAGNÉTICA DE HIDROGÊNIO...	26
2.3.	DOENÇAS HEPÁTICAS CRÔNICAS	32
2.3.1..	INFECÇÃO CRÔNICA PELO VÍRUS DA HEPATITE B.....	33
2.3.2.	INFECÇÃO CRÔNICA PELO VÍRUS DA HEPATITE C.....	36
2.3.3.	DOENÇA HEPÁTICA GORDUOSA NÃO ALCOÓLICA.....	38
2.4.	METABONÔMICA/METABOLÔMICA NAS DOENÇAS HEPÁTICAS.....	43
3.	HIPÓTESE.....	54
4.	OBJETIVOS.....	54
4.1.	Objetivo Geral.....	54
4.2.	Objetivos Específicos.....	54
5.	PACIENTES E MÉTODOS.....	55
5.1.	DESENHO DO ESTUDO.....	55
5.2.	LOCAL DO ESTUDO.....	55
5.3.	POPULAÇÃO DO ESTUDO.....	55
5.3.1	População Alvo.....	55
5.3.2.	Definição dos grupos do estudo.....	56
5.3.3.	Critérios de Inclusão.....	56
5.3.4.	Critérios de Exclusão.....	57
5.3.5.	Tipo de amostragem.....	57
5.4.	VARIÁVEIS.....	57

5.4.1.	Variáveis independentes.....	57
5.4.2.	Variáveis dependentes.....	57
5.5.	OPERACIONALIZAÇÃO DA PESQUISA.....	58
5.5.1.	Métodos de coleta dos dados.....	58
5.5.1.1.	Atendimento no ambulatório de Hepatologia.....	58
5.5.1.2.	Análises clínicas.....	58
5.5.1.3.	Análise metabonômica / Ressonância Nuclear Magnética de Hidrogênio-1.....	59
5.5.2	Análise estatística e redução de dados dos espectroscópios.....	60
5.5.3.	Fluxograma da pesquisa.....	62
6.	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	63
7.	RESULTADOS.....	64
7.1.	Artigo 1 - Emprego da metabonômica no diagnóstico de doença hepática gordurosa não alcoólica em amostras de urina.....	64
7.2.	Artigo 2 - Emprego da metabonômica para diagnóstico das hepatites virais B e C na urina.....	68
8.	DISCUSSÃO	72
8.1	Artigo 1 - Emprego da metabonômica no diagnóstico de doença hepática gordurosa não alcoólica em amostras de urina.....	72
8.2	Artigo 2 - Emprego da metabonômica para diagnóstico das hepatites virais B e C na urina.....	76
9.	CONCLUSÕES	78
9.1	Artigo 1 - Emprego da metabonômica no diagnóstico de doença hepática gordurosa não alcoólica em amostras de urina.....	78
9.2	Artigo 2 - Emprego da metabonômica para diagnóstico das hepatites	

	virais B e C na urina.....	78
9.3	Considerações finais.....	79
	REFERÊNCIAS.....	81
	APÊNDICE A – Termo de consentimento livre e esclarecido.....	90
	APÊNDICE B – Questionário padronizado/Ficha clínica.....	92
	APÊNDICE C – Emprego da metabonômica no diagnóstico de doença hepática gordurosa não alcoólica em amostras de urina.....	94
	APÊNDICE D - Metabonômica aplicada às doenças hepáticas.....	117
	ANEXO A – Aprovação do comitê de ética em pesquisa da UFPE.....	138

1. APRESENTAÇÃO

São muitas as doenças que afetam cronicamente o fígado, dentre elas as infecções pelos vírus da hepatite B (HBV) e C (HCV) e a doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), sendo esta a mais prevalente, acometendo de 20% a 40% da população dos países industrializados (BROWNING et al., 2004). Com o passar dos anos essas doenças podem progredir para cirrose e suas complicações, até o desenvolvimento do carcinoma hepatocelular (CHC), apresentando elevada morbimortalidade. Diversos exames laboratoriais e de imagem para diagnóstico das doenças do fígado vêm sendo avaliados nos últimos anos.

Atualmente os testes diagnósticos usados como rotina tanto para rastreamento como para diagnóstico das infecções pelos HBV e HCV, praticamente, são divididos em dois grupos: ensaios sorológicos para anticorpos (ensaios imunoenzimáticos - EIE) e testes de biologia molecular para pesquisa de partículas virais (reação em cadeia de polimerase - PCR). Os testes por EIE apresentam elevada sensibilidade e especificidade, chegando a identificar aproximadamente 97% dos pacientes infectados, mas não distinguem infecções agudas das crônicas, nem ativas de imunidade após infecção, sendo necessário, em muitos casos, a realização de outros testes, como, por exemplo, a PCR, para detectar viremia (LOPES et al. 2000; GRETCH, 1997).

Os indivíduos com DHGNA necessitam, habitualmente para o diagnóstico, da realização de exames de imagem. O padrão de referência para o diagnóstico diferencial entre esteatose simples e esteato-hepatite, este último com maior probabilidade de evolução para cirrose e CHC, é a biópsia hepática, exame invasivo e com risco de complicações graves. Com o aumento da população de obesos no mundo, a prevalência e o impacto da DHGNA vem crescendo, devendo provavelmente tornar-se, a causa mais comum de doença hepática crônica grave nas próximas décadas (VERNON; BARANOVA; YOUNOSSI, 2011).

Nos últimos anos observa-se um crescente interesse na tecnologia metabonômica em função do seu potencial para a detecção, identificação, quantificação e classificação das mudanças metabólicas tempo-relacionadas, integradas ao sistema biológico, numa visão global do organismo ao invés da avaliação da célula isoladamente.(NICHOLSON; LINDON; HOLMES, 1999; ZHANG et al., 2012a). A espectroscopia de ressonância nuclear magnética (RNM)¹ é uma das principais ferramentas utilizadas para análise dessas alterações metabólicas, uma vez que possibilita identificar e fazer a quantificação relativa dos metabólitos em um dado biofluido. Contudo, faz-se necessário o emprego de ferramentas de estatística multivariada para investigar semelhanças e diferenças desses espectros em função do status bioquímico da amostra, considerando a complexidade dos espectros, que reportam centenas de componentes numa única medida (LINDON; HOLMES; NICHOLSON, 2003).

A metabonômica vem mostrando ser um método diagnóstico rápido, simples, não invasivo e acurado. Isso foi demonstrado em um estudo piloto publicado no *Journal of Viral Hepatitis* 2010, por nosso grupo, o qual identificou, a partir do modelo metabonômico construído sobre os dados espectrais de RNM em amostras de urina, pacientes com infecção crônica pelo HCV com sensibilidade de 94%, especificidade de 97% e valores preditivos positivo e negativo de 97% e 94%, respectivamente (GODOY et al., 2010).

Dando continuidade àquele trabalho, resolvemos incluir mais dois outros grupos, com infecção crônica pelo HBV e com DHGNA, com o objetivo de construir modelos metabonômicos capazes de identificar cada grupo através da análise das amostras de urina.

¹ O trabalho aqui desenvolvido tem caráter multidisciplinar, envolvendo conhecimentos médicos, químicos e de estatística multivariada. O termo Ressonância Nuclear Magnética (RNM) é muito comum no meio médico, no entanto, entre os químicos a designação usual é espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Considerando que o trabalho está vinculado ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, optou-se pelo uso de RNM.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 METABONÔMICA

A metabonômica é definida como uma “medida quantitativa da resposta multiparamétrica dos metabólitos dos seres vivos, em consequência a estímulos fisiopatológicos ou modificação genética” (NICHOLSON; LINDON; HOLMES, 1999). Envolve a determinação do perfil, dinâmico e tempo dependente, dos metabólitos dentro do organismo e como ele se altera em decorrência de algum processo biológico (NICHOLSON et al., 2002). O termo tem origem grega “meta” significando mudança e “nomos” regras ou leis e foi criado por Jeremy Nicholson, Elaine Holmes e John Lindon, do Imperial College of London, em 1999, para descrever a geração de modelos quimiométricos que têm capacidade para classificar as mudanças do metabolismo (ZHANG et al., 2012b). É muito frequente encontrar na literatura o uso dos termos metabolômico e metabonômico como se fossem sinônimos. No entanto, há uma distinção procedimental quando se aplica uma ou outra estratégia. No emprego da “metabolômica”, o pesquisador busca uma descrição analítica das amostras biológicas e tem por objetivo identificar e quantificar aqueles metabólitos presentes no biofluido estudado, que estejam associados à discriminação dos grupos com *status* bioquímico diferente e, portanto, com o estado de doença específico (DUNN; ELLIS, 2005a; NICHOLSON; LINDON, 2008). No caso do emprego da estratégia “metabonômica”, a identificação de todos os metabólitos não é uma condição *sine qua non*, pois o pesquisador busca encontrar um perfil de metabólitos endógenos, presentes no analito, e associá-lo ao *status* bioquímico da amostra. Essa sutil diferença faz com que métodos analíticos diferentes sejam empregados em cada uma das estratégias. Na “metabolômica”, em função da necessidade de identificar e quantificar os metabólitos, frequentemente utiliza-se uma técnica de separação de misturas,

como cromatografia em fase gasosa ou líquida, associada a um sistema de detecção com alta sensibilidade, como a espectrometria de massas e, no caso da “metabonômica”, é mais frequente o uso da espectroscopia de RNM, sem uma separação prévia dos componentes da mistura (DUNN; ELLIS, 2005).

O número de estudos científicos empregando esses métodos vem aumentando a cada dia, pois eles têm mostrado enorme potencial na investigação do estado fisiológico, diagnóstico de doenças, descoberta de novos biomarcadores e identificação das vias metabólicas alteradas devido a doenças ou tratamentos (BHARTI; ROY, 2012; ZHANG et al., 2012b, 2010b). A figura 1 apresenta um gráfico produzido a partir do banco de dados Scopus, podendo-se observar o crescimento anual dos artigos publicados com os termos “*metabonomic*” OR “*metabonomics*” OR “*metabolomic*” OR “*metabolomics*” desde janeiro de 1999, com apenas um artigo publicado, até dezembro de 2014 com 2603 artigos publicados neste ano. Percebe-se que é uma área em plena expansão, abrindo fronteiras para novos conhecimentos científicos.

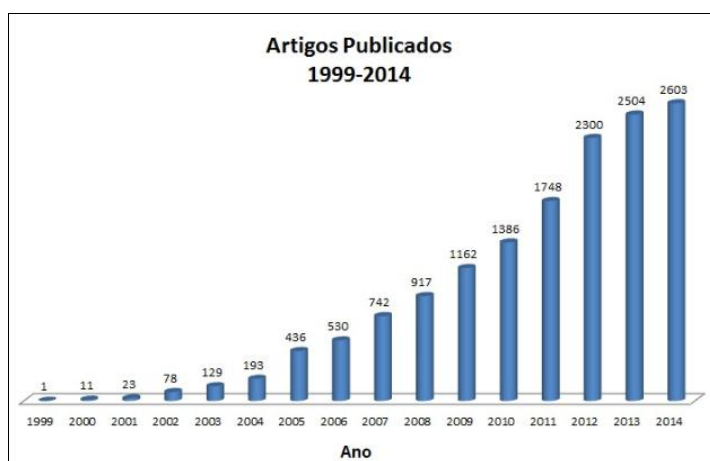


Figura1: Quantitativo anual de publicações encontradas no banco de dados Scopus, no período de 1999 a 2014, utilizando os termos de busca “*metabonomics* OR *metabonomic* OR *metabolomics* OR *metabolomic*”. Acessado em 06.de janeiro de 2015.

A metabonômica fundamenta-se no princípio básico dos seres vivos chamado homeostase. Quando um sistema vivo é exposto a situações de estresse, a uma doença ou a algum agente químico, ele responde no sentido de neutralizar a ação externa, havendo mudanças na

concentração e no fluxo dos metabólitos endógenos, quebrando o equilíbrio, desencadeando ajustes do ambiente intracelular e extracelular, de forma a manter o meio interno estável. Essa alteração no perfil dos metabólitos endógenos presentes nos biofluidos pode ser avaliada através da espectroscopia de RNM, fornecendo uma “impressão digital” metabólica, a qual é específica da natureza ou sítio da agressão (LINDON; HOLMES; NICHOLSON, 2003), considerando-se que, a partir dos espectros de RNM, é possível acuradamente identificar e quantificar os metabólitos de baixo peso molecular presentes no biofluido (COEN et al., 2008; FERNIE; TRETHEWEY; KROTZKY, 2004; NICHOLSON; LINDON, 2008). Além da espectroscopia de RNM, outros métodos podem ser utilizados para produzir o perfil metabólico dos biofluidos, como a espectrometria de massa (MS - “mass spectroscopy”), a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC/MS – “gas chromatography/mass spectroscopy”), a cromatografia líquida de alta performance (HPLC - “high performance liquid chromatography”) ou técnicas de espectroscopia óptica. A RNM e a MS são as melhores técnicas, na medida em que podem produzir rápida e adequadamente um conjunto de dados metabonômicos (LENZ; WILSON, 2007).

Um fator limitante para o entendimento da informação gerada pelos espectros é a sua grande complexidade, contendo centenas de variáveis que dificilmente poderiam ser processadas manualmente. Para sua eficiente interpretação faz-se necessário o uso de técnicas de estatística multivariada que, aplicada a dados químicos numéricos, quimiometria, reduzem a dimensionalidade desse conjunto de dados, sendo indispensáveis para a extração do máximo possível de informações. Também chamadas técnicas de reconhecimento de padrão, entre as mais frequentemente empregadas com sucesso, em estudos metabonômicos, estão a análise de componentes principais (PCA), análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PSL-DA), análise discriminante (DA), a análise de classificação simples (SIMCA – “soft independent modelling of class analogy”), entre outras, permitindo analisá-los de forma mais

simples, rápida e reprodutível (COEN et al., 2008; KEUN, 2006; LINDON; HOLMES; NICHOLSON, 2001).

Os biofluidos mais frequentemente utilizados nesses estudos são a urina e o soro/plasma, obtidos de maneira não invasiva, ou minimamente invasiva. Contudo uma grande variedade de materiais, tais como líquido cefalorraquiano (LCR), seminal, sinovial, amniótico, bile, aspirados pulmonares, sobrenadantes de cultura celular e até amostras de tecido, também podem ser utilizados (ZHANG et al., 2012b). Cada biofluido tem uma composição bioquímica característica e única, refletindo o estado fisiológico ou patológico do organismo e revelando às alterações metabólicas sofridas (LENZ; WILSON, 2007). Isso reflete o potencial da técnica e o crescimento do interesse acadêmico pela mesma.

A urina é o biofluido ideal para o estudo de doenças. São numerosas suas vantagens, especialmente pelo fato de estar pronta para ser utilizada, ser obtida com facilidade, melhorando substancialmente a adesão dos pacientes, permite coleta seriada de amostras para monitoração de doenças e resposta terapêutica, especialmente em estudos longitudinais, além de ser menos complexa, com menor conteúdo proteico que outros fluidos (RYAN et al., 2011; ZHANG et al., 2012c).

Os testes laboratoriais tradicionais e histopatológicos permanecem a forma mais comum para diagnóstico de doenças, mas não são específicos da região acometida e só se alteram após lesão tecidual estabelecida, portanto a análise metabonômica da urina tem-se mostrado com grande potencial para identificação de novos biomarcadores e diagnóstico precoce de uma série de doenças (ZHANG et al., 2013b).

2.2 RESSONÂNCIA NUCLEAR MAGNÉTICA DE HIDROGÊNIO-1 (RNM de ^1H)

Quando se fala em RNM, a modalidade que logo os médicos pensam e que estão habituados a utilizar na prática clínica é a Ressonância nuclear magnética de imagem (RMI). Este é um método diagnóstico bastante utilizado pela ausência de radiação ionizante e pela capacidade de gerar informações anatômicas através da medida das moléculas de água, permitindo distinguir tecidos moles com nitidez. Mais recentemente, associada a RMI, vem-se utilizando a espectroscopia de ressonância magnética (RMS), disponível nos scanners de RMI produzidos comercialmente. Este fornece informações da estrutura química e consequentemente, dos metabólitos do tecido, analisado *in vivo*, sendo mais específica em diagnosticar e avaliar doenças do que informação morfológica adquirida usando a imagem anatômica sozinha, obtida pela RMI (GALLAGHER, 2010; HOLMES; TSANG; TABRIZI, 2006). Essas modalidades de ressonância utilizam campos magnéticos da ordem de 1,5 T, de baixa resolução (figura 2).

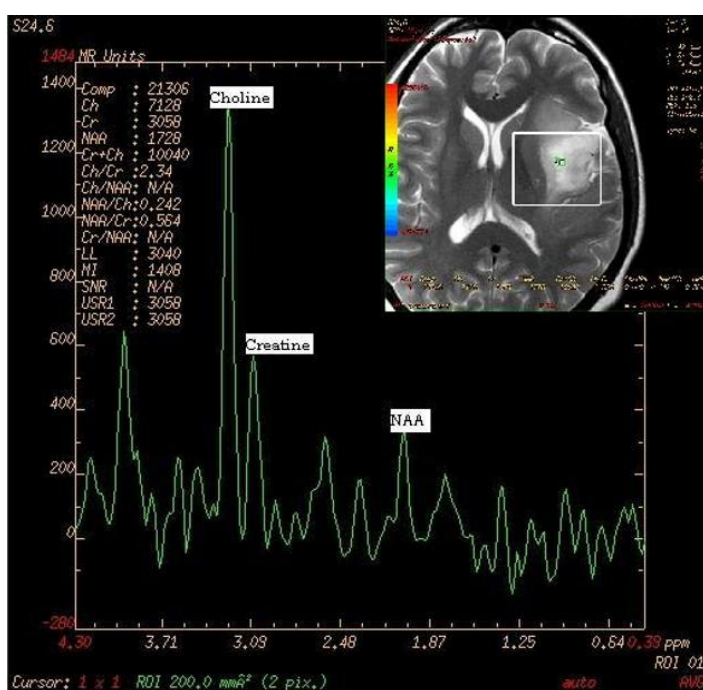


Figura 2. Espectroscopia de ressonância magnética da área da lesão demarcada.

Fonte: MR spectroscopy. Knipe H, Gaillard F; 2008.

(<http://radiopaedia.org/articles/mr-spectroscopy-1>)

Na metabonômica, utilizam-se equipamentos com campos magnéticos iguais ou superiores a 7 T. Isso resulta em espectros com melhor resolução, possibilitando a identificação e quantificação relativa de diferentes metabólitos, associando-os ao *status* bioquímico da amostra.

Em nossa pesquisa utilizamos a espectroscopia de RNM de alta resolução (7T), diferente da RMI (1,5T), para diferenciar, por meio da análise da urina, pacientes com doença hepática, bem como identificar os metabólitos associados a estas discriminações.

A espectroscopia de RNM fundamenta-se na interação dos núcleos atômicos com a radiação eletromagnética, na presença de um campo magnético externo. Para que um núcleo atômico seja analisável por RNM, é necessário que ele possua spin nuclear (I) diferente de 0 (zero), ou seja, ele precisa ter número atômico e/ou número de massa ímpar. A abundância natural do isótopo de hidrogênio-1 (99,98%) e a sua frequência nos biofluidos fazem com que a RNM de ^1H seja a escolhida para gerar o perfil de metabólitos desse biofluido, em estudos que empregam a estratégia metabonômica, embora existam outros núcleos, como ^{13}C , ^{31}P e ^{15}N , que também poderiam ser utilizados (KEUN et al. 2006).

Em princípio, todos os núcleos de um mesmo isótopo deveriam apresentar a mesma frequência de ressonância. No entanto, o ambiente químico no qual o núcleo está inserido provoca uma ligeira alteração na frequência de ressonância, chamada de deslocamento químico (δ). Na prática, o δ é expresso em ppm (partes por milhão), considerando que a frequência do núcleo é da ordem de mega-hertz (MHz) e a alteração provocada pelo ambiente químico é da ordem de hertz (Hz). Então, o espectro de RNM é apresentado de maneira tal que, numa dimensão, tem-se o δ e na outra a intensidade dos sinais. Com isso, salvo em raras exceções, uma mesma substância apresenta diferentes sinais no espectro de RNM de ^1H , fornecendo dados acerca da estrutura química das espécies (HOLMES; TSANG; TABRIZI, 2006). A intensidade do sinal está relacionada à quantidade de spins responsáveis por aquela

ressonância em particular, portanto, esta intensidade é proporcional à concentração do metabólito ao qual foi atribuído. Para exemplificar, as figuras 3 e 4 apresentam os espectros de RNM de ^1H (300 MHz) de amostras de urina e soro, respectivamente, com identificação de alguns metabólitos.

Na obtenção de espectros de RNM das amostras de biofluido, alguns aspectos são importantes considerar, visando obter o máximo de informações. Via de regra, a água é o principal componente de um biofluido, especialmente urina, implicando que o sinal atribuído à água domine o espectro (figura 3A), dificultando a visualização dos sinais associados às moléculas dos metabólitos em concentrações inferiores. Para eliminar ou diminuir essa interferência, utiliza-se uma sequência de pulsos de RF (radiofrequência) para suprimir o sinal da água. O espectro apresentado na figura 3B utiliza a sequência PRESAT, que é uma das mais utilizadas para esse fim.

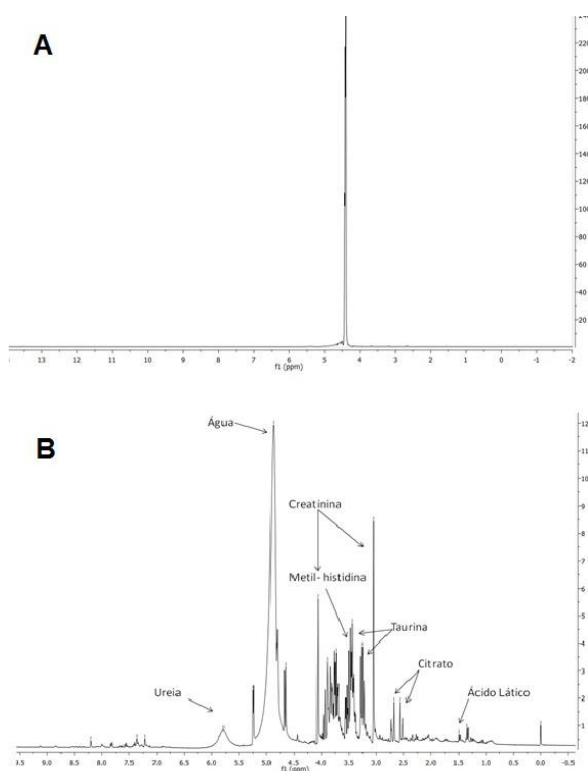


Figura 3- Espectros de RNM de ^1H (300 MHz) das amostras de urina (A) sem pré saturação do sinal da água, (B) com PRESAT, e identificação de alguns metabólitos.

Uma vez que o sinal da água tenha sido suprimido, claramente um grande número de metabólitos serão detectados, evidenciando a sobreposição de sinais devido à estreita faixa para deslocamento químico, aproximadamente 10 a 12 ppm, especialmente em espectrômetros de campo magnético médio (4,7T a 9,45T, correspondentes a frequências de ressonância de 200 a 400 MHz). Os aparelhos de ressonância com campo magnético mais elevado, por exemplo de 18,8T e frequência de RNM 800MHz, apresentarão um sinal maior de dispersão, mas também contribuirão para o aumento da complexidade do espectro com consequente aumento na sensibilidade (LENZ; WILSON, 2007).

Um outro aspecto a considerar para análise das amostras de urina é o pH, que varia muito de paciente para paciente. Geralmente é esperado uma variação no pH urinário de 5,5 a 6,5 em condições fisiológicas normais, mas, em situações de estresse fisiológico, quando estocadas por longo período, ou durante processamento da amostra, pode variar de 4,6 a 8,0 (BHARTI; ROY, 2012; LAURIDSEN et al., 2007; LENZ; WILSON, 2007). Portanto, como o δ é função do pH do meio, esse é um fator que deve ser considerado e os espectros de urina sempre são obtidos utilizando uma solução-tampão de fosfatos para uniformizar o pH do meio, minimizando a variação do δ e assegurando a comparabilidade dos dados espectrais entre os diferentes estudos metabonômicos. Algumas outras medidas também são sugeridas, como condições de armazenamento da amostra e uso de soluções preservativas. Em seu estudo, Lauridsen e cols, em 2007, observaram que as amostras de urina podem ser estocadas à temperatura de -25°C por até 26 semanas, não evidenciando nenhum efeito prejudicial quando comparadas ao armazenamento a -80°C , anteriormente preconizado. Também não viram necessidade do uso de soluções preservativas, inibidoras do crescimento bacteriano, quando estocadas à temperatura $\leq -25^{\circ}\text{C}$. Enquanto, se amostras fossem estocadas a 4°C ou não estivessem estéreis, a adição de soluções preservativas, de preferência azida de sódio, era extremamente necessária (LAURIDSEN et al., 2007).

Apesar de a espectroscopia de RNM de ^1H ter seu papel original na elucidação das estruturas químicas, a técnica tem alcançado imenso e crescente valor em caracterizar as alterações metabólicas das doenças, toxicidade por drogas ou modificações genéticas (LINDON; HOLMES; NICHOLSON, 2003).

A RNM é muitas vezes preferida em relação às outras ferramentas analíticas por apresentar a vantagem de constituir técnica não destrutiva, rápida, requerer pouco ou nenhum pré-tratamento, além de dispensar o uso de amostras padrões para a co-injeção e identificação dos compostos (LENZ; WILSON, 2007; NICHOLSON et al., 2002). Constituem características importantes, uma vez que, quanto mais intervenções feitas no analito, mais riscos à confiabilidade do método, tendo em vista que a amostra fica exposta a possíveis perdas de material ou a contaminações. Já os estudos que utilizam a MS requerem que os metabólitos sejam separados do fluido biológico antes da detecção, usando a HPLC, ou outras variantes modernas. Alternativamente, os metabólitos podem ser quimicamente modificados para torná-los mais voláteis, então a GC/MS pode ser usada. Apesar de a RNM não ser tão sensível quanto a MS, é mais fidedigna para obtenção das concentrações dos metabólitos (NICHOLSON; LINDON, 2008).

Uma grande preocupação em relação ao uso da metabonômica em estudos clínicos são as variações inerentes aos pacientes, quando comparadas às observadas em experimentos com animais, nos quais consegue-se melhor controle. Contudo, apesar da grande variação existente na população humana, em que os fatores genéticos e ambientais (incluindo dieta) são apenas minimamente controlados, amostras, tanto de urina como de plasma, podem ser utilizadas para análise metabonômica em estudos clínicos bem controlados, pois podem ser retiradas dos dados espectrais empregando ferramentas de estatística multivariada (HOLMES; TSANG; TABRIZI, 2006; LENZ; WILSON, 2007; NICHOLSON; LINDON; HOLMES, 1999).

Em muitos casos, a inspeção visual dos espectros resulta apenas em informações pouco significativas. Dificilmente, reconhecem-se mudanças no perfil de metabólitos, por esse meio, pois as diferenças espectrais intrínsecas e a presença da variação biológica natural tornam difíceis essas avaliações (LINDON; HOLMES; NICHOLSON, 2003). Desta forma, o emprego de métodos estatísticos multivariados de reconhecimento de padrões é indispensável para a extração das informações de interesse. Como exemplo, temos a PCA, a DA, a PSL-DA, análise de discriminante linear (LDA), a SIMCA, entre outras (LENZ; WILSON, 2007; LENZ et al., 2004).

A PCA é uma abordagem estatística não supervisionada, amplamente utilizada nos estudos metabonômicos. Permite que seja encontrado um padrão de agrupamento das amostras, sem nenhum conhecimento prévio da associação de classes, enquanto a LDA, por exemplo, é um método supervisionado, no qual a classificação das amostras é previamente determinada (LINDON; HOLMES; NICHOLSON, 2001).

Muitas vezes, as informações obtidas apenas com as ferramentas de reconhecimento de padrões, sem a atribuição dos sinais e o detalhamento da estrutura química dos metabólitos, podem ser suficientes para discriminar os grupos com *status* bioquímico distintos. Por outro lado, questionamentos mais avançados envolvem a identificação das substâncias no espectro, podendo servir como um “biomarcador”, diferenciando o estado patológico do normal. Sendo assim, os espectros de RNM dos biofluidos podem ser empregados para definir perfis espectrais associados a *status* bioquímicos distintos ou, indo mais além, identificando os metabólitos associados a essa discriminação, bem como a variação da concentração desses metabólitos em função do *status* bioquímico.

Então, o emprego da estratégia metabonômica representa uma mudança de paradigma na análise clínica, migrando de um sistema que visa determinar o teor (concentração absoluta) de certas substâncias, biomarcadores específicos, para um sistema no qual inicialmente

identifica-se perfis espectrais associados ao objeto de investigação, podendo-se identificar os metabólitos endógenos e suas concentrações relativas envolvidos nessas alterações. Assim, as mudanças no perfil dos metabólitos endógenos produzem um padrão do agente causador da perturbação, produzindo uma “impressão digital”, bioquimicamente fundamentada, tendo significado diagnóstico ou classificatório, estabelecendo um contexto clínico ou biológico.(LINDON; HOLMES; NICHOLSON, 2006)

Apesar do enorme crescimento no número de estudos científicos utilizando a metabonômica para diagnóstico de doenças, ainda muito pouco se conhece sobre as alterações metabólicas decorrente de agressões ao organismo ocasionadas pelas doenças hepáticas crônicas.

2.3 DOENÇAS HEPÁTICAS CRÔNICAS

As doenças hepáticas crônicas, hepatite B, hepatite C e a doença hepática gordurosa, são as principais responsáveis pelo desenvolvimento de cirrose e CHC, estando associadas a elevadas taxas de morbimortalidade. A prevenção e tratamento apropriados dessas doenças reduzem complicações e salvam vidas (BLACHIER et al., 2013). Uma preocupação permanece: parte desses pacientes desconhecem sua infecção, sendo veículos para disseminação do vírus, e são diagnosticados numa fase avançada de doença, quando as possibilidades terapêuticas são limitadas e pouco eficazes.

Um exame diagnóstico que seja mais rápido, menos invasivo e que possa detectar a doença precocemente seria o ideal.

A seguir é descrito como, na atualidade, realiza-se o diagnóstico das doenças hepáticas crônicas: infecção crônica pelo vírus da hepatite B (HBV) infecção crônica pelo vírus da hepatite C (HCV) e Doença hepática Gordurosa Não Alcoólica (DHGNA)

2.3.1 INFECÇÃO CRÔNICA PELO VÍRUS DA HEPATITE B

As infecções pelo HBV ainda constituem um grave problema de saúde pública, acometendo dois bilhões de pessoas e, dessas, 350 a 400 milhões são portadoras crônicas do vírus (EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF THE LIVER, 2012b). A hepatite pelo HBV pode evoluir para cirrose e CHC, condições associadas a elevada taxa de mortalidade, fazendo com que cerca de um milhão de mortes por ano sejam de causas relacionadas a hepatite B (MAUSS, BERG, ROCKSTROH, SARRAZIN, 2013). Estudos longitudinais em pacientes com infecção crônica pelo HBV não tratados indicam que, após o diagnóstico, o risco cumulativo para o desenvolvimento de cirrose, em cinco anos, variou de 8% a 20%. Entre os pacientes que apresentavam cirrose compensada, a probabilidade de sobrevida em cinco anos foi de 80% a 86%; já aqueles com cirrose descompensada tiveram pior prognóstico, com 14% a 35% de sobrevida nesse período. (CHU; LIAW, 2006; FATTOVICH; BORTOLOTTI; DONATO, 2008).

No intuito de diagnosticar mais precocemente esses indivíduos é necessário alertar os profissionais de saúde, médicos, para a realização de exames de rastreamento naquele grupo com fatores de risco para infecção, como contatos sexuais com pessoas portadoras do antígeno de superfície do HBV (HBsAg) positivas, usuários de drogas injetáveis, homossexuais masculinos, indivíduos infectados com HCV ou HIV, gestantes, detentos de unidades prisionais e cadeias, indivíduos com níveis elevados de alanina aminotransferase (ALT) ou aspartato aminotransferase (AST) ou outros sinais de doença hepática, pessoas com múltiplos parceiros sexuais ou história de doença sexualmente transmissível, todos indivíduos nascidos em áreas de intermediária ou alta prevalência para a infecção (> 2% da população com HBsAg positivo) e pacientes em hemodiálise ou quimioterapia (BLACHIER et al., 2013; NIEDERAU, 2014).

A maioria dos casos é assintomática ou oligossintomática. De modo geral, as manifestações clínicas aparecem apenas em fases avançadas da doença, com grau de acometimento hepático significativo, onde muitas vezes a uma única opção terapêutica restante a ser adotada é o transplante hepático (MAUSS, BERG, ROCKSTROH, SARRAZIN, 2013).

O diagnóstico geralmente é realizado a partir de alterações em exames de rotina ou na triagem em bancos de sangue. Os exames laboratoriais bioquímicos mostram leve a moderada elevação dos níveis séricos de ALT, AST na maioria dos pacientes, embora transaminases normais possam ocorrer (MAUSS, BERG, ROCKSTROH, SARRAZIN, 2013). Esses apesar de serem indicadores sensíveis de lesão do parênquima hepático, não são específicos para hepatites virais.

Várias doenças apresentam manifestações clínicas e alterações bioquímicas semelhantes à hepatite, sejam infecciosas ou não, como exemplo a DHGNA, hepatite autoimune, doença hepática alcoólica, dengue, febre amarela, entre outras.

A determinação do agente etiológico só é possível através de exames sorológicos, como o EIE, por meio da detecção de antígenos e anticorpos ou de biologia molecular com identificação do material genético, constituindo ferramentas de grande importância para o diagnóstico diferencial das hepatites. Esses exames são realizados em amostras de sangue, sendo necessária a punção de veia periférica por profissional habilitado, além de alguns deles serem de elevado custo e apresentarem demora no resultado (ZAAIJER et al., 1993).

Por intermédio da biologia molecular, por PCR, é realizada a identificação do HBV-DNA. Sua presença no sangue indica presença do vírus no organismo. Ele não é utilizado para rastrear a infecção, mas determina o risco de progressão da doença hepática e a indicação para tratamento naqueles indivíduos HBsAg positivos.

A presença do HBsAg significa infecção pelo HBV e sua persistência por mais de seis meses indica cronificação do processo. Já seu desaparecimento ou negatificação sugere bom

prognóstico, com provável evolução para resolução do processo infeccioso. A detecção do anticorpo contra o antígeno do nucleocapsídeo viral (anti-HBc), primeiro anticorpo detectado após infecção e que geralmente persiste por toda a vida, indica exposição do organismo ao HBV podendo significar tanto infecção ativa como pregressa (CAETANO; BECK, 2006).

A probabilidade de desenvolver infecção crônica é maior nos indivíduos infectados no período perinatal (90%) ou durante a infância (23% - 30%), quando o sistema imune está imaturo, do que quando infectados durante a fase adulta (<1%) (FATTOVICH; BORTOLOTTI; DONATO, 2008).

O decurso da doença e sua história natural são diversos e inconstantes, sendo determinada pela interação da replicação viral e resposta imune do hospedeiro, variando de um estado de portador inativo a uma hepatite crônica progressiva (EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF THE LIVER, 2012a), podendo ser dividida em quatro fases: tolerância imunológica, resposta imune, portador inativo e reativação (FATTOVICH; BORTOLOTTI; DONATO, 2008).

A fase da tolerância imunológica é altamente replicativa, caracterizada por níveis séricos elevados de HBV-DNA, normais ou levemente aumentados de ALT, com o antígeno *e* do HBV (HBeAg) presente e com mínima ou nenhuma atividade histológica na biópsia hepática. Esta é a fase mais frequentemente encontrada e a mais prolongada. Dura de 10 a 30 anos para os indivíduos infectados no período perinatal ou primeiros anos de vida, enquanto, naqueles infectados na fase adulta, ela pode ser de curta duração ou até mesmo não existir. Devido aos altos níveis de viremia, os pacientes são muito contagiosos. Após um período de tempo variável de positividade do HBeAg, dependendo da idade de aquisição da infecção, a imunotolerância ao vírus é perdida e o sistema imune passa a agredir os hepatócitos infectados, passando-se para a fase de resposta imune, onde evidenciam-se níveis flutuantes, mas progressivamente menores de HBV-DNA, níveis elevados de aminotransferases,

alterações necroinflamatórias e fibrose variável ao exame histopatológico. A taxa de eliminação espontânea do HBeAg é reforçada terminando com a soroconversão para anti-HBe, marco importante de transição para a terceira fase de portador inativo do HBsAg, com pouca ou nenhuma replicação viral. Esta é caracterizada pela ausência do HBeAg e positividade do anti-HBe, nível de HBV-DNA indetectável ou baixo ($< 2000\text{UI/mL}$), concentrações normais de aminotransferases e sem nenhuma ou mínima alteração histológica na biópsia hepática. Os portadores inativos podem, eventualmente, desenvolver a reativação do HBV com recrudescência da doença hepática espontaneamente ou desencadeada por imunossupressão ativa. (EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF THE LIVER, 2012b; FATTOVICH; BORTOLOTTI; DONATO, 2008; MAUSS, BERG, ROCKSTROH, SARRAZIN, 2013).

A eliminação do HBsAg e a soroconversão para anticorpo anti-HBs podem ocorrer espontaneamente em 1% a 3% dos casos/ano, em geral após vários anos de HBV-DNA persistentemente indetectável (EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF THE LIVER, 2012b). O anti-HBs tem importância na definição da infecção pelo HBV, sua presença no soro pode significar resposta do organismo com evolução para cura, ou resposta vacinal. Nos casos de cura da infecção, o HBsAg é negativo e o anti-HBc e anti-HBs são positivos. Nos casos de resposta vacinal, apenas o anti-HBs é positivo. (EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF THE LIVER, 2012a).

2.3.2 INFECÇÃO CRÔNICA PELO VÍRUS DA HEPATITE C

Na maioria dos casos é difícil estabelecer a história natural da infecção pelo HCV, devido ao fato da infecção aguda ser quase sempre assintomática, permanecendo assim por muitos anos, tornando raro o diagnóstico precoce da infecção.

Após a contaminação pelo HCV, cerca de 15% a 30% dos casos evoluem espontaneamente para cura dentro de seis meses, sem nenhum tratamento. Nesses casos observa-se negatificação da viremia (HCV-RNA negativo), normalização das aminotransferases e persistência do anticorpo contra o vírus da hepatite C (anti-HCV), como cicatriz imunológica (LAUER; WALKER, 2001; “WHO | Hepatitis C”, 2014).

Na maioria das vezes (70% a 85%) a infecção evolui para a cronicidade com persistência do anti-HCV e do HCV-RNA, proporcionando agressão hepática crônica e risco potencial de progressão para cirrose (15% a 30% desses pacientes, dentro de 20 anos) e CHC (POYNARD et al., 2000; VELÁZQUEZ et al., 2003). Uma vez estabelecida a infecção crônica, o clareamento espontâneo da viremia é raro.

Durante a evolução da hepatite crônica, cerca de 30% dos pacientes podem apresentar níveis séricos de ALT persistentemente normais, mas na maioria dos casos níveis de ALT e AST flutuam, desde discretas alterações até cerca de quatro vezes os valores normais. Com a progressão da doença ocorre desarranjo da arquitetura lobular e os níveis de AST tendem a se tornar superiores aos de ALT, sugerindo evolução para cirrose (LOPES et al. 2004).

O diagnóstico da hepatite C é comumente realizado através da detecção do anticorpo anti-HCV pelo teste sorológico de EIE, servindo para rastrear a infecção, mas não permitindo classificá-la em aguda ou crônica, ativa ou imunidade após infecção. Apesar da alta especificidade do teste (> 99%) resultados falsos positivos podem ocorrer em algumas situações clínicas como em mulheres grávidas, em pacientes com doenças imunológicas ou hematológicas e quando o teste é realizado entre a população com baixo risco de infecção (ANSALDI et al., 2014). Atualmente para firmar o diagnóstico da infecção pelo HCV é recomendado, além da realização do anti-HCV utilizar o teste molecular para detecção do HCV-RNA, confirmando a presença do vírus no organismo. (CDC, 2013; EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF THE LIVER, 2014). Além disso, no decurso da

infecção é necessário identificar o genótipo e quantificar a carga viral, ambos determinados por meio de testes moleculares. Estes são importantes na decisão e escolha do tratamento e acompanhamento de resposta terapêutica. Assim, alguns marcadores virais, sorológicos ou moleculares, podem ser usados tanto para fins de diagnóstico como de monitorização da infecção.

2.3.3 DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA (DHGNA)

O aumento da incidência de obesidade na sociedade moderna e o melhor manejo das hepatites virais crônicas fazem com que a DHGNA se torne a hepatopatia crônica mais frequente, acometendo 15% a 45% da população de países desenvolvidos, tanto adultos quanto crianças de todas as etnias. (TORRES; WILLIAMS; HARRISON, 2012)

O fígado é o principal órgão responsável pelo controle da homeostase dos carboidratos, lipídeos e proteínas do organismo e o desequilíbrio em suas funções vão proporcionar desordens metabólicas (KOO, 2013). Por exemplo, perturbações no metabolismo das gorduras, geralmente associadas à resistência insulínica nos tecidos periféricos, podem gerar alterações significantes nas rotas metabólicas e surgimento da DHGNA.

Esta doença é caracterizada pelo acúmulo de gordura, não relacionado ao consumo de bebida alcoólica, em mais de 3% a 5% dos hepatócitos, principalmente de triglicerídeos (TGR), embora outros metabólitos lipídicos, como ácidos graxos livres, colesterol e fosfolípidos também podem estar presentes (REEDER SB1, CRUITE I, HAMILTON G, 2012).

Do ponto de vista histopatológico, a DHGNA pode ser definida como esteatose, quando há apenas o acúmulo de gordura no fígado, ou como esteato-hepatite (EH), quando além da gordura também encontra-se lesão do hepatócito, inflamação e fibrose. A esteatose pode preceder a EH, doença de maior gravidade, que pode evoluir para cirrose e, em alguns casos,

CHC. Na esteatose simples, o risco de progressão para doença hepática avançada é pequeno e não há aumento de mortalidade em relação à população geral, enquanto que na EH estima-se que cerca de 11% dos casos desenvolverão cirrose ao longo de 15 anos e aproximadamente 7% progredirão para CHC durante 6,5 anos (LEE; LIM; PARK, 2012; TORRES; WILLIAMS; HARRISON, 2012).

A obesidade, resistência insulínica, hipertensão e dislipidemia são fatores de risco fortemente associados a DHGNA, sendo esta agora reconhecida como manifestação hepática da síndrome metabólica (RAFIQ; YOUNOSSI, 2009). Apesar da maioria dos pacientes terem obesidade e diabetes tipo 2, diversos estudos relatam uma prevalência da DHGNA entre 7% e 16% da população com peso normal, mas que apresentam desordens metabólicas como a resistência insulínica (BELLENTANI et al., 2000; BROWNING et al., 2004; EGUCHI et al., 2012; NASCIMBENI et al., 2013; VERNON; BARANOVA; YOUNOSSI, 2011).

O grau de obesidade, o número e a gravidade dos fatores de risco metabólicos estão diretamente relacionados com a ocorrência e gravidade da DHGNA (BELLENTANI et al., 2000; MARCHESINI et al., 2003). Com o aumento da população de obesos e diabéticos, acredita-se que a EH, provavelmente, será a maior causa de cirrose nas próximas décadas.

São causas comuns para acúmulo de gordura hepática e que devem ser excluídas para o diagnóstico de DHGNA o consumo abusivo de álcool, uso de medicamentos (corticosteroides, estrógenos sintéticos, metrotexato, amiodarona, tamoxifen, ácido valpróico, antirretrovirais - HAART), desnutrição grave, nutrição parenteral, doenças metabólicas (lipodistrofias ou disbetalipoproteinemia), cirurgias gastrointestinais, hemocromatose, hepatite autoimune, desordens endócrinas como ovários policísticos, hipopituitarismo e hipotireoidismo, infecção pelo HBV, infecção pelo HCV e doença de Wilson (ADAMS; ANGULO; LINDOR, 2005; ANGULO; LINDOR, 2002; DOWMAN; TOMLINSON; NEWSOME, 2011).

A infecção pelo HCV, particularmente o genótipo 3, constitui fator de risco independente para DHGNA, enquanto o genótipo 1 encontra-se relacionado com fatores de risco da síndrome metabólica. A DHGNA desempenha um papel clínico importante, aumentando o grau de fibrose hepática e diminuindo a resposta ao tratamento antiviral (RAMESH; SANYAL, 2004). Conclui-se que a associação da DHGNA com outras doenças hepáticas crônicas pode acelerar a progressão da lesão hepatocelular, necessitando maior controle da doença.

O diagnóstico da DHGNA baseia-se na evidência de gordura no parênquima hepático pelo exame de imagem, geralmente ultrassonografia (US), em indivíduos sem nenhuma ou mínima ingestão de álcool (< 20g/dia para mulheres e < 30g/dia para homens) e exclusão de outras causas de esteatose e doenças hepáticas (NASCIMBENI et al., 2013).

Já o diagnóstico diferencial entre esteatose e EH baseia-se no exame histopatológico, embora alguns escores envolvendo marcadores séricos, como *Steato Test* (POYNARD et al., 2005), *NASH test* (POYNARD et al., 2006), *FIB4 index* (SUMIDA et al., 2012) ou *PLALA* (KESSOKU et al., 2014), estejam sendo propostos como alternativa à biópsia hepática que é o padrão “ouro”, permitindo avaliar a gravidade da doença, mas apresentando algumas desvantagens. A principal delas é o fato de ser invasiva, com certo grau de morbidade e pequeno risco de mortalidade, bem como custo elevado e limitações de técnica, incluindo a variação intra-observador e a variabilidade amostral, tal como a fibrose que, frequentemente, não se encontra uniformemente distribuída. Portanto a biópsia deve ser restrita àqueles indivíduos com DHGNA com risco aumentado para EH e fibrose avançada (CHALASANI et al., 2012; NASCIMBENI et al., 2013). Histologicamente, na esteatose simples, os hepatócitos (mais de 5%) apresentam citoplasma claro devido ao acúmulo de TGR no seu interior, geralmente macro-vesicular, enquanto na EH as alterações incluem lesão hepatocelular caracterizada por degeneração balônica com infiltrado inflamatório e fibrose. Com a

progressão da EH podem aparecer fibrose portal e periportal seguidos de pontes fibrosas, transformação nodular e cirrose (TORRES; WILLIAMS; HARRISON, 2012).

Não existe nenhuma alteração histológica específica que possa distinguir DHGNA da doença hepática alcoólica, portanto, a história acurada, em conjunto com questionário de avaliação sobre o consumo de álcool são essenciais para diagnóstico diferencial (DOWMAN; TOMLINSON; NEWSOME, 2011).

Apesar da biópsia ser o padrão de referência, a maioria dos pacientes pode efetivamente ser diagnosticado através de exames não invasivos (LEE; PARK, 2014). Os exames de imagem, US, tomografia computadorizada (TC) e RMI têm sido usados com essa finalidade. Apresentam vantagens, principalmente, por serem não invasivos e poderem ser realizados repetidas vezes durante um período de tempo, diferentemente da biópsia hepática. Porém, nenhum deles tem sensibilidade e especificidade suficientes para estadiar a doença e distinguir a esteatose da EH com e sem fibrose.(HERNAEZ et al., 2011)

A US vem sendo reconhecida como a principal ferramenta para rastrear a DHGNA na prática clínica. O exame é seguro, barato, amplamente disponível, e tem boa performance quando a esteatose está presente em pelo menos 20% a 30% dos hepatócitos (HERNAEZ et al., 2011; LEE; PARK, 2014). No entanto apresenta algumas limitações, como diminuição da acurácia na esteatose leve, na obesidade mórbida, além de ser um método operador-dependente (DASARATHY et al., 2009; LEE; PARK, 2014; PALMENTIERI et al., 2006). Na esteatose moderada a intensa (graus $\geq 30\%$ - 33% na histologia) a US tem uma boa acurácia, com sensibilidade que variou de 81,8% a 100% e especificidade tão elevada quanto 98% (LEE et al., 2010; SAADEH et al., 2002), entretanto, quando todos os graus de esteatose ($\geq 3\%$ - 5%) foram considerados houve piora na sensibilidade (53,3% a 66,6%) e especificidade (77% a 93%) (LEE; PARK, 2014; LEE et al., 2010; PALMENTIERI et al., 2006).

A TC não é um exame apropriado para avaliação da população, devido a sua baixa acurácia em detectar esteatose leve, além dos danos potenciais pela radiação. Entretanto, pode ser efetiva em situações clínicas específicas, como na avaliação dos indivíduos candidatos a doação para o transplante hepático (LEE; PARK, 2014).

A RMI e a RMS de baixa resolução são atualmente os métodos mais práticos e acurados, especialmente para segmento longitudinal da doença.

Como a grande maioria dos pacientes é assintomática, muitas vezes seu diagnóstico é evidenciado incidentalmente durante avaliação clínica de rotina, com elevação de aminotransferases, ou achados de exames de imagem abdominal compatíveis (CHEUNG; SANYAL, 2008; VUPPALANCHI; CHALASANI, 2009). A DHGNA permanece subdiagnosticada e alguns pacientes com doença hepática significativa passam despercebidos, podendo ser negligenciados e perdendo a oportunidade de intervenção. O reconhecimento daqueles pacientes em risco é o primeiro passo para o diagnóstico (DYSON; ANSTEE; MCPHERSON, 2014).

Apesar da dependência quase universal da dosagem de transaminases na prática médica, principalmente quando relacionado a doenças hepáticas, elas não são consideradas uma ferramenta útil na triagem da DHGNA. Na verdade, a maioria desses pacientes apresentam transaminases normais, o que não exclui doença histologicamente avançada (BROWNING et al., 2004; FERREIRA et al., 2010; FRACANZANI et al., 2008; MOFRAD et al., 2003). As enzimas hepáticas podem ser normais em até 78% desses pacientes, não sendo sensíveis para o diagnóstico da doença. Os pacientes com EH habitualmente têm pior prognóstico, apesar de poderem estar assintomáticos e apresentar níveis séricos de aminotransferases dentro do limite da normalidade (ADAMS; ANGULO; LINDOR, 2005; ADAMS; ANGULO, 2005). O limite do valor superior de normalidade das transaminases atualmente utilizado vem gerando discussões, pois tendem a subestimar a prevalência das doenças hepáticas (NASCIMBENI et

al., 2013; PRATI, 2002; SCHWIMMER et al., 2010). É importante lembrar que os atuais limites foram originalmente estabelecidos há cerca de 25 anos e é provável que certos indivíduos devam ter sido considerados saudáveis, quando na realidade eles foram subdiagnosticados para DHGNA (PRATI, 2002).

Se algum teste de função hepática estiver alterado, o mais provável é que seja a ALT ou a gama-glutamil transpeptidase (GGT). A relação de AST/ALT é geralmente <1 , mas esta relação aumenta quando os níveis de fibrose progridem (DYSON; ANSTEE; MCPHERSON, 2014; SUMIDA; EGUCHI; ONO, 2010). Elevação dos níveis séricos de TGR e diminuição da lipoproteína de alta densidade (HDL) são bastante comuns nesses pacientes (EGUCHI et al., 2012).

2.4 METABONÔMICA/METABOLÔMICA NAS DOENÇAS HEPÁTICAS

A produção acadêmica empregando as estratégias metabonômica ou metabolômica está aumentando a cada dia, em função de seu enorme potencial na investigação do estado fisiológico, diagnóstico de doenças, descoberta de novos biomarcadores, identificação das vias metabólicas alteradas devido a doenças ou tratamentos (BHARTI; ROY, 2012; ZHANG et al., 2012b, 2010b). Dados coletados na plataforma PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>), referente ao período de janeiro de 2010 a dezembro de 2014, usando os termos de busca “*metabonomic*” OR “*metabonomics*” OR “*metabolomic*” OR “*metabolomics*”, resultou em 10060 artigos. Quando a busca foi realizada considerando apenas os casos de doença hepática, foram apresentados 467 artigos (argumento de busca: “*metabonomic*” OR “*metabonomics*” OR “*metabolomic*” OR “*metabolomics*” AND “*liver disease*”). E quando restringimos a pesquisa ao uso de espectroscopia de RNM, foram apresentados 80 artigos (argumento de busca: “*metabonomic*” OR “*metabonomics*” OR “*metabolomic*” OR “*metabolomics*” AND “*liver disease*” AND “*NMR*”). Desses, foram

selecionados apenas os 13 artigos que aplicavam a espectroscopia de RNM em amostras de sangue ou urina para avaliação das doenças hepáticas (Figura 4).

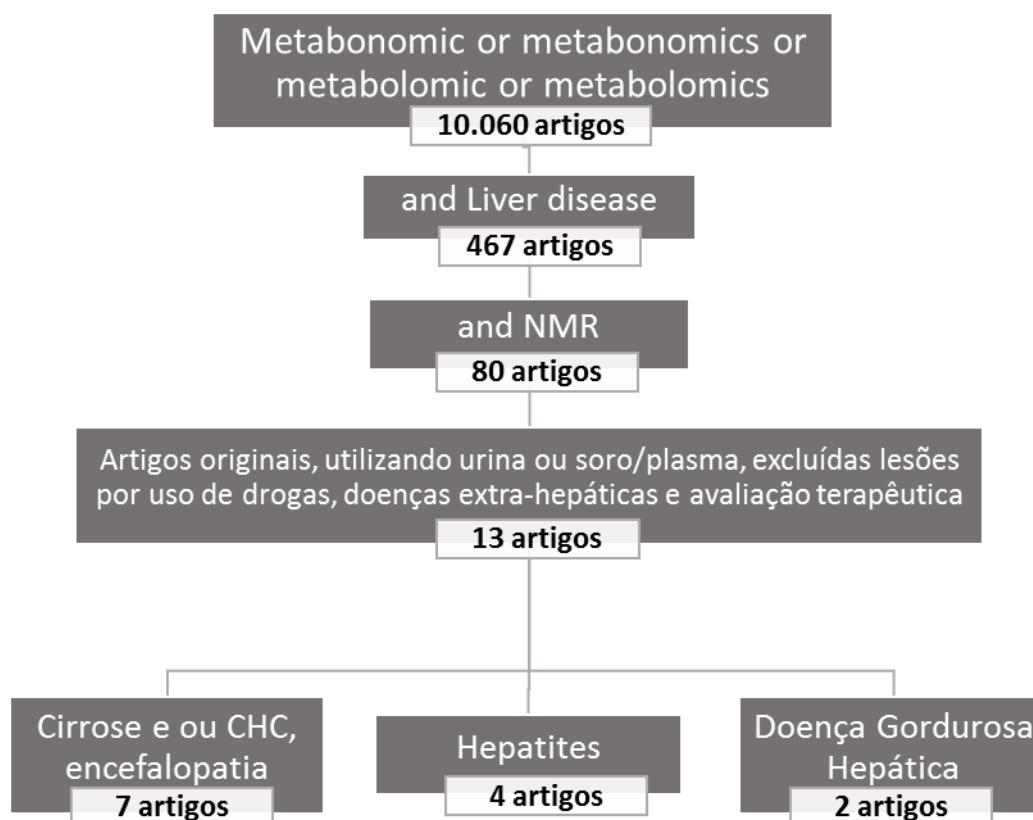


Figura 4. Algoritmo para seleção dos estudos da revisão.

São muitas as doenças hepáticas crônicas e muitas vezes o seu reconhecimento é realizado tardiamente, quando o paciente já se encontra com cirrose descompensada.

Nos estágios iniciais da cirrose, o fígado é capaz de compensar as alterações resultantes do desarranjo estrutural, das pontes de fibrose, e a maioria dos pacientes não apresenta sintomas. Contudo, nos estágios mais avançados, com disfunção hepática grave, não mais consegue manter o metabolismo adequado, e ocorrem complicações com descompensação da cirrose. A reserva hepática na descompensação não é capaz de compensar a perda de hepatócitos e as distorções estruturais, fazendo com que frequentemente grande parte dos pacientes percam a oportunidade de tratamento e recuperação.

Nos pacientes cirróticos, incluindo aqueles pacientes na lista de espera para transplante hepático, a avaliação do grau de insuficiência hepática é necessária para tomada de decisões, monitoração da doença, planejamento terapêutico e avaliação prognóstica da doença. Os principais escores utilizados para essa avaliação são o Child-Turcotte-Pugh (CTP) e mais recentemente o *Model of End-Stage Liver Disease* (MELD). Este tem vantagem sobre o CTP por ser baseado em variáveis objetivas, como os níveis séricos de bilirrubina, razão normalizada internacional (INR) e creatinina. Já o CTP baseia-se em dados subjetivos ou seja, graus de encefalopatia e ascite, anormalidades clínicas que não apresentam aferições aceitas internacionalmente. Amanthieu et al., em 2011, estudando pacientes com diferentes graus de insuficiência hepática avaliados pelo MELD, encontraram modificações no conteúdo de metabólitos séricos, no perfil metabolômico, correspondentes ao grau de comprometimento da função hepática. As principais vias metabólicas envolvidas nessa diferenciação foram as das lipoproteínas, glicose e aminoácidos. (AMATHIEU et al., 2011). Já Qi et al., em 2012, além de demonstrar classificação do grupo de pacientes cirróticos e voluntários saudáveis, conseguiram distinguir o grupo de pacientes com cirrose descompensada do grupo com cirrose compensada, com acurácia de 85% na validação do teste para diagnóstico, encontrando 12 metabólitos que influenciaram essa separação, sendo o piruvato, fenilalanina e succinato, os de maior influência (QI et al., 2012a).

A avaliação histológica das amostras de biópsia hepática é considerada o exame de referência porque permite determinação do grau de atividade da inflamação e da fibrose hepática. Entretanto, apresenta entre outras desvantagens o fato de ser invasiva, acarretando um pequeno mas significativo risco de complicações, induzindo à busca por biomarcadores não invasivos para esta avaliação (STAUBER; LACKNER, 2007). Sands, Guha e Kyriakides, analisando, por meio da estratégia metabonômica, o plasma de pacientes com infecção crônica pelo HCV, identificaram biomarcadores discriminantes associados com grau de

fibrose hepática, estadiados pelo teste “enhanced liver fibrosis” (ELF) e pelo escore METAVIR. Observaram que o grau de fibrose mais avançado estava relacionado com níveis elevados de tirosina, fenilalanina, metionina, citrato e VLDL e com baixos níveis de creatina, LDL, fosfatidilcolina e N-acetil α 1-ácido-glicoproteína. Apesar da área sob a curva “receiver operating characteristic” (ROC) revelar elevada acurácia para classificação dos modelos, quando realizada a validação cruzada menos de 40% dos biomarcadores identificados foram validados naqueles baseados no escore METAVIR. Entretanto, nos modelos baseados no teste ELF, acima de 80% dos biomarcadores foram validados. Sugeriram que o teste ELF fornece uma avaliação mais robusta das alterações metabólicas associadas à fibrose hepática do que a modelagem com o escore METAVIR (SANDS et al., 2015).

O carcinoma hepatocelular (CHC) é a neoplasia maligna intra-abdominal mais frequente no mundo, sendo a segunda causa de morte relacionada a câncer, com uma taxa de sobrevida em cinco anos menor que 7% (WHO, [s.d.]). No momento de seu diagnóstico, grande parte dos pacientes encontra-se em fase avançada da doença, quando os tratamentos disponíveis são limitados e pouco eficazes. Portanto, a identificação precoce do CHC na população de risco, como os pacientes cirróticos, torna-se fundamental para o tratamento precoce e cura.

A alfa-feto proteína, utilizada na prática clínica para o diagnóstico precoce do tumor, apresenta baixa sensibilidade e especificidade, menores de 70% (FURUI; FURUKAWA; KANEMATSU, 1995). Contudo, Liu et al. analisando amostras de soro de pacientes com CHC, cirrose hepática (CH) e indivíduos saudáveis, usando a RNM de ^1H e a cromatografia líquida associada à espectrometria de massa (LC/MS) em conjunto com a análise multivariada de Random Forest, identificaram 32 potenciais biomarcadores e a possibilidade de usá-los para o diagnóstico de CHC, obtendo 100% de sensibilidade, mesmo em pacientes com alfa-fetoproteína < 20 ng/mL. As alterações metabólicas encontradas, induzidas pelo CHC, mostraram desequilíbrio na síntese de corpos cetônicos, ciclo do citrato, metabolismo de

fosfolipídeos, esfingolipídeos, oxidação dos ácidos graxos, catabolismo de aminoácidos e metabolismo dos ácidos biliares (LIU et al., 2014).

Adicionalmente, Nahon et al. analisaram o soro de pacientes cirróticos por álcool, com e sem CHC, através da espectroscopia de RNM de ^1H e subdividiram o grupo de pacientes com CHC de acordo com os critérios de Milão. O modelo metabonômico construído discriminou os pacientes do grupo “CHC grande” (fora dos critérios de Milão) do grupo de cirróticos sem CHC. Em relação aos pacientes com CHC “pequeno”, o modelo mostrou uma distribuição heterogênea, entre as amostras de CHC grande e cirrose (NAHON et al., 2012). Shariff et al., utilizando amostras de urina, identificaram biomarcadores capazes de distinguir o grupo com CHC do grupo controle saudável e do grupo com cirrose, com sensibilidade/especificidade de 100%/93% e 89,5%/88,9%, respectivamente. Os metabólitos que mais fortemente contribuíram para essa diferenciação foram a creatinina, carnitina, creatina e acetona (SHARIFF et al., 2010).

Os pacientes com cirrose também podem apresentar outras complicações, como encefalopatia hepática, distúrbio neuro-psiquiátrico abrangendo alterações na função intelectual, no nível de consciência, na função motora e de coordenação, sendo de difícil diagnóstico, principalmente no estágio inicial de seu aparecimento, com encefalopatia hepática mínima (EHM). Estudo realizado em amostras de soro de pacientes cirróticos, utilizando RNM de ^1H e subsequente análise multivariada, gerou modelo metabonômico capaz de diferenciar pacientes cirróticos com EHM do grupo de cirróticos sem EHM, com sensibilidade de 87%, especificidade de 95% e acurácia igual a 92%, sugerindo haver diferenças subjacentes nos perfis metabólicos de soro desses pacientes. Também permitiu discriminar o grupo de pacientes cirróticos dos indivíduos saudáveis com sensibilidade e acurácia de 98% e especificidade de 97%. Os autores concluíram que a metabonômica baseada na RNM de ^1H é uma ferramenta promissora

para o diagnóstico da EHM, bem como para a elucidação das vias bioquímicas envolvidas na progressão da doença (JIMÉNEZ et al., 2010).

O diagnóstico da hepatite autoimune (HAI) é frequentemente confundido com outras doenças hepáticas, tais como cirrose biliar primária (CBP), hepatites virais crônicas agudizadas, lesão hepática induzida por drogas, na medida em que suas características podem também ser encontradas nestas entidades (MANNS et al., 2010; ZACHOU et al., 2013). O diagnóstico da HAI requer informação integrada entre ambos, clínica e laboratório, além da exclusão de outras doenças hepáticas, nem sempre de fácil realização, pois, além de apresentarem sintomas semelhantes, a sobreposição sorológica pode confundir o diagnóstico, necessitando da biópsia hepática, que em muitas ocasiões não pode ser realizada. Recentemente, com o objetivo de caracterizar o perfil metabólico da HAI e os potenciais biomarcadores para seu diagnóstico, Wang et al., empregando a espectroscopia de RNM de ^1H , compararam o perfil metabolômico do plasma de pacientes com HAI, CBP, lesão hepática induzida por drogas e CBP/HAI (síndrome de sobreposição) com o grupo de indivíduos saudáveis. Evidenciaram que os pacientes com HAI exibiram níveis relativamente elevados no plasma de piruvato, lactato, acetato, acetoacetato e glicose. Como também, identificaram níveis elevados de aminoácidos aromáticos e diminuídos de aminoácidos de cadeia ramificada. Esses biomarcadores foram os principais metabólitos discriminantes capazes de distinguir HAI de outras doenças hepáticas com sensibilidade, especificidade e acurácia acima de 93% (WANG et al., 2014).

A hepatite também pode ser provocada por diferentes vírus apresentando diferentes desfechos. A infecção pelo vírus da hepatite A (HAV) ou pelo vírus da hepatite E (HEV) é quase sempre aguda e autolimitada, enquanto as infecções pelo vírus da hepatite B (HBV) ou pelo vírus da hepatite C (HCV) podem se tornar crônicas em seguida à fase aguda.

De fato, Munshi et al., pretendendo entender a rota metabólica envolvida na fisiopatologia da hepatite E, utilizaram a espectroscopia de RNM de ^1H para quantificar os metabólitos do plasma e da urina desses pacientes e avaliar se as alterações metabonômicas eram únicas da doença. Para isso, compararam os pacientes com infecção pelo HEV (doença) com os de infecção aguda pelo HBV (controle da doença) e voluntários saudáveis. Identificaram mudanças em vários metabólitos sugerindo que os pacientes com hepatite E, e não com hepatite B, estão mais propensos a acidose láctica e cetose (MUNSHI et al., 2011).

Godoy et al. discriminaram, utilizando amostras de urina, pacientes com infecção crônica pelo HCV do grupo controle, com sensibilidade e especificidade de 94% e 97% respectivamente por meio da RNM de ^1H associada a técnicas de análise multivariada (GODOY et al., 2010).

A espectroscopia de RNM de ^1H associada à técnica de reconhecimento padrão, em amostras de soro, criou modelo que diferenciou pacientes com diagnóstico de cirrose pelo HBV dos pacientes com cirrose induzida por álcool, com identificação de cinco metabólitos, creatina, acetoacetato, isobutirato, glutamina e glutamato, como principais fatores que influenciaram a separação entre esses grupos (QI et al., 2012b).

A doença hepática gordurosa alcoólica caracterizada pelo depósito de TGR nos hepatócitos e desencadeada pelo consumo abusivo de álcool, apresenta um estágio inicial, a esteatose simples, reversível se parada a ingestão de bebida alcoólica, de outra forma que pode progredir para EH e provocar cirrose. Fernando et al. estudaram as alterações no metaboloma lipídico do plasma e do fígado de 344 ratos Fisher, machos, com doença hepática gordurosa alcoólica induzida, para entender os mecanismos e padrão lipídico na fase inicial de doença. Após um mês de dieta com álcool, os ratos foram sacrificados e os lipídeos do plasma e fígado extraídos e analisados pela RNM de ^1H e de ^{31}P . Os resultados mostraram que o consumo de álcool alterou o metabolismo de colesterol, TGR e fosfolipídeos que contribuíram para o desenvolvimento da gordura hepática, também indicam que o estresse

oxidativo e a inflamação precedem a doença alcoólica do fígado. Observaram que as semelhanças no perfil lipídico de metabólitos do plasma e fígado analisados pela RNM têm potencial para detectar a fase inicial de esteatose induzida por álcool (FERNANDO et al., 2011).

Li et al., empregando a espectroscopia de RNM de ^1H na análise do soro de camundongos C57BL/6 (controles) e outros alimentados com dieta deficiente em metionina e colina, usada para induzir diferentes estágios de DHGNA, observaram alterações em alguns metabólitos, como glicose, lactato, glutamato/glutamina e taurina, sugeriram que estes poderiam ser utilizados para o diagnóstico não invasivo dos estágios da DHGNA em camundongos (LI et al., 2011).

A tabela 1 apresenta, de forma resumida, a produção acadêmica relacionando metabonômica com doenças hepáticas nos anos de 2010 a 2014. São indicados o biofluido utilizado e os metabólitos (ou via metabólica) que sofreram alterações nos diferentes grupos estudados.

Quadro 1. Sumário dos artigos que aplicaram a metabonômica no estudo de doenças hepáticas, no período compreendido entre janeiro de 2010 e dezembro de 2014.

Referência	Objeto do estudo		Biofluido	Metabólitos ou via metabólica alterada
Shariff et al., 2010	Cirrose: carcinoma hepatocelular (43 amostras)		Urina	Creatinina, carnitina, creatina e acetona
Jiménez et al., 2010	Cirrose: encefalopatia (170 amostras)		Soro	Glicose, lactato, metionina, TMAO, glicerol, colina, aminoácido de cadeia ramificada, alanina, glicina, acetato, NAC
Godoy et al., 2010	Hepatite C (66 amostras)		Urina	Não investigado
Amanthieu et al. 2011	Cirrose (124 amostras)	Menor MELD	Soro	HDL, ácido linoléico, β -hidroxibutirato, alanina, glicoproteína (N-acetil), colina e fosfocolina
		Maior MELD		Leucina, isoleucina, lactato, glutamina, metionina, piruvato, citrato, creatinina, β -glicose
Fernando et al., 2011	Doença hepática gordurosa alcoólica (344 amostras)		Plasma e tecido hepático	Metabolismo de colesterol, TGR e fosfolipídeos
Li et al., 2011	Doença Hepática Gordurosa não Alcoólica (60 amostras)		Soro	Glicose, lactato, glutamato/glutamina e taurina
Munshi et al., 2011	Hepatite E (89 amostras)		Plasma	L-isoleucina, acetona, glicerol e glicina
			Urina	Imidazol, ácido 3-aminoisobutanóico, 1-metilnicotinamida, biopterina, adenosina, 1-metilhistidina, ácido salicílico
Qi S et al., 2012	Hepatite B (61 Amostras)		Soro	Creatina, acetoacetato, isobutirato, glutamina e glutamato.

Qi et al., 2012	Cirrose: compensada <i>versus</i> descompensada (90 amostras)		Soro	Succinato, piruvato, fenilalanina, lisina, histidina, alanina, glutamato, glutamina, creatina, LDL, VLDL e, acetona
Nahon et al., 2012	Cirrose: Carcinoma hepatocelular (tamanho do tumor - critérios de Milão) (154 amostras)	Grande CHC	Soro	Glutamato, acetato e N-acetil glicoproteína
		Cirrose		Lipídeos e glutamina
Liu et al., 2014	Cirrose: Carcinoma hepatocelular (165 amostras)		Soro	Síntese de corpos cetônicos, ciclo do citrato, metabolismo de fosfolipídeos, esfingolipídeos, oxidação dos ácidos graxos, catabolismo de aminoácidos e metabolismo dos ácidos biliares.
Wang et al., 2014	Hepatite autoimune (122 amostras)		Plasma	Piruvato, lactato, acetato, acetoacetato, glicose, aminoácidos aromáticos e aminoácidos de cadeia ramificada
Sands, Guha e Kyriakides, 2015	Cirrose: graus de fibrose (113 amostras)		Plasma	Tirosina, fenilalanina, metionina, citrato e VLDL, creatina, LDL, fosfatidilcolina e N-acetil – glicoproteína.

TMAO – Óxido de trimetilamina; NAC – N- acetil cisteína; HDL – lipoproteína de alta densidade; LDL – lipoproteína de baixa densidade; VLDL – lipoproteína de muito baixa densidade; CHC – carcinoma hepatocelular; MELD – Model of End Liver Disease.

Enfim, é crescente o interesse e o desenvolvimento de métodos baseados na estratégia metabonômica para investigar e diagnosticar precocemente doenças do fígado e suas complicações. Esta ferramenta diagnóstica tem sido utilizada em praticamente todas as doenças hepáticas, como hepatites virais, a doença hepática gordurosa, doenças auto-imunes do fígado e doença hepática alcoólica. Todavia, ainda há muito a ser estudado e explorado nesta seara, implicando em cada vez mais interações entre profissionais de diferentes áreas, como médicos, químicos, bioquímicos e estatísticos. A metabonômica abre grandes perspectivas diagnósticas no futuro próximo.

3. HIPÓTESE

A análise metabonômica das amostras de urina é capaz de identificar pacientes com infecção crônica pelo HBV, pelo HCV e com doença hepática gordurosa não alcoólica.

4. OBJETIVOS

4.1 GERAL

- Identificar os pacientes com infecção crônica pelo HCV, pelo HBV e com DHGNA, a partir de modelo metabonômico obtido pela análise de RNM de ^1H das amostras de urina.

4.2 ESPECÍFICOS

- Obter espectros de RNM de ^1H de amostras de urina de pacientes com infecção crônica pelo HCV, pelo HBV e com DHGNA
- Desenvolver os modelos metabonômicos a partir dos espectros de RNM de ^1H da urina capazes de diferenciar pacientes com infecção crônica pelo HCV, pelo HBV e DHGNA.
- Desenvolver modelo metabonômico a partir dos espectros de RNM de ^1H da urina capaz de diferenciar pacientes com infecção crônica pelos vírus da hepatite B e C dos pacientes controle.

5. PACIENTES E MÉTODOS

5.1 DESENHO DO ESTUDO

É um estudo de avaliação de teste diagnóstico.

A partir da análise das amostras de urina dos pacientes com doença hepática crônica causadas por infecção pelo HBV ou HCV ou com DHGNA foram construídos modelos metabonômicos utilizando a RNM de ^1H associada a análise estatística multivariada visando classificação diagnóstica.

Na literatura são poucos os trabalhos publicados de metabonômica envolvendo essas patologias.

5.2 LOCAL DO ESTUDO

A pesquisa foi realizada na Universidade Federal de Pernambuco em dois locais distintos:

- 1) Hospital das Clínicas (HC), ambulatório de Hepatologia, 4^o andar, às terças-feiras e quintas-feiras à tarde, onde foram selecionados e consultados os indivíduos para a pesquisa e no Laboratório Central, local de coleta das amostras de sangue e urina para análises clínicas.
- 2) Departamento de Química Fundamental (DQF), Laboratório da Central Analítica onde as amostras de urina foram analisadas pela RNM de ^1H para construção dos modelos metabonômicos.

5.3 POPULAÇÃO DO ESTUDO

5.3.1. População alvo

A população estudada foi proveniente do ambulatório de Hepatologia do HC-UFPE por demanda espontânea.

5.3.2 Definição dos grupos do estudo

Os indivíduos selecionados foram distribuídos em quatro grupos especificados abaixo, de acordo com seu diagnóstico:

- **GRUPO I - INFECÇÃO CRÔNICA PELO HBV**

Pacientes com diagnóstico de infecção crônica pelo HBV, com sorologias positivas para HBsAg, anti-HBc e HBV-DNA, e negativas para anti-HBs e anti-HCV.

GRUPO II - INFECÇÃO CRÔNICA PELO HCV

Pacientes com diagnóstico de infecção crônica pelo HCV, com sorologias positivas para anti-HCV e HCV-RNA, e negativas para anti-HBc e anti-HBs.

**GRUPO III –INDIVÍDUOS NATURALMENTE IMUNES PARA HBV –
GRUPO CONTROLE**

Pacientes que apresentaram sorologias positivas para anti-HBc e anti-HBs, e negativa para anti-HCV.

- **GRUPO IV - DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA**

Pacientes com alterações ultrassonográficas características de esteatose hepática e com sorologias negativas para anti-HBc, anti-HBs e anti-HCV.

5.3.3. Critérios de inclusão

Foram incluídos indivíduos de ambos os gêneros, com idade superior a 18 anos, que aceitaram participar do estudo, atendidos no ambulatório de Hepatologia do HC-UFPE e que se enquadrassem em algum dos grupos acima citados.

5.3.4 Critérios de exclusão

Foram excluídos aqueles indivíduos em tratamento para hepatite, com diagnóstico de tireoidite, artrite, glomerulonefrite ou insuficiência renal, infecção pelo HIV, doença autoimune ou neoplásica e aqueles com ingestão de álcool superior a 30g/dia para homens e 20g/dia para mulheres.

5.3.5 Tipo de amostragem

As amostras foram coletadas conforme a demanda do Ambulatório de Hepatologia do HC-UFPE, por conveniência, no período indicado para o estudo.

5.4 VARIÁVEIS

5.4.1 Variáveis Independentes:

As seguintes características foram avaliadas e consideradas neste estudo como variáveis independentes: a) demográficas – idade e sexo; b) antropométricas – índice de massa corpórea (IMC); c) laboratoriais bioquímicas – AST, ALT, fosfatase alcalina (FA), gama-glutamilttransferase (GGT), glicose, colesterol total (CT), HDL, LDL e TGR; d) laboratoriais sorológicas – anti-HCV, HBsAg, anti-HBs, Anti-HBc, anti-HIV; HBV-DNA e HCV-RNA; e) exame de imagem – US para diagnóstico de esteatose.

As variáveis sorológicas e de imagem definem os grupos do estudo (grupo I – HBV, II – HCV, III – controle e IV – DHGNA). Essas são variáveis de classe e justificam o emprego, nesse estudo, da análise de discriminantes na análise de estatística multivariada.

5.4.2 Variáveis Dependentes:

São os diversos deslocamentos químicos obtidos dos espectros de RNM de ^1H .

5.5 OPERACIONALIZAÇÃO DA PESQUISA

5.5.1 Métodos de coleta dos dados

A coleta de dados foi realizada em três etapas descritas a seguir.

5.5.1.1 Atendimento no ambulatório de Hepatologia

Nos dias de atendimento no ambulatório de Hepatologia do HC-UFPE era realizada análise prévia (antes da consulta) dos prontuários dos pacientes agendados, visando selecionar aqueles com diagnóstico de infecção crônica pelo HBV ou HCV ou DHGNA, como também, os encaminhados dos postos de triagem com sorologia positiva para anti-HBc.

Os pacientes selecionados tinham sua consulta médica realizada de acordo com a rotina ambulatorial pelo pesquisador responsável. Durante o atendimento eram convidados a participar da pesquisa com leitura e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice A). Aqueles que concordaram em participar foram submetidos à entrevista e responderam a um questionário elaborado especificamente para o estudo (Apêndice B).

Ao término da consulta, era agendada a data para coleta de exames de sangue e urina, bem como fornecidas orientações para coleta da amostra de urina (1ª. micção da manhã, após asseio íntimo e desprezado o primeiro jato urinário) e também sobre a necessidade de jejum de 12 horas para a coleta de sangue.

5.5.1.2 Análises clínicas

Na data agendada para o exame, era coletada amostra de 10mL de sangue em veia periférica, de acordo com a rotina do Laboratório Central do HC - UFPE e recebida a amostra de urina.

Cada amostra de sangue foi encaminhada ao Setor de Bioquímica para dosagem dos níveis séricos das seguintes enzimas: AST, ALT, FA e GGT, assim como, glicose, CT, HDL, LDL e

TGR por método cinético automatizado (Abbott[®]), e ao Setor de Sorologia para pesquisa do HBsAg, anti-HBs, anti-HBc e anti-HCV através de EIE (Abbott[®]), conforme a rotina do laboratório.

Os resultados desses exames foram recebidos pelo pesquisador responsável quando do retorno do paciente para consulta, analisados e anotados em planilha específica (Apêndice B).

Os resultados dos exames de AST, ALT, FA e GGT foram normalizados, isto é, o resultado encontrado foi dividido pelo valor máximo da normalidade (VMN).

A pesquisa do HCV-RNA dos pacientes com o anti-HCV positivo e a do HBV-DNA em pacientes HBsAg positivo foi realizada por meio da técnica de PCR (Roche[®]) no Laboratório Central da Secretaria de Saúde de Pernambuco (LACEN-PE).

Cada amostra de urina foi dividida em duas alíquotas, uma encaminhada ao Setor de Uroanálise do Laboratório Central do HC-UFPE no qual foram realizadas as análises das amostras de urina (densidade, pH, presença ou ausência de elementos anormais e sedimentoscopia) por meio de fita-reagente (Labstix[®] ou similar); e outra, ao Laboratório da Central Analítica do DQF - UFPE para realização das análises metabonômicas.

Os exames de US do abdomen foram realizados no centro de diagnóstico por imagem do HC (Diagimagem) no aparelho da GE – Healthcare, Logic P6.

5.5.1.3 Análise Metabonômica / Ressonância nuclear magnética de Hidrogênio-1

No Laboratório da Central Analítica as amostras de urina foram submetidas à análise por RNM de ¹H.

O procedimento analítico envolve a adição de solução-tampão para eliminar o efeito do pH urinário, sendo adicionados 200 µL de solução-tampão de fosfatos (fosfato monobásico de sódio + fosfato dibásico de sódio) a 400 µL de urina *in natura*. Após homogeneização, transferida para o tubo de RNM de 5 mm de diâmetro interno e introduzida no espectrômetro

da RNM DE ^1H , VARIAN *Unity Plus* operando na frequência de 300 MHz, é realizada uma sequência de pulsos com pré-saturação para supressão do sinal da água para aquisição do espectro. O tempo para processamento da análise é de aproximadamente 4 minutos.

Obtidos os sinais originados pela ressonância, esses precisam ser processados, o que envolve a transformação de Fourier, calibração da escala, utilizando um padrão de referência interna, e correção da linha de base do espectro.

O componente de padronização de referência interna de δ ideal é aquele que esteja facilmente disponível, de forma altamente purificada, menos dispendioso, estável, quimicamente inerte, não volátil e solúvel na maioria dos fluídos usados na RNM. Também deve ser bem separado e de preferência um simpleto. Um composto que preenche estes requisitos e pode ser utilizado como referência interna em amostras de urina é a creatinina, um simpleto, com δ em 3,06 ppm atribuído ao seu grupo metil (COEN et al., 2008).

Em seguida, os espectros são divididos em regiões (bins) de 0,05 ppm, entre δ 0,0 – 10,0 ppm, resultando em 154 regiões (bins) de deslocamentos químicos, sendo excluído o intervalo entre δ 4,2 – 6,4 ppm, região que contém os sinais atribuídos à água e à uréia. Transformando o gráfico (espectro) em dados numéricos, criamos uma matriz onde as linhas refletem as amostras e as colunas representam as variáveis (COEN et al., 2008).

Com a matriz de dados processada, foram realizados os tratamentos estatísticos multivariados (PCA, PLS-DA e LDA), utilizando o software Statistica 8.0 e a plataforma online MetaboAnalyst, construindo assim, os modelos metabonômicos.

5.5.2 Análise estatística e redução dos dados dos espectros de RNM de ^1H

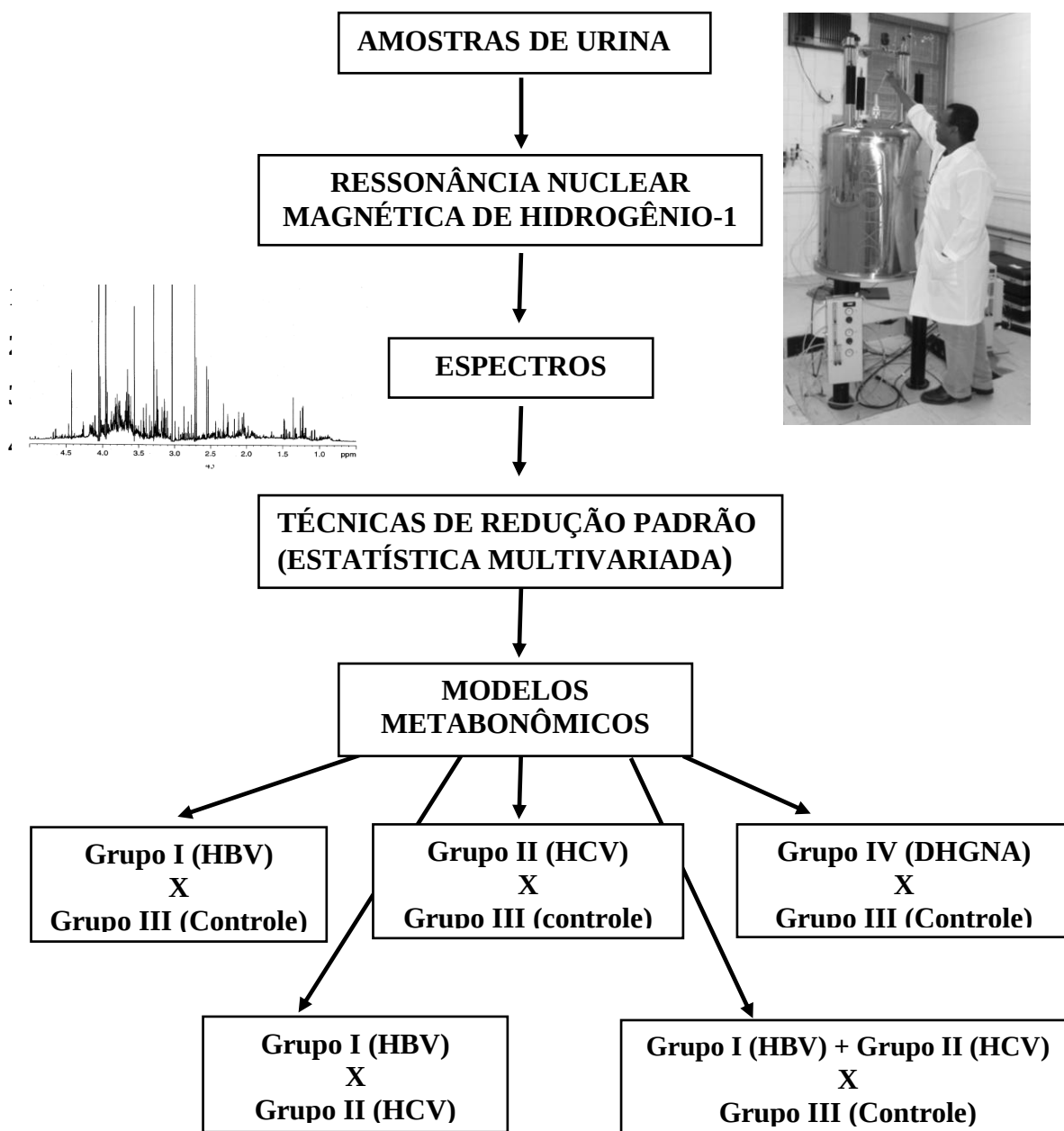
Para a análise de frequência entre os grupos e das variáveis categóricas, foi utilizado o teste exato de Fisher. A comparação das variáveis quantitativas foi realizada através do teste t Student e de Mann-Whitney. O nível de confiança utilizado foi de 95% ($p \leq 0,05$).

Os dados espectrais foram reunidos numa matriz contendo n linhas, sendo n igual ao número de casos, e 155 colunas (variáveis), sendo 154 bins e uma variável de classe (positivo ou negativo para doença). Os dados foram normalizados na linha, usando a expressão $x = \frac{(x_i - \bar{x})}{s}$, onde x_i é a área de integração na variável i (deslocamento químico δ_i), $\bar{x}$ é a média das áreas de integração de cada variável para aquela amostra, e s é o desvio padrão observado. Esta matriz foi utilizada como entrada para a análise de componentes principais (PCA), resultando em $n - 1$ PC's. Nenhum agrupamento natural foi observado. Portanto, foram utilizados métodos supervisionados: Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) e Análise Discriminante Linear (LDA).

A PLS-DA foi aplicada na matriz de dados original após pré-processamento: normalização pela soma e auto-escalamento. Para investigar os metabólitos associados à discriminação entre os grupos classificados pela PLS-DA, foi utilizado o escore de importância das variáveis para projeção (VIP), com ponto de corte >1 .

A seleção de variáveis para a construção do modelo usando LDA teve início separando-se os dados espectrais em função de seu *status* fisiopatológico, Doença ou Controle, sendo obtido um espectro médio de cada grupo. Esses espectros foram subtraídos evidenciando os δ mais importantes para a discriminação entre os grupos. Esses δ foram utilizados como dados de entrada para a LDA, sendo selecionadas 10 variáveis, por Lambda de Wilks, para construir o modelo metabonômico. O modelo foi validado por validação cruzada total. Os tratamentos estatísticos multivariados foram realizados utilizando o software Statistica 8.0 e a plataforma online MetaboAnalyst.

5.5.3 Fluxograma da Pesquisa



6. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este projeto foi aprovado no Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) do Centro de Ciências da Saúde da UFPE (CCS), Registro CEP/CCS/UFPE nº 396/11. Todos os pacientes incluídos no projeto concordaram em participar e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice 1). Foi salientado que a recusa em participar do estudo não implicaria em prejuízo no seu acompanhamento clínico no HC-UFPE, sendo assegurada a confidencialidade quanto aos resultados obtidos ou quaisquer outros dados durante o período de acompanhamento, e que os pacientes não seriam expostos a nenhum fator de risco adicional, haja vista que não se submeteriam a nenhuma condição especial, pois a coleta de sangue para realização de exames laboratoriais fazia parte da rotina do ambulatório de Hepatites do HC–UFPE para avaliação clínica dos mesmos. Assim, pacientes e controles não tiveram sua rotina clínica modificada por conta da pesquisa.

7. RESULTADOS

Após a obtenção dos espectros de RNM de ^1H das amostras de urina de pacientes com infecção crônica pelo HCV, pelo HBV e com DHGNA, realizado o processamento e análise dos dados foram construídos os modelos metabonômicos e então, obtidos os resultados do estudo.

Os resultados abaixo apresentados foram agrupados de acordo com os artigos originados: O ARTIGO 1 intitulado “**Emprego da metabonômica no diagnóstico de doença hepática gordurosa não alcoólica em amostras de urina**” (Apêndice C) e o ARTIGO 2 intitulado “**Emprego da metabonômica no diagnóstico das hepatites virais B e C em amostras de urina**”. Um terceiro artigo, de revisão, intitulado “**Metabonômica aplicada às doenças hepáticas**” (Apêndice D), também foi escrito, tendo como objetivos apresentar os fundamentos da metabonômica e realizar revisão bibliográfica sobre a aplicação da espectroscopia de RNM nas doenças hepáticas. Para isto, foi realizada consulta à plataforma PubMed, no período de janeiro/2010 a dezembro/2014, com os seguintes termos de busca: “*metabonomic or metabonomics, metabolomic or metabolomics, and liver disease*”, sendo encontrados 467 artigos. Quando se restringiu a pesquisa aos trabalhos que utilizaram espectroscopia de RNM como ferramenta analítica, 89 artigos foram identificados. Desses, foram selecionados apenas os 13 que aplicavam a RNM em amostras de sangue ou urina para estudo das doenças hepáticas.

7.1 Resultados ARTIGO 1: Emprego da metabonômica no diagnóstico da doença hepática gordurosa não alcoólica em amostras de urina

Neste estudo 30 indivíduos foram analisados, sendo 20 do grupo DHGNA e 10 do grupo controle.

No grupo DHGNA, 6 (30%) pacientes eram do sexo masculino e 14 do feminino e, no grupo controle, 8 (80%) eram do sexo masculino e 2 do feminino. A idade média no grupo doença foi 55 ± 12 anos e no grupo controle foi 37 ± 10 anos. A média do IMC no grupo DHGNA foi $30,3 \pm 4,2 \text{ Kg m}^{-2}$ e no grupo controle foi $26,5 \pm 3,1 \text{ Kg m}^{-2}$.

A Tabela 1 apresenta as médias dos níveis séricos de AST, ALT, GGT, glicose, TGR, CT, LDL e HDL de indivíduos de ambos os grupos, verificando-se que os valores médios de glicose e TGR foram maiores no grupo doença e o LDL no grupo controle, com $p < 0,05$.

Tabela 1. Média dos níveis séricos de AST, ALT, GGT, glicose, TGR, CT, LDL e HDL dos 30 indivíduos, sendo 20 com diagnóstico de Doença Gordurosa Hepática Não Alcoólica e 10 do grupo Controle, atendidos no Ambulatório de Hepatites do Hospital das Clínicas – UFPE.

Características	Grupos		<i>p</i> -valor
	DHGNA (n=20) Média $\pm$ SD	Controle (n=10) Média $\pm$ SD	
AST/VMN	0.76 ± 0.47	0.63 ± 0.11	0.688
ALT/VMN	0.75 ± 0.68	0.42 ± 0.19	0.109
GGT/VMN	0.81 ± 0.66	0.50 ± 0.22	0.211
GLICOSE	120.15 ± 40.75	72.68 ± 13.14	< 0.001
TGR	231.64 ± 221.64	104.20 ± 48.22	0.008
CT	186.01 ± 51.80	198.09 ± 31.56	0.164
LDL	101.46 ± 32.08	131.22 ± 19.54	0.031
HDL	49.64 ± 21.69	56.33 ± 9.26	0.441

AST – aspartato aminotransferase; ALT – alanina aminotransferase; TGR – triglicerídeo; CT – colesterol total; HDL – lipídeos de alta densidade; LDL – lipídeos de baixa densidade; GGT – gama-glutamil transferase; VMN - Valor Máximo da Normalidade

A figura 5 apresenta o resultado da subtração dos espectros médio dos pacientes do grupo DHGNA e Controle, obtidos após normalização dos espectros de RNM de ^1H . Observa-se que os sinais nos δ em 3.05, e 4.10 ppm, atribuídos à creatinina, são menos intensos no grupo DHGNA que no Controle. Por outro lado, os sinais em δ 1.20, 1.95, 2.60, 2.70, 7.45, 7.60 e 7.85 ppm são mais intensos no grupo Controle.

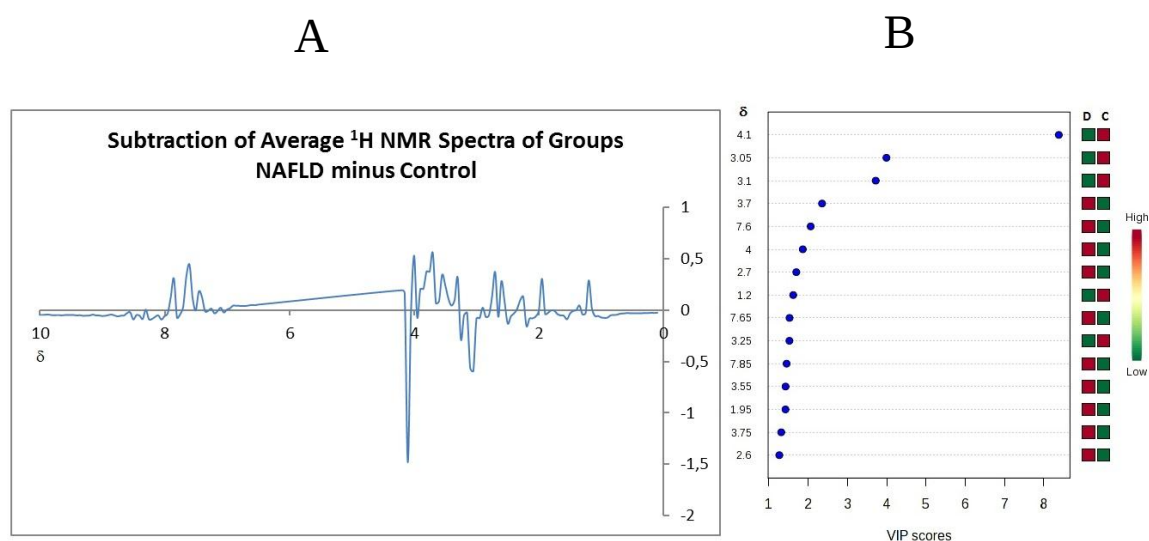


Figura 5. Seleção de variáveis. (A) Resultados da subtração da média dos espectros de RNM de ^1H da urina do grupo doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) e do grupo Controle. Os sinais negativos implicam em altos valores das variáveis no grupo Controle e os sinais positivos indicam altos valores das variáveis no grupo DHGNA. (B) Escores de importância das variáveis para projeção (VIP) obtidas pela PLS-DA.

D – grupo Doença, C – grupo Controle; δ – deslocamento químico em ppm.

Na PLS-DA, a discriminação não foi satisfatória, mas o gráfico VIP indica os δ mais importantes para discriminar os grupos (figura 1). Esses resultados reforçam os observados na subtração dos espectros médios. As três variáveis com os maiores escores VIP, δ 4.10, 3.05 e 3.10 ppm, apresentaram-se menos intensas no grupo DHGNA. Destacam-se também as variáveis em δ 1.20, 1.95, 2.60, 2.70, 7.60, 7.65 e 7.85 ppm, que são mais intensas no grupo DHGNA. Assim como foi feito para a creatinina, esses sinais podem ser atribuídos a metabólitos específicos. A tabela 2 apresenta, de forma resumida, essa atribuição e os níveis

urinários observados em cada grupo. A LDA foi realizada usando essas regiões do espectro de RNM de ^1H , sendo obtido o modelo metabonômico.

Tabela 2. Identificação dos principais metabólitos discriminantes, seus deslocamentos químicos e seus níveis urinários relativos em cada grupo.

Metabólitos	δ (ppm)	DHGNA	Controle
Ácido 3-aminoisobutanóico	1,20	+	–
Acetato	1,95	+	–
Citrato	2,60 e 2,70	+	–
Creatinina	3,05; 3,10 e 4,10	–	+
Hipurato	7,45; 7,60 e 7,85	+	–

+ mais concentrado no grupo; – menos concentrado no grupo; δ deslocamento químico

Entre as 20 amostras de urina do grupo DHGNA, o modelo metabonômico identificou 19 como positivas e uma negativa. Entre os 10 indivíduos do grupo controle, o modelo identificou 9 amostras como negativas e uma positiva. O modelo metabonômico apresentou acurácia de 93,3%, sensibilidade de 95% e especificidade de 90% ($p = 0.0038$), conforme apresentado na tabela 3.

Tabela 3. Resultados do modelo metabonômico LDA para discriminação dos grupos DHGNA e Controle.

		Diagnóstico Ultrassonográfico	
		DHGNA	Controle
Modelo Metabonômico	Positivo	19	1
	Negativo	1	9

Sensibilidade = 95%; Especificidade = 90%; Acurácia = 93,3%; $p = 0.0038$

Na Validação Cruzada, o modelo apresentou acurácia igual a 86,7%, tendo classificado corretamente 95% e 70% das amostras dos grupos DHGNA e Controle, respectivamente.

7.2 Resultados ARTIGO 2: Emprego da metabonômica no diagnóstico das hepatites virais B e C em amostras de urina

Para este estudo foram selecionados 101 indivíduos, dos quais 24 (23,8%) foram excluídos pelas razões abaixo descritas:

Problemas no processamento da análise das amostras de urina → oito (33,3%),

Ingesta excessiva de álcool → cinco (20,8%)

Não apresentaram sorologia adequada ao seu grupo → quatro (16,7%),

Não deram seguimento aos exames solicitados → três (12,5%) e

Outras causas (carcinoma hepatocelular, doença autoimune, gestação, tratamento para hepatite) → quatro (16,7%).

Permaneceram no estudo 77 indivíduos assim distribuídos:

- Grupo HBV → 32 pacientes,
- Grupo HCV → 27 pacientes e
- Grupo controle → 18 indivíduos.

No grupo HBV, 19 (59,4%) pacientes eram do sexo masculino e 13 do feminino, no grupo HCV, 14 (51,8%) eram do sexo masculino e 13 do feminino e no grupo controle, 14 (77,8%) eram do sexo masculino e 4 do feminino. A idade média no grupo HBV foi 45 ± 15 anos, no grupo HCV e no grupo controle foi 37 ± 10 anos (Tabela 1).

Na Tabela 4, também se observam as médias normalizadas dos níveis séricos de AST, ALT e GGT dos pacientes. Essas enzimas foram significativamente mais elevadas nos pacientes do grupo HCV, quando comparados ao grupo controle ou ao grupo HBV. Enquanto nenhuma diferença bioquímica foi observada quando comparados os grupos HBV e controle.

Tabela 4. Características clínicas e bioquímicas de 59 pacientes com infecção crônica pelo HBV e HCV e dos 18 indivíduos do grupo Controle.

Características	Grupos		
	HBV (n=32)	HCV (n=27)	Controle (n=18)
Idade (anos)	45,22 ± 14,73 ^a	57,83 ± 12,40 ^{ab}	38,26 ± 9,02
Sexo (M:F)	19:13	14:13	14:4
AST/VMN	0,79 ± 0,84	1,71 ± 1,86 ^{ab}	0,68 ± 0,22
ALT/VMN	0,71 ± 1,28	1,56 ± 2,18 ^{ab}	0,67 ± 0,48
GGT/VMN	0,64 ± 0,73	1,47 ± 1,01 ^{ab}	0,64 ± 0,37
GLICOSE	81,13 ± 17,08	100,25 ± 29,74 ^b	83,19 ± 20,26
ALBUMINA	4,31 ± 0,33	4,08 ± 0,62	4,48 ± 0,41
BILIRRUBINA	0,75 ± 0,39	1,16 ± 1,35 ^a	0,59 ± 0,22
TGR	109,35 ± 64,04	114,77 ± 32,85	143,74 ± 74,24
CT	226,79 ± 253,93	160,35 ± 35,76 ^{ab}	187,51 ± 36,51
LDL	107,22 ± 38,46	88,76 ± 30,87	110,15 ± 34,01
HDL	50,81 ± 10,33	47,44 ± 12,53	50,48 ± 9,86
PLQ	200161 ± 63798	172000 ± 56674 ^a	226312 ± 42216
INR	1,05 ± 0,08 ^a	1,13 ± 0,20 ^a	0,97 ± 0,10

AST – aspartato aminotransferase; ALT – alanina aminotransferase; GGT – gama-glutamilttransferase; TGR – triglicerídeo; CT – colesterol total; HDL – lipídeos de alta densidade; LDL – lipídeos de baixa densidade; HDL – lipídeos de alta densidade; VMN - Valor Máximo da Normalidade

^a vs controle, *p* valor < 0.05; ^b vs HBV, *p* valor < 0.05.

Os dados apresentados são os números dos pacientes ou média ± SD

Após a análise através da espectroscopia de RNM das amostras de urina do grupo HBV foi construído o modelo metabonômico 1 (grupo HBV X grupo Controle), que identificou corretamente os 32 pacientes infectados, resultando em 100% de acerto do teste (sensibilidade), enquanto dos 18 indivíduos do grupo controle, o modelo identificou corretamente 14 deles, portanto com especificidade igual a 77,8% (tabela 5).

Tabela 5. Resultados do modelo metabonômico baseado na Análise Discriminante Linear (LDA) para discriminação dos grupos HBV e Controle.

		Grupos	
		HBV	Controle
Modelo Metabonômico 1	Positivo	32	4
	Negativo	0	14

Sensibilidade = 100%; Especificidade = 77,8%; VPP= 88,9%;

VPN= 100% Acurácia = 92%

Obtido o segundo modelo metabonômico (grupo HCV X grupo Controle). Entre as 27 amostras de urina do grupo HCV analisadas, o modelo conseguiu classificar corretamente 25 amostras (92,6%), e entre os 18 indivíduos do grupo controle, o modelo identificou corretamente 14 amostras (77,8%). Na Tabela 6, observa-se que a sensibilidade do teste foi 92,6% e a especificidade foi 77,8%, com acurácia de 86,6%.

Tabela 6. Resultados do modelo metabonômico baseado na Análise Discriminante Linear (LDA) para discriminação dos grupos HCV e Controle.

		Grupos	
		HCV	Controle
Modelo Metabonômico 2	Positivo	27	4
	Negativo	2	14

Sensibilidade = 92,6%; Especificidade = 77,8%; VPP = 87,1%; VPN =

87,5% Acurácia = 86,6%

Um terceiro modelo metabonômico (grupo HBV e grupo HCV X grupo Controle) foi criado com o objetivo de discriminar os pacientes infectados (grupo HBV e grupo HCV) dos indivíduos saudáveis (grupo Controle). Dos 59 pacientes infectados, 56 foram corretamente classificados e, dos 18 indivíduos do grupo controle, o modelo identificou 14 amostras corretamente, com sensibilidade igual a 94,9 % e a especificidade igual a 77,8% ($p < 0,05$) (tabela 7).

Tabela 7. Resultados do modelo metabonômico baseado na Análise Discriminante Linear (LDA) para discriminação dos grupos HBV e HCV (doença) e Controle (saudável).

		Grupos	
		HBV e HCV	Controle
Modelo Metabonômico 3	Positivo	56	4
	Negativo	3	14
Sensibilidade = 94,9%; Especificidade = 77,8%; VPP = 93,3%; VPN = 82,3%			
Acurácia = 90,9%			

8. DISCUSSÃO

Os resultados acima descritos serão aqui discutidos.

8.1 ARTIGO 1: Emprego da metabonômica no diagnóstico da doença hepática gordurosa não alcoólica em amostras de urina

Em virtude do aumento da ocorrência da DHGNA na população, observa-se necessidade clínica de avaliação e monitoração das doenças hepáticas por métodos não invasivos, como a US (BANERJEE et al., 2014). O estudo de metanálise realizado por Hernaez et al., com finalidade de revisar sistematicamente e determinar a acurácia diagnóstica da US na diferenciação de pacientes com e sem DHGNA, definida pela presença de esteatose moderada a grave ($\geq 30\%$) na biópsia hepática, evidenciou sensibilidade e especificidade de 84,8% (IC 95%: 79,5 – 88,9) e 93,6% (IC 95%: 87,2 – 97,0), respectivamente, com uma área sob a curva ROC de 0,93 (0,91 – 0,95) (HERNAEZ et al., 2011). Em contraste, quando todos os graus de esteatose ($\geq 3\%$ ou 5%) foram considerados, verificou-se diminuição na sensibilidade e na especificidade (ALMEIDA et al., 2008; LEE et al., 2010; PALMENTIERI et al., 2006; VAN WERVEN et al., 2010).

A tomografia computadorizada (TC), semelhante à US, apresenta acurácia elevada para diagnosticar esteatose moderada a grave, mas a acurácia torna-se baixa na esteatose leve, além do dano potencial da radiação ionizante (LEE; PARK, 2014).

A RMI e a espectroscopia de ressonância magnética (RMS) *in vivo* podem avaliar a esteatose de maneira objetiva usando um índice quantitativo para medição de gordura hepática através da densidade de prótons na fração de gordura (PDFF). Alguns estudos quando compararam os métodos de imagem (RMI/RMS, US e TC) com o exame histológico na avaliação da esteatose, observaram melhor desempenho da RMI/RMS para o diagnóstico da DHGNA (BANERJEE et al., 2014; LEE et al., 2010; SAADEH et al., 2002; VAN WERVEN et al.,

2010). A sensibilidade e especificidade da RMI para detectar $\geq 5\%$ de gordura nos hepatócitos variou de 77% a 90% e 87% a 91%, respectivamente, e o correspondente desempenho da RMS variou de 80% a 91% e de 80% a 87%, respectivamente. Esses métodos apresentam como desvantagens o alto custo e o tempo prolongado de exame, sendo necessária a presença do paciente (NOUREDDIN et al., 2013).

Nos últimos anos, é crescente o número de trabalhos em pesquisa clínica aplicando a estratégia metabonômica (DUARTE; DIAZ; GIL, 2014) na investigação de diferentes doenças, como diabetes (SACHSE et al., 2012; WÜRTZ et al., 2012), hepatites (GODOY et al., 2010; MUNSHI et al., 2011; QI et al., 2012b), neoplasias (LIU et al., 2014; NAHON et al., 2012; SHARIFF et al., 2010), entre outras. No entanto, é reduzido o número de trabalhos que investigam a DHGNA empregando a estratégia metabonômica usando espectroscopia de RNM.

Kalhan et al. identificaram biomarcadores, em amostras de plasma, que tem potencial para discriminar indivíduos saudáveis daqueles com DHGNA com sensibilidade igual a 92% (KALHAN et al., 2011). Esses autores aplicaram a metabolômica, empregando cromatografia em fase líquida e gasosa associadas à espectrometria de massa. Em adição, Li et al. utilizaram a espectroscopia de RNM de ^1H para análise do soro de camundongos C57BL/6 saudáveis (controle) e de outros alimentados com dieta deficiente em metionina e colina, usada para induzir DHGNA. Observaram alterações em alguns metabólitos, como glicose, lactato, glutamato/glutamina e taurina, e sugeriram que estes poderiam ser utilizados para o diagnóstico não invasivo dos estágios da DHGNA em camundongos (LI et al., 2011).

O estudo aqui apresentado é o primeiro a empregar a estratégia metabonômica para diferenciar pacientes com DHGNA daqueles indivíduos saudáveis, através da análise das amostras de urina por espectroscopia de RNM de ^1H .

O grupo com DHGNA apresentou níveis séricos mais elevados de glicose e triglicerídeos quando comparado ao grupo Controle (Tabela 1), o que seria justificado pela forte associação de DHGNA com distúrbios metabólicos. Não foram evidenciadas diferenças em relação aos níveis séricos das aminotransferases. Há relatos na literatura indicando que estas enzimas podem ser normais em até 78% dos pacientes com DHGNA (ADAMS; ANGULO; LINDOR, 2005; BROWNING et al., 2004). Portanto, a dosagem das aminotransferases não é útil na prática clínica para o diagnóstico da DHGNA e o fato de estarem normais não exclui doença histologicamente avançada (FRACANZANI et al., 2008; MOFRAD et al., 2003). Este dado reflete a necessidade de novos exames para diagnóstico de DHGNA.

Em nosso estudo, a discriminação dos dois grupos utilizando a PLS-DA não foi satisfatória, mas foram identificados, por meio do escore VIP, os deslocamentos mais importantes para a discriminação dos grupos. As duas variáveis mais importantes para a classificação são os bins centrados em δ 3.05 e 4.10 ppm, os quais são atribuídos aos sinais da creatinina. Como as áreas de integração sob esses sinais são menores nas amostras do grupo DHGNA, a creatinina apresenta-se com menor concentração na urina dos pacientes com DHGNA. Encontram-se relatos na literatura que descrevem alterações nos níveis séricos de creatinina na presença de doenças hepáticas. Soga et al identificaram alterações nos níveis séricos de creatinina quando investigaram pacientes com infecção pelo HBV, lesão hepática induzida por drogas, infecção pelo HCV com alanino transferase persistentemente normal, cirrose e hepatocarcinoma, esteato-hepatite não alcoólica e esteatose simples (SOGA et al., 2011). Chen et al. observaram redução nos níveis séricos de creatinina de pacientes com HCC (CHEN et al., 2011), enquanto Cocchetto et al. relataram redução na produção de creatinina em pacientes com doença hepática (COCCHETTO; TSCHANZ; BJORNSSON, 1983).

Os sinais em δ 4.00, 7.45, 7.60 e 7.85 ppm, atribuídos ao hipurato, apresentam áreas de integração mais elevadas nas amostras de urina do grupo DHGNA. Diferentemente de nosso

estudo, Calvani et al. identificaram que o hipurato é o metabólito que melhor discrimina obesos mórbidos e resistentes à insulina de controles magros, sendo que os níveis de hipurato foram inferiores nos obesos. Quando eles foram submetidos à cirurgia bariátrica, houve elevação nos níveis desse metabólito na urina (CALVANI et al., 2010). Contudo, van Doorn et al relataram que o teor de hipurato na urina está relacionado ao metabolismo alterado da glicose, observado em pacientes com diabetes mellitus tipo II (VAN DOORN et al., 2007), tendo sido observado níveis urinários maiores em portadores de diabetes. Com efeito, no trabalho aqui apresentado, níveis urinários elevados de hipurato foram observados entre os pacientes com DHGNA.

O sinal em δ 1.95 ppm é atribuído ao acetato, que também se apresenta mais intenso no grupo com DHGNA. Há relato na literatura de aumento no nível de acetato na urina de pacientes com diabetes mellitus do tipo II (MESSANA et al., 1998). De fato, em nosso estudo, os níveis maiores de hipurato e acetato encontrados na urina dos 20 pacientes do grupo com DHGNA podem ser atribuídos aos maiores níveis séricos de glicose observados neste grupo em relação aos controles (Tabela 1).

Os níveis urinários elevados observados para o citrato (δ 2.60 e 2.70 ppm) no grupo DHGNA podem ser explicados considerando que o grupo DHGNA difere do grupo Controle nos níveis séricos de triglicerídeos (Tabela 1), haja visto que no metabolismo dos triglicerídeos há formação de glicerol, metabolizado a piruvato e este, no ciclo de Krebs, é convertido a citrato (KIM et al., 2009).

Männistö Ville T et al. utilizando a espectroscopia de RNM de ^1H no estudo das moléculas de baixo peso molecular do soro de pacientes obesos mórbidos observaram um baixo nível de citrato nos pacientes com esteato-hepatite quando comparados aos indivíduos com fígado sem alterações histológicas ou com esteatose simples. Eles não encontraram nenhuma diferença

nos níveis séricos de acetato e creatinina entre os grupos estudados (MÄNNISTÖ et al., 2015).

O sinal em δ 1.20 ppm é atribuído ao grupo metil do ácido 3-aminoisobutanóico, que se apresenta na urina em concentração mais elevada no grupo com DHGNA do que o grupo controle. Munshi et al. relataram redução nos níveis séricos de ácido 3-aminoisobutanóico em pacientes com hepatite E (MUNSHI et al., 2011).

8.2 ARTIGO 2: Emprego da metabonômica no diagnóstico das hepatites virais B e C em amostras de urina

O desequilíbrio na homeostase, decorrente das agressões ao fígado causadas pelas hepatites virais, ocasionam alterações no perfil de metabólitos endógenos e consequentemente mudanças nos espectros de RNM fornecendo uma “impressão digital” característica do agente agressor e do local agredido (LINDON; HOLMES; NICHOLSON, 2003; YU et al., 2007; ZHANG et al., 2012c).

Grande parte dos exames bioquímicos hoje disponíveis estão apoiados em tecnologia antiquada, sendo pouco sensíveis e pouco específicos para algumas doenças, sendo região-específica e somente alterando após lesão tecidual substancial (ZHANG et al., 2013b).

Há estudos na literatura, baseados na estratégia metabonômica, utilizando métodos de cromatografia associada a espectrometria de massa, que demonstram capacidade para diferenciar e classificar, de acordo com a gravidade da doença, os pacientes com hepatite B, em amostras de soro/plasma (YU et al., 2007; ZHANG et al., 2010a) e urina (WANG et al., 2012; ZHANG et al., 2013a). Outro estudo, utilizando como ferramenta analítica a espectroscopia de RNM de ^1H , analisou o soro de pacientes cirróticos devido a infecção pelo HBV ou a agressão hepática pelo álcool. Os autores conseguiram discriminar os dois grupos e identificaram os cinco principais metabólitos, creatina, acetoacetato, isobutirato, glutamina e

glutamato, responsáveis por esta diferenciação. Também detectaram os metabólitos que discriminaram o grupo controle saudáveis do grupo de pacientes cirróticos infectados pelo HBV (QI et al., 2012b). Observou-se que o grupo doença desses trabalhos tinham características comuns, eram formados por pacientes com infecção crônica pelo HBV com alterações significativas de enzimas hepáticas ou escores MELD de gravidade elevados, demonstrando terem doença hepática avançada (cirrose).

No presente estudo, os pacientes do grupo HBV não apresentavam diferenças nos níveis séricos das enzimas hepáticas, ALT, AST, GTT em relação ao grupo controle. Mesmo assim, o modelo metabonômico construído discriminou os grupos, indicando que este método diagnóstico é capaz de detectar mudanças metabólicas independente dos níveis séricos dessas enzimas. Vale também destacar que tanto o grupo HBV, como o Controle, ambos apresentavam o anticorpo contra o antígeno core (anti-HBc) o que significa que o modelo não discrimina os grupos pelas imunoglobulinas ou seus fragmentos.

Um terceiro modelo metabonômico foi construído para diferenciar os pacientes com infecção hepática crônica pelos vírus HBV e HCV dos indivíduos controle e verificou-se uma boa performance do teste, com acurácia de 90,9%.

9.0. CONCLUSÕES

9.1 ARTIGO 1 - Emprego da metabonômica no diagnóstico da doença hepática gordurosa não alcoólica em amostras de urina

- Primeiro estudo a empregar a estratégia metabonômica para diferenciar pacientes com DHGNA de indivíduos saudáveis, utilizando amostras de urina
- A análise das amostras de urina através da espectroscopia de RNM na DHGNA apresentou sensibilidade e especificidade nos mesmos patamares dos exames de imagem, US, TC, RMI e RMS *in vivo*, oferecendo algumas vantagens, por exemplo, não necessita de médico para operacionalização ou da presença do paciente durante a realização da análise; não há variabilidade de interpretação inter ou intra-operador; tem rápida realização, além de fazer a análise das alterações hepáticas como um todo e não apenas de parte do fígado como na biópsia hepática ou mesmo na RMS *in vivo*.
- A estratégia metabonômica utilizada para diagnóstico de DHGNA apresentou elevada acurácia e possibilitou identificar um conjunto de metabólitos discriminantes, demonstrando potencial para ser aplicada na prática clínica.
- Saliente-se que na validação cruzada, usada para checar o modelo empregado, o teste continuou apresentando bom desempenho.

9.2 ARTIGO 2 - Emprego da metabonômica no diagnóstico das hepatites virais B e C em amostras de urina

- A estratégia metabonômica tem sensibilidade e especificidade suficientes para diferenciar indivíduos saudáveis de pacientes com infecção hepática viral.
- Os pacientes do grupo HBV não apresentavam diferenças nos níveis séricos das aminotransferases em relação ao grupo controle e ambos os grupos apresentavam o anticorpo contra anti-HBc, demonstrando que o modelo metabonômico não está

discriminando os grupos pelas alterações de aminotransferases, imunoglobulinas ou seus fragmentos.

- A metabonômica apresenta potencial para ser desenvolvido como ferramenta de diagnóstico clinicamente útil, podendo também contribuir para uma melhor compreensão dos mecanismos de doença.
- Esses resultados não somente indicam que análise da urina baseada na estratégia metabonômica tem sensibilidade e especificidade suficientes para diferenciar indivíduos saudáveis de pacientes com infecção hepática viral, mas também apresenta potencial para ser desenvolvido como ferramenta de diagnóstico clinicamente útil, podendo também contribuir para uma melhor compreensão dos mecanismos de doença.

9.3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Grande parte dos pacientes com doenças crônicas do fígado são diagnosticados em fase avançada de doença, quando começam a surgir complicações decorrentes da cirrose e as possibilidades de terapia adequada são limitadas, o que propicia elevada morbimortalidade.

Os profissionais de saúde precisam estar atentos na identificação dos pacientes com fatores de risco para essas doenças e realização dos exames necessários para diagnosticá-las o mais precocemente possível. Novos exames, mais rápidos, menos invasivos e que tenham boa performance vêm sendo avaliados. A estratégia metabonômica por dispor dessas qualidades vem ganhando espaço na área acadêmica e mostrando que tem potencial para ser desenvolvida como ferramenta de diagnóstico na prática clínica.

Neste estudo foi possível demonstrar que a análise de amostras de urina utilizando a espectroscopia de RNM associada a técnicas de estatística multivariada permitiu diferenciar os pacientes com hepatite pelo vírus B, hepatite pelo vírus C e doença hepática gordurosa não alcoólica do grupo controle, saudáveis, com elevada acurácia. Vale destacar que com uma

única amostra de urina é possível rastrear um paciente para essas três doenças hepáticas simultaneamente, de forma rápida e não invasiva. Em futuro próximo, possivelmente, a estratégia metabonômica poderá ser utilizada para identificar pacientes em exames de triagem admissional ou em bancos de sangue.

REFERÊNCIAS:

ADAMS, L. A; ANGULO, P. Recent concepts in non-alcoholic fatty liver disease. **Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association**, v. 22, n. 9, p. 1129–33, set. 2005.

ADAMS, L. A; ANGULO, P.; LINDOR, K. D. Nonalcoholic fatty liver disease. **CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne**, v. 172, n. 7, p. 899–905, 29 mar. 2005.

ALMEIDA, A. D. M. et al. Fatty liver disease in severe obese patients : Diagnostic value of abdominal ultrasound. **World J Gastroenterol**, v. 14, n. 9, p. 1415–1418, 2008.

AMATHIEU, R. et al. Metabolomic approach by 1H NMR spectroscopy of serum for the assessment of chronic liver failure in patients with cirrhosis. **Journal of proteome research**, v. 10, n. 7, p. 3239–45, 1 jul. 2011.

ANGULO, P.; LINDOR, K. D. Non-alcoholic fatty liver disease. **Journal of gastroenterology and hepatology**, v. 17 Suppl, p. S186–90, fev. 2002.

ANSALDI, F. et al. Hepatitis C virus in the new era: Perspectives in epidemiology, prevention, diagnostics and predictors of response to therapy. **World journal of gastroenterology : WJG**, v. 20, n. 29, p. 9633–9652, 7 ago. 2014.

BANERJEE, R. et al. Multiparametric magnetic resonance for the non-invasive diagnosis of liver disease. **Journal of hepatology**, v. 60, n. 1, p. 69–77, jan. 2014.

BELLENTANI, S. et al. Prevalence of and risk factors for hepatic steatosis in Northern Italy. **Annals of internal medicine**, v. 132, n. 2, p. 112–7, 18 jan. 2000.

BHARTI, S. K.; ROY, R. Quantitative 1H NMR spectroscopy. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 35, p. 5–26, maio 2012.

BLACHIER, M. et al. The burden of liver disease in Europe: a review of available epidemiological data. **Journal of hepatology**, v. 58, n. 3, p. 593–608, mar. 2013.

BROWNING, J. D. et al. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 40, n. 6, p. 1387–95, dez. 2004.

CAETANO, M. M.; BECK, S. T. Importância da detecção de anticorpos anti-HBc na prevenção da transmissão do vírus da hepatite B (VHB) em bancos de sangue * post-transfusional hepatitis B virus (HBV). **RBAC**, v. 38, n. 4, p. 235–237, 2006.

CALVANI, R. et al. Gut microbiome-derived metabolites characterize a peculiar obese urinary metabotype. **International journal of obesity (2005)**, v. 34, n. 6, p. 1095–8, jun. 2010.

CDC. Testing for HCV infection: an update of guidance for clinicians and laboratorians. **MMWR. Morbidity and mortality weekly report**, v. 62, n. 18, p. 362–5, 2013.

CHALASANI, N. et al. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 55, n. 6, p. 2005–23, jun. 2012.

CHEN, T. et al. Serum and urine metabolite profiling reveals potential biomarkers of human hepatocellular carcinoma. **Molecular & cellular proteomics : MCP**, v. 10, n. 7, p. M110.004945, jul. 2011.

CHEUNG, O.; SANYAL, A. J. Hepatitis C infection and nonalcoholic fatty liver disease. **Clinics in liver disease**, v. 12, n. 3, p. 573–85, viii–ix, ago. 2008.

CHU, C.-M.; LIAW, Y.-F. Hepatitis B virus-related cirrhosis: natural history and treatment. **Seminars in liver disease**, v. 26, n. 2, p. 142–52, maio 2006.

COCCHETTO, D. M.; TSCHANZ, C.; BJORNSSON, T. D. Decreased rate of creatinine production in patients with hepatic disease: implications for estimation of creatinine clearance. **Therapeutic drug monitoring**, v. 5, n. 2, p. 161–8, jun. 1983.

COEN, M. et al. NMR-based metabolic profiling and metabonomic approaches to problems in molecular toxicology. **Chemical research in toxicology**, v. 21, n. 1, p. 9–27, jan. 2008.

DASARATHY, S. et al. Validity of real time ultrasound in the diagnosis of hepatic steatosis: A prospective study. **Journal of Hepatology**, v. 51, n. 6, p. 1061–1067, 2009.

DOWMAN, J. K.; TOMLINSON, J. W.; NEWSOME, P. N. Systematic review: the diagnosis and staging of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis. **Alimentary pharmacology & therapeutics**, v. 33, n. 5, p. 525–40, mar. 2011.

DUARTE, I. F.; DIAZ, S. O.; GIL, A. M. NMR metabolomics of human blood and urine in disease research. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 93, p. 17–26, maio 2014.

DUNN, W. B.; ELLIS, D. I. Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, n. 4, p. 285–294, abr. 2005a.

DUNN, W. B.; ELLIS, D. I. Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, n. 4, p. 285–294, abr. 2005b.

DYSON, J. K.; ANSTEE, Q. M.; MCPHERSON, S. Non-alcoholic fatty liver disease: a practical approach to diagnosis and staging. **Frontline gastroenterology**, v. 5, n. 3, p. 211–218, jul. 2014.

EGUCHI, Y. et al. Prevalence and associated metabolic factors of nonalcoholic fatty liver disease in the general population from 2009 to 2010 in Japan: a multicenter large retrospective study. **Journal of gastroenterology**, v. 47, n. 5, p. 586–95, maio 2012.

EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF THE LIVER. Revised Clinical Practice Guidelines on the Management of Chronic Hepatitis B. **Journal of hepatology**, v. 57, n. 8, p. 167–185, 2012a.

EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF THE LIVER. EASL clinical practice guidelines: Management of chronic hepatitis B virus infection. **Journal of hepatology**, v. 57, n. 1, p. 167–85, jul. 2012b.

EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF THE LIVER. EASL Clinical Practice Guidelines: management of hepatitis C virus infection. **Journal of hepatology**, v. 60, n. 2, p. 392–420, fev. 2014.

FATTOVICH, G.; BORTOLOTTI, F.; DONATO, F. Natural history of chronic hepatitis B: special emphasis on disease progression and prognostic factors. **Journal of hepatology**, v. 48, n. 2, p. 335–52, 2 fev. 2008.

FERNANDO, H. et al. ¹H and ³¹P NMR Lipidome of Ethanol-Induced Fatty Liver. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 34, n. 11, p. 1937–1947, 2011.

FERNIE, A. R.; TRETHERWEY, R. N.; KROTZKY, A. J. Metabolite profiling: from diagnostics to systems biology. **Nature reviews/ Molecular Cell Biology**, v. 5, n. September, p. 1–7, 2004.

FERREIRA, V. S. G. et al. Frequency and risk factors associated with non-alcoholic fatty liver disease in patients with type 2 diabetes mellitus. **Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia**, v. 54, n. 4, p. 362–8, jun. 2010.

FRACANZANI, A. L. et al. Risk of severe liver disease in nonalcoholic fatty liver disease with normal aminotransferase levels: a role for insulin resistance and diabetes. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 48, n. 3, p. 792–8, set. 2008.

FURUI, J.; FURUKAWA, M.; KANEMATSU, T. The low positive rate of serum alpha-fetoprotein levels in hepatitis C virus antibody-positive patients with hepatocellular carcinoma. **Hepato-gastroenterology**, v. 42, n. 5, p. 445–9, 1995.

GALLAGHER, F. A. An introduction to functional and molecular imaging with MRI. **Clinical Radiology**, v. 65, n. 7, p. 557–566, 2010.

GODOY, M. M. G. et al. Hepatitis C virus infection diagnosis using metabonomics. **Journal of viral hepatitis**, v. 17, n. 12, p. 854–8, dez. 2010.

HERNAEZ, R. et al. Diagnostic Accuracy and Reliability of Ultrasonography for the Detection of Fatty Liver: A Meta-Analysis. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 54, n. 3, p. 1082–1090, 2011.

HOLMES, E.; TSANG, T. M.; TABRIZI, S. J. The application of NMR-based metabonomics in neurological disorders. **NeuroRx : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics**, v. 3, n. 3, p. 358–72, jul. 2006.

JIMÉNEZ, B. et al. Serum metabolic signature of minimal hepatic encephalopathy by ¹H-nuclear magnetic resonance. **Journal of proteome research**, v. 9, n. 10, p. 5180–7, 1 out. 2010.

KALHAN, S. C. et al. Plasma Metabolomic Profile in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. **Metabolism**, v. 60, n. 3, p. 404–413, 2011.

KESSOKU, T. et al. Simple scoring system for predicting cirrhosis in nonalcoholic fatty liver disease. **World journal of gastroenterology : WJG**, v. 20, n. 29, p. 10108–14, 7 ago. 2014.

KEUN, H. C. Metabonomic modeling of drug toxicity. **Pharmacology & therapeutics**, v. 109, n. 1-2, p. 92–106, jan. 2006.

KIM, S.-H. et al. ¹H-nuclear magnetic resonance spectroscopy-based metabolic assessment in a rat model of obesity induced by a high-fat diet. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 395, n. 4, p. 1117–24, out. 2009.

KOO, S.-H. Nonalcoholic fatty liver disease: molecular mechanisms for the hepatic steatosis. **Clinical and molecular hepatology**, v. 19, n. 3, p. 210–5, set. 2013.

LAUER, G. M.; WALKER, B. D. Hepatitis C virus infection. **The New England journal of medicine**, v. 345, n. 1, p. 41–52, 5 jul. 2001.

LAURIDSEN, M. et al. Human urine as test material in ¹H NMR-based metabonomics: recommendations for sample preparation and storage. **Analytical chemistry**, v. 79, n. 3, p. 1181–6, 1 fev. 2007.

LEE, S. S. et al. Non-invasive assessment of hepatic steatosis: prospective comparison of the accuracy of imaging examinations. **Journal of hepatology**, v. 52, n. 4, p. 579–85, abr. 2010.

LEE, S. S.; PARK, S. H. Radiologic evaluation of nonalcoholic fatty liver disease. **World journal of gastroenterology : WJG**, v. 20, n. 23, p. 7392–402, 21 jun. 2014.

LEE, Y. I.; LIM, Y.-S.; PARK, H. S. Colorectal neoplasms in relation to non-alcoholic fatty liver disease in Korean women: a retrospective cohort study. **Journal of gastroenterology and hepatology**, v. 27, n. 1, p. 91–5, jan. 2012.

LENZ, E. M. et al. Metabonomics, dietary influences and cultural differences: a ¹H NMR-based study of urine samples obtained from healthy British and Swedish subjects. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 36, n. 4, p. 841–9, 19 nov. 2004.

LENZ, E. M.; WILSON, I. D. Analytical strategies in metabonomics. **Journal of proteome research**, v. 6, n. 2, p. 443–58, fev. 2007.

LI, H. et al. A proton nuclear magnetic resonance metabonomics approach for biomarker discovery in nonalcoholic fatty liver disease. **Journal of proteome research**, v. 10, n. 6, p. 2797–806, 3 jun. 2011.

LINDON, J. C.; HOLMES, E.; NICHOLSON, J. K. Pattern recognition methods and applications in biomedical magnetic resonance. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, v. 39, n. 1, p. 1–40, jul. 2001.

LINDON, J. C.; HOLMES, E.; NICHOLSON, J. K. So what's the deal with metabonomics? **Analytical chemistry**, v. 75, n. 17, p. 384A–391A, 2003.

LINDON, J. C.; HOLMES, E.; NICHOLSON, J. K. Metabonomics techniques and applications to pharmaceutical research & development. **Pharmaceutical research**, v. 23, n. 6, p. 1075–88, jun. 2006.

LIU, Y. et al. NMR and LC/MS-based global metabolomics to identify serum biomarkers differentiating hepatocellular carcinoma from liver cirrhosis. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, v. 135, n. 3, p. 658–68, 1 ago. 2014.

MÄNNISTÖ, V. T. et al. Ketone body production is differentially altered in steatosis and non-alcoholic steatohepatitis in obese humans. **Liver International**, p. n/a–n/a, 2015.

MANNS, M. P. et al. Diagnosis and Management of Autoimmune Hepatitis. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 51, n. 6, p. 2193–2213, 2010.

MARCHESINI, G. et al. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 37, n. 4, p. 917–23, abr. 2003.

MAUSS, BERG, ROCKSTROH, SARRAZIN, W. **Hepatology , A Clinical Textbook**. Fourth Edi ed.[s.l.] Flying Publisher, 2013.

MESSANA, I. et al. Proton nuclear magnetic resonance spectral profiles of urine in type II diabetic patients. v. 1534, p. 1529–1534, 1998.

MOFRAD, P. et al. Clinical and histologic spectrum of nonalcoholic fatty liver disease associated with normal ALT values. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 37, n. 6, p. 1286–92, jun. 2003.

MUNSHI, S. U. et al. Metabonomic analysis of hepatitis E patients shows deregulated metabolic cycles and abnormalities in amino acid metabolism. **Journal of viral hepatitis**, v. 18, n. 10, p. e591–602, out. 2011.

NAHON, P. et al. Identification of serum proton NMR metabolomic fingerprints associated with hepatocellular carcinoma in patients with alcoholic cirrhosis. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 18, n. 24, p. 6714–22, 15 dez. 2012.

NASCIMBENI, F. et al. From NAFLD in clinical practice to answers from guidelines. **Journal of hepatology**, v. 59, n. 4, p. 859–71, out. 2013.

NICHOLSON, J. K. et al. Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 1, n. 2, p. 153–61, fev. 2002.

NICHOLSON, J. K.; LINDON, J. C. Metabonomics. **Nature**, v. 455, n. October, p. 1054–1056, 2008.

NICHOLSON, J. K.; LINDON, J. C.; HOLMES, E. “Metabonomics”: understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. **Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems**, v. 29, n. 11, p. 1181–9, nov. 1999.

NIEDERAU, C. Chronic hepatitis B in 2014: Great therapeutic progress, large diagnostic deficit. **World journal of gastroenterology : WJG**, v. 20, n. 33, p. 11595–11617, 7 set. 2014.

NOUREDDIN, M. et al. Utility of magnetic resonance imaging versus histology for quantifying changes in liver fat in nonalcoholic fatty liver disease trials. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 58, n. 6, p. 1930–40, dez. 2013.

PALMENTIERI, B. et al. The role of bright liver echo pattern on ultrasound B-mode examination in the diagnosis of liver steatosis. **Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver**, v. 38, n. 7, p. 485–9, jul. 2006.

POYNARD, T. et al. Natural history of HCV infection. **Baillière's best practice & research. Clinical gastroenterology**, v. 14, n. 2, p. 211–28, abr. 2000.

POYNARD, T. et al. The diagnostic value of biomarkers (SteatoTest) for the prediction of liver steatosis. **Comparative hepatology**, v. 4, p. 10, jan. 2005.

POYNARD, T. et al. Diagnostic value of biochemical markers (NashTest) for the prediction of non alcoholo steato hepatitis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. **BMC gastroenterology**, v. 6, p. 34, jan. 2006.

PRATI, D. Updated Definitions of Healthy Ranges for Serum Alanine Aminotransferase Levels. **Annals of Internal Medicine**, v. 137, n. 1, p. 1, 2 jul. 2002.

QI, S. et al. H NMR-based serum metabolic profiling in compensated and decompensated cirrhosis. **World journal of gastroenterology : WJG**, v. 18, n. 3, p. 285–290, 2012a.

QI, S. et al. Comparison of the metabolic profiling of hepatitis B virus-infected cirrhosis and alcoholic cirrhosis patients by using (1) H NMR-based metabonomics. **Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology**, v. 42, n. 7, p. 677–85, jul. 2012b.

RAFIQ, N.; YOUNOSSI, Z. M. Nonalcoholic fatty liver disease: a practical approach to evaluation and management. **Clinics in liver disease**, v. 13, n. 2, p. 249–66, maio 2009.

RAMESH, S.; SANYAL, A. J. Hepatitis C and nonalcoholic fatty liver disease. **Seminars in liver disease**, v. 24, n. 4, p. 399–413, nov. 2004.

REEDER SB1, CRUITE I, HAMILTON G, S. C. Quantitative Assessment of Liver Fat with Magnetic Resonance Imaging and Spectroscopy. **J Magn Reson Imaging**, v. 34, n. 4, p. 1–38, 2012.

RYAN, D. et al. Recent and potential developments in the analysis of urine: a review. **Analytica chimica acta**, v. 684, n. 1-2, p. 8–20, 17 jan. 2011.

SAADEH, S. et al. The utility of radiological imaging in nonalcoholic fatty liver disease. **Gastroenterology**, v. 123, n. 3, p. 745–750, set. 2002.

SACHSE, D. et al. Metabolic Changes in Urine during and after Pregnancy in a Large, Multiethnic Population-Based Cohort Study of Gestational Diabetes. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, p. 1–12, 2012.

SANDS, C. J. et al. Metabolic phenotyping for enhanced mechanistic stratification of chronic hepatitis C-induced liver fibrosis. **The American journal of gastroenterology**, v. 110, n. 1, p. 159–69, jan. 2015.

SCHWIMMER, J. B. et al. SAFETY study: Alanine aminotransferase cutoff values are set too high for reliable detection of pediatric chronic liver disease. **Gastroenterology**, v. 138, n. 4, p. 1357–1364, 2010.

SHARIFF, M. I. F. et al. Characterization of Urinary Biomarkers of Hepatocellular Carcinoma Using Magnetic Resonance Spectroscopy in a Nigerian Population research articles. **Journal of Proteome Research**, n. 9, p. 1096–1103, 2010.

SOGA, T. et al. Serum metabolomics reveals γ -glutamyl dipeptides as biomarkers for discrimination among different forms of liver disease. **Journal of hepatology**, v. 55, n. 4, p. 896–905, out. 2011.

STAUBER, R.-E.; LACKNER, C. Noninvasive diagnosis of hepatic fibrosis in chronic hepatitis C. **World journal of gastroenterology : WJG**, v. 13, n. 32, p. 4287–94, 28 ago. 2007.

SUMIDA, Y. et al. Validation of the FIB4 index in a Japanese nonalcoholic fatty liver disease population. **BMC gastroenterology**, v. 12, p. 2, jan. 2012.

SUMIDA, Y.; EGUCHI, Y.; ONO, M. Current status and agenda in the diagnosis of nonalcoholic steatohepatitis in Japan. **World journal of hepatology**, v. 2, n. 10, p. 374–83, 27 out. 2010.

TORRES, D. M.; WILLIAMS, C. D.; HARRISON, S. A. Features, diagnosis, and treatment of nonalcoholic fatty liver disease. **Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association**, v. 10, n. 8, p. 837–58, ago. 2012.

VAN DOORN, M. et al. Evaluation of metabolite profiles as biomarkers for the pharmacological effects of thiazolidinediones in Type 2 diabetes mellitus patients and healthy volunteers. **British journal of clinical pharmacology**, v. 63, n. 5, p. 562–74, maio 2007.

VAN WERVEN, J. R. et al. Assessment of hepatic steatosis in patients undergoing liver resection: comparison of US, CT, T1-weighted dual-echo MR imaging, and point-resolved 1H MR spectroscopy. **Radiology**, v. 256, n. 1, p. 159–68, jul. 2010.

VELÁZQUEZ, R. F. et al. Prospective analysis of risk factors for hepatocellular carcinoma in patients with liver cirrhosis. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 37, n. 3, p. 520–7, mar. 2003.

VERNON, G.; BARANOVA, A; YOUNOSSI, Z. M. Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. **Alimentary pharmacology & therapeutics**, v. 34, n. 3, p. 274–85, ago. 2011.

VUPPALANCHI, R.; CHALASANI, N. Nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis: Selected practical issues in their evaluation and management. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 49, n. 1, p. 306–317, 2009.

WANG, J. et al. Metabolomic Profiling of Autoimmune Hepatitis: The Diagnostic Utility of Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. **Journal of proteome ...**, v. 13, p. 3792–3801, 2014.

WANG, X. et al. Urinary metabolite variation is associated with pathological progression of the post-hepatitis B cirrhosis patients. **Journal of proteome research**, v. 11, n. 7, p. 3838–47, 6 jul. 2012.

WHO. **World Health Organization, International Agency for Research on Cancer**. Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>>. Acesso em: 4 fev. 2015.

WHO | **Hepatitis C**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>>. Acesso em: 25 set. 2014.

WÜRTZ, P. et al. Metabolic signatures of insulin resistance in 7,098 young adults. **Diabetes**, v. 61, n. 6, p. 1372–1380, 2012.

YU, K. et al. A Metabonomic Investigation on the Biochemical Perturbation in Liver Failure Patients Caused by Hepatitis B Virus research articles. **Journal of proteome research**, v. 6, p. 2413–2419, 2007.

ZAAIJER, H. L. et al. Reliability of polymerase chain reaction for detection of hepatitis C virus. **Lancet**, v. 341, n. 8847, p. 722–4, 20 mar. 1993.

ZACHOU, K. et al. Review article: autoimmune hepatitis -- current management and challenges. **Alimentary pharmacology & therapeutics**, v. 38, n. 8, p. 887–913, out. 2013.

ZHANG, A. et al. Metabonomics for discovering biomarkers of hepatotoxicity and nephrotoxicity. **Die Pharmazie**, v. 67, n. 2, p. 99–105, fev. 2012a.

ZHANG, A. et al. Recent and potential developments of biofluid analyses in metabolomics. **Journal of proteomics**, v. 75, n. 4, p. 1079–88, 2 fev. 2012b.

ZHANG, A. et al. Urine metabolomics. **Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry**, v. 414, p. 65–9, 24 dez. 2012c.

ZHANG, A. et al. Urinary metabolic biomarker and pathway study of hepatitis B virus infected patients based on UPLC-MS system. **PloS one**, v. 8, n. 5, p. e64381, jan. 2013a.

ZHANG, A. et al. NMR-based metabolomics coupled with pattern recognition methods in biomarker discovery and disease diagnosis. **Magnetic resonance in chemistry : MRC**, v. 51, n. 9, p. 549–56, set. 2013b.

ZHANG, L. et al. Development and validation of a liquid chromatography – mass spectrometry metabonomic platform in human plasma of liver failure caused by hepatitis B virus. **Acta Biochim Biophys Sin**, n. September, p. 688–698, 2010a.

ZHANG, S. et al. Advances in NMR-based biofluid analysis and metabolite profiling. **The Analyst**, v. 135, n. 7, p. 1490–8, jul. 2010b.

APÊNDICE A



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MEDICINA TROPICAL - CCS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FUNDAMENTAL – CCEN
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DMC

DQF

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) a participar, como voluntário (a), das pesquisas intituladas “*Emprego da Metabonômica no Diagnóstico de Doenças Hepáticas em Amostras de Urina*” e “*Emprego da Metabonômica na Avaliação do Grau de Fibrose Hepática nas Hepatites Crônicas B e C*”. Se concordar em participar, favor assinar ao final do documento.

Sua participação não é obrigatória, e, a qualquer momento, você poderá desistir de participar e retirar seu consentimento, não prejudicando de forma alguma seu atendimento ou tratamento nesta instituição.

Você receberá uma cópia deste documento onde se encontra o telefone e endereço dos pesquisadores responsáveis e do Comitê de Ética e Pesquisa (CEP), podendo tirar dúvidas de sua participação e outras que tiver. **ENDEREÇO DO CEP:** Av. da Engenharia, S/N, 1º andar, Cid Universitária, Recife, PE. Telefone: 2126858. **PESQUISADORES RESPONSÁVEIS:** Michele Godoy e Andrea Dória Batista. **ENDEREÇO:** Hospital das Clínicas, Ambulatório de Hepatologia. Av Prof. Moraes Rego, S/N. Cid. Uiversitária, Recife, PE. **TELEFONE:** 21263510

OBJETIVOS: Esta pesquisa tem o objetivo de diferenciar, através do exame de sua urina, os indivíduos com hepatite B, hepatite C, doença gordurosa do fígado e os indivíduos saudáveis por uma nova técnica chamada metabonômica. Esta mesma técnica será também avaliada na diferenciação do grau de fibrose do fígado em indivíduos com hepatite B e hepatite C, através de exame de sangue.

PROCEDIMENTOS DO ESTUDO: Concordando em participar da pesquisa, responderá um questionário sobre se você é portador de alguma doença, faz uso regular de algum medicamento, faz uso de bebida alcoólica e/ou alguma droga, caso afirmativo, qual a periodicidade do uso. Fará sua consulta médica. Serão solicitados os exames de sangue e urina, necessários para seu diagnóstico e tratamento, (assim como exame de urina) para análise de rotina no Laboratório do Hospital das Clínicas (sumário de urina) e para análise da pesquisa no Laboratório da Central Analítica do Departamento de Química Fundamental da UFPE, sendo essas amostras descartadas após a análise. O resultado dessa análise servirá para classificar as amostras de urina de portadores de pacientes com hepatite B, hepatite C, doença gordurosa do fígado e indivíduos saudáveis, e para classificar as amostras de soro de pacientes com hepatite B e hepatite C, de acordo com o grau de fibrose do fígado.

RISCOS: Você não será exposto a nenhum fator de risco adicional por estar participando da pesquisa, visto que a coleta de sangue e urina para realização de exames laboratoriais faz parte da rotina do ambulatório de Hepatites do HC–UFPE para avaliação clínica dos mesmos pacientes. Sua rotina não será alterada e nenhuma substância será administrada. No entanto, poderá sentir-se constrangido ao responder o questionário da pesquisa.

BENEFÍCIO: Você terá sua urina e soro analisados e qualquer alteração encontrada você será comunicado, assim como também estará contribuindo para o desenvolvimento de um novo método de diagnóstico de indivíduos com doenças hepáticas.

CUSTO/REEMBOLSO PARA O PARTICIPANTE: Não haverá nenhum gasto com sua participação na pesquisa. A análise da sua amostra de urina e soro será totalmente gratuita, não será emitida nenhuma cobrança com o que será realizado. Você também não receberá nenhum pagamento com a sua participação.

CONFIDENCIALIDADE DA PESQUISA: Todas as informações fornecidas durante a pesquisa são sigilosas e a identidade e dados dos voluntários não serão divulgados em nenhuma hipótese. Os questionários ficarão armazenados com as próprias pesquisadoras.

Assinatura do Pesquisador Responsável: _____



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLÍNICA - CCS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FUNDAMENTAL – CCEN
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DMC

DQF

CONSENTIMENTO DE PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO
VOLUNTÁRIO

Eu, _____, portador da carteira de identidade de nº _____ e CPF _____, declaro que li as informações contidas nesse documento, fui devidamente informado (a) pelos pesquisadores- Dra. Michele Godoy e/ou Dra Andrea Dória Batista- dos procedimentos que serão utilizados, riscos, custo/reembolso dos participantes, confidencialidade da pesquisa, concordando ainda em participar da pesquisa. Foi-me garantido que posso retirar o consentimento a qualquer momento, sem que isso leve a qualquer penalidade. Declaro ainda que recebi uma cópia desse Termo de Consentimento.

LOCAL E DATA:

NOME E ASSINATURA DO VOLUNTÁRIO:

(Nome por extensor)

(Assinatura)

ASSINATURA DO PESQUISADOR RESPONSÁVEL:

Testemunhas: 1. _____

2. _____

APÊNDICE B

Ficha Clínica Unificada: HCV/HBV/Metabonômica			
Data (coleta):		Prontuário HC: Pesquisador:	
Nome completo:			
Estado atual de tratamento: 1. SEM TRATAMENTO 2. EM TRATAMENTO 3. TRATADO (Ano)			
Idade (momento da biópsia):		Qual a data do seu nascimento:	
Sexo:	1. Masc. 2. Fem.	Cor de pele:	1. Branca 2. Parda 3. Negro 4. Índio 5. Outro
Cidade/Estado (procedência):		Cidade/Estado (natural):	
Telefone convencional para contato:		Celular:	
Investigação clínica			
Sintoma atual: 1. Sim 2. Não Qual:			
Antecedentes:			
1. Passado de icterícia 3. Medicação com seringa de vidro 6. Tatuagens 8. Relação sexual não segura			
2. Hemotransfusão (ano) 4. Drogas injetáveis 7. Cirurgias (ano)			
Consumo de álcool: 1. Sim 2. Não Há quanto tempo?			
Tipo de bebida:		Quantidade/sem:	
Tabagismo:		1. Nunca fumou 2. Ex-fumante 3. Fumante	
O(a) senhor(a) tem ou teve alguma outra doença?		1. Sim 2. Não 9. Não sabe	
Se sim, qual a outra doença que o(a) senhor(a) tem ou teve?			
1. Hipertensão 4. Dca auto-imune			
2. Diabetes 5. Neoplasia			
3. Esquistossomose 6. Dca renal			
4. DST 7. Outra. Especifique:			
O(A) senhor(a) tomou alguma medicação nos últimos 10 dias?		1. Sim 2. Não 9. Não sabe	
Se sim, qual a medicação que o(a) senhor(a) tomou?			
1. Corticoides orais			
2. Anti-hipertensivos			
3. Hipoglicemiante oral ou insulina			
4. Anti-inflamatório não-hormonal			
5. Outro			
Exame físico:			
1. Aranha vascular 5. Eritema palmar			
2. Ginecomastia 6. Ascite			
3. Hepatomegalia 7. Flapping			
4. Esplenomegalia 8. Outros:			
Peso:	Kg	Altura:	(metro)
IMC:		Circunf. abdom.	cm
P.A.:			

Exames Laboratoriais:			
Glicemia:	CT:	HDL:	LDL:
Insulina:	TGR:		
AST:	ALT:	FA:	GGT:
Bil total:	Bil direta:		
Ferritina:	Alb:	Alfafeto:	Plac:
SU: dens:	pH:		
Anti-HCV:	HBsAg:	Anti-HBs:	HBeAg:
Anti-HBe:	Anti-HIV:		
Síndrome Metabólica (PA; Glic; Cintura abd; TG; HDL): 1. Sim 2. Não			
Genótipo viral (data): Carga Viral (data):			
USG (data):			
Dca hepática crônica: 1. Sim 2. Não Esplenomegalia: 1. Sim 2. Não Circulação colateral: 1. Sim 2. Não			
Aumento v. porta: 1. Sim 2. Não Ascite: 1. Sim 2. Não Esteatose: 1. Sim 2. Não			
EDA (data):			
Varizes de esofágicas: 1. Sim 2. Não Varizes gástricas: 1. Sim 2. Não Gastropatia hipertensiva: 1. Sim 2. Não			
Histopatológico (data):			
Grau de fibrose (METAVIR):			
1. F1 2. F2 3. F3 4. F4 5. HCC Data: / /		1. F1 2. F2 3. F3 4. F4 5. HCC Data: / /	
Grau de inflamação (METAVIR):			
1. A0 2. A1 3. A2 4. A3 5. A4		1. A0 2. A1 3. A2 4. A3 5. A4	
Grau de esteatose:			
1. Leve 2. Moderada 3. Intensa 4. Esteatohepatite (NASH)		1. Leve 2. Moderada 3. Intensa 4. Esteatohepatite (NASH)	
Resposta ao tratamento (HCV-RNA):			
Week 4:	POS	NEG	
Week 12:	POS	NEG	
Week 24:	POS	NEG	
Week 48:	POS	NEG	
6 meses pós-tto:	POS	NEG	
OBS:			

APENDICE C

ARTIGO 1.

Nonalcoholic Fatty Liver Disease Diagnosis by ^1H NMR based Urine Metabonomics

Michele Maria Gonçalves de Godoy¹, Edmundo Pessoa Lopes², Andrea Dória Batista¹, Carlos Jonnatan Pimentel Barros³, Tássia Brena Barroso Carneiro da Costa³, Ronaldo Dionísio Silva³, Joana Eliza Santana³, Ana Lúcia Coutinho Domingues², Ricardo Oliveira Silva⁴

Study conducted at the Hepatitis Clinic at the Hospital das Clínicas (HC) and at the Central Analytical Laboratory of the Fundamental Chemistry Department at the Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Brazil.

Michele Maria Gonçalves de Godoy

Hospital das Clínicas – Bloco A, Depto de Medicina Clínica.

Rua Prof. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária

CEP 50670-901, Recife - PE, Brasil.

E-mail: michelegodoy@oi.com.br

Electronic word count: 4655

Number of figures and tables: 5

List of abbreviations: NAFLD, nonalcoholic fatty liver disease; US, ultrasonography; ^1H NMR, proton nuclear magnetic resonance; HCV, hepatitis C virus; UFPE, Universidade Federal de Pernambuco; HBV, hepatitis B virus; Anti-HBc, antibody to hepatitis B core antigen; Anti-HBs, antibody to hepatitis B surface antigen; HIV, human immunodeficiency

virus; BMI, body mass index; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; GGT, gamma-glutamyl transferase; TC, total cholesterol; LDL, low density lipoprotein; HDL, high density lipoprotein; TGR, triglycerides; RF, radiofrequency; δ , chemical shift; ppm, pars per million; PCA, principal component analysis; PLS DA, partial least squares discriminant analysis; LDA, linear discriminant analysis, VIP, variable importance in projection, ROC, receiver operating characteristic; CT, computed tomography; MRI, magnetic resonance imaging; MRS, magnetic resonance spectroscopy; PDFF, proton density fat fraction; ULN, upper limit of normalit.

Keywords: NAFLD; metabonomics; metabolomics; steatosis; steatohepatitis; urine; ^1H NMR; NMR.

Conflict of interest: The authors declare that they do not have anything to disclose regarding funding or conflict of interest with respect to this manuscript.

Financial support: None

Author's contributions

¹ Completing Doctorate studies on the Post-Graduation Program in Tropical Medicine – UFPE.

² Associate Professor at the Center for Health Sciences at UFPE.

³ Completing Doctorate studies at the Department of Fundamental Chemistry at CCEN/ UFPE

⁴ Associate Professor at the Department of Fundamental Chemistry at CCN/UFPE.

Nonalcoholic Fatty Liver Disease Diagnosis by ^1H NMR based Urine Metabonomics

Abstract:

Background and aims: Proton nuclear magnetic resonance spectroscopy based Metabonomics on has proved to be a highly successful approach. It is capable of detecting metabolic changes within various pathophysiological processes, is non-invasive, rapid and reproducible. The aim of this study was to diagnose non-alcoholic fatty liver disease through metabonomics analysis using urine samples.

Methods: This was a pilot study to assess the diagnostic test, which studied 30 subjects, 20 patients with non-alcoholic fatty liver disease diagnosed by ultrasonography, and 10 control subjects. Urine samples were analyzed by proton nuclear magnetic resonance combined with multivariate statistical tools in order to classify them.

Results: From amongst the 20 urine samples of the disease group, the obtained metabonomic model identified 19 as positive and one as negative. Among the 10 subjects in the control group, the model identified nine samples as negative and one as positive. We identified the following metabolites: 3-aminoisobutaboic acid, acetate, citrate, hippurate and creatinine, that demonstrated a relationship with observed discrimination, although the urinary levels of creatinine were lower in the disease group, while, the other metabolites presented higher urinary levels in the disease group. The metabonomic model presented accuracy of 93.3%, sensitivity of 95% and specificity of 90%.

Conclusions: Analysis of the urine samples using ^1H NMR spectroscopy revealed the metabolites that may discriminate the groups and diagnose nonalcoholic fatty liver disease with high accuracy and the potential for application in clinical practice.

Keywords: NAFLD; metabonomics; metabolomics; steatosis; NMR.

Introduction

Due to the improved management of chronic viral hepatitis and the increasing incidence of obesity in modern society, nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) has become the major cause of chronic liver disease, affecting 15% to 45% of the population in developed countries [1]. From a pathological viewpoint, NAFLD involves two entities: steatosis and steatohepatitis. The latter may progress to cirrhosis and its complications.

As the majority of patients are asymptomatic, NAFLD is often diagnosed incidentally during routine clinical assessment, through increased levels of aminotransferases, or findings from abdominal imaging studies [2, 3]. Nonetheless, NAFLD remains underdiagnosed and some patients with significant liver disease go unnoticed, may be neglected and thus the opportunity of intervention is missed [4].

The diagnosis of NAFLD is based on evidence of fat in the hepatic parenchyma through imaging tests, usually ultrasonography (US), or by histopathology ($\geq 5\%$ of hepatocytes) in individuals with no or minimal intake of alcohol, and the exclusion of other causes of liver disease [5].

Liver biopsy is considered "gold standard" for NAFLD diagnosis, especially since it enables the severity of the disease to be evaluated. However, it has the drawback of being invasive causing morbidity and little risk of mortality, beyond the possibility of sampling error [4,5].

Although biopsy is the reference standard, US has been recognized as the main tool to trace NAFLD in clinical practice. The test is safe, cheap, widely available and performs well when steatosis is present in at least 20% to 30% of the hepatocytes [6, 7]. However, US presents certain limitations regarding low accuracy for mild steatosis, morbid obesity, as well as being operator-dependent [7-9].

Magnetic resonance imaging (MRI) is an alternative method that have greater accuracy in mild steatosis detection (> 5% of hepatocytes), and the ability to be able to assess the amount of fat. However, MRI is expensive, which is not very accessible.

Over recent years, there has been a growing interest in metabonomic technology, since it displays the ability to associate changes in the metabolite profile in a given organic biofluid with environmental, pathological or toxicological agents [10,11].

Each biofluid has its own unique characteristic biochemical composition, which varies in response to physiological or pathological stimuli, providing a metabolic "fingerprint", which is specific to the nature or site of the external agents [12-14].

¹H NMR spectroscopy has become a major tool for analyzing these changes, since the spectrum may accurately demonstrate the metabolites and their concentrations [14-16]. One limiting factor for understanding information generated by NMR spectra is the great complexity involved. For efficient interpretation, it is necessary to use multivariate statistical techniques, reducing the dimensionality of the data set, which is indispensable for extracting the maximum possible information [12-17].

Using metabonomics, urine has generally been the most widely used biofluid to study diseases. It offers numerous advantages, especially since it is ready to be used, obtained easily, is less complex, and presents a lower protein content than other fluids [18]. The use of urine samples in metabonomics enables an overall view of the organism [19], involving both the identification of biomarkers, and the diagnosis of many diseases, including liver diseases [20-22].

The aim of this study was to diagnose NAFLD through metabonomics in urine samples.

Patients and Methods

This was a pilot study to evaluate a diagnostic test, consisting of two groups:

- a) Disease group - patients with NAFLD,
- b) Control group - individuals with immunity to hepatitis B infection (HBV).

The patients studied were selected from the Hepatology Clinic of the Hospital das Clínicas at the Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) by spontaneous demand, and included those aged over 18 years, of both sexes, and who agreed to participate in the study. Those who presented with NAFLD by US were allocated to the disease group. Those with natural immunity to the HBV, which were seropositive for anti-HBc and anti-HBs, and who did not present steatosis by US, were allocated to the control group.

We excluded from both groups any individuals infected with HBV, HCV, HIV or other diseases, such as autoimmune disease, cancer, thyroiditis, arthritis, glomerulonephritis and renal failure and those with an alcohol intake of above 20g/day for women and 30g/day for men [5].

The study was approved by the Research Ethics Committee at the Center for Health Sciences at UFPE, registration nº 396/11.

A total of 30 individuals, 20 in the NAFLD group and 10 in the control group were assessed.

In the NAFLD group, 6 patients were male and 14 female, and in the control group, 8 were male and 2 were female. The mean age in the disease group was 55 ± 12 years, and in the control group was 37 ± 10 years. The mean BMI in the NAFLD group was $30.3 \pm 4.2 \text{ kg m}^{-2}$ and in the control group was $26.5 \pm 3.1 \text{ kg m}^{-2}$.

Sample Analysis

After fasting for 12 hours, patients were referred to the Central Laboratory of the Hospital das Clínicas (HC) at UFPE, and each individual provided 10 mL of blood from a peripheral vein and 10 ml of urine.

Serum levels of the following enzymes were measured: aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and gamma-glutamyl transferase (GGT), as well as total cholesterol (TC), high density lipoprotein (HDL), low density lipoprotein (LDL), triglycerides (TGR) and glucose, all by automated kinetic method (Abbott®). Serum levels of AST, ALT and GGT were divided by the upper limit of normality (ULN) of each one. Serological markers HBsAg, anti-HBs, anti-HBc and anti-HIV were screened by enzyme-immunoassay (Abbott®)

Urine samples were analyzed by urine reagent strips (Labstix®) at the Central Laboratory of the HC, and a 2 mL aliquot was sent to the Analytical Center of the Department of Fundamental Chemistry at UFPE to obtain the ^1H NMR spectra and to construct the metabonomic models.

Ultrasound was performed with a General Eletric Healthcare, Logic P6 device at the Imaging Center (Diagimagem), HC - UFPE.

^1H NMR Spectroscopy

All ^1H NMR spectra were obtained from a Varian Unity Plus spectrometer (Varian NMR) operating at 300 MHz using a 5 mm internal diameter tube. Fresh urine samples of 400 μL were mixed with 200 μL buffer solution ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 / \text{NaH}_2\text{PO}_4 - 0.2 \text{ mol L}^{-1}$).

After homogenization, the ^1H NMR spectrum was obtained, using a pulse sequence with pre-saturation of the water signal, using the following parameters: spectral window of 5 kHz, acquisition time of 6.4 s, 90° RF pulse angle, saturation delay of 3.0 s and 32 repetitions. The spectra were processed using MestreNova software (Version 9.1). The phase and baseline

distortions were adjusted manually with a line broadening of 0.3 Hz and a signal with a chemical shift (δ) at 3.06 ppm, assigned to the methyl group of creatinine was used as an internal reference of chemical shift. Spectra were divided into δ 0.05 ppm between 0.0 to 10.0 ppm, in which the regions ranging between δ 4.2 to 6.4 ppm were excluded to eliminate signs of water and urea, resulting in 154 regions (bins).

Statistical analysis and data reduction of the ^1H NMR spectra

For the frequency analysis between groups and categorical variables, we used the Fisher's exact test. The comparison of quantitative variables was performed using the Student t test and the Mann-Whitney. The confidence level was 95% ($p \leq 0.05$).

Spectral data were gathered in a matrix with 30 rows (cases) and 155 columns (variables), with 154 bins and a class variable (positive or negative for NAFLD). Data were normalized on the line, using the expression $x = \frac{(x_i - \bar{x})}{s}$, where x_i is the integration area in variable i (chemical shift δ_i), $\bar{x}$ is the mean value of the integration areas of each variable for that sample, and s is the standard deviation observed. This matrix was used as input for the principal component analysis (PCA), resulting in 29 ($n - 1$) PCs. No natural grouping was observed. Therefore, supervised methods were used: Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA) and Linear Discriminant Analysis (LDA).

PLS-DA was applied to the original matrix data, after preprocessing: normalization by the sum and autoscaling. To investigate the metabolites associated with discrimination between the groups classified by PLS-DA, we applied the variable importance in projection (VIP) score value, with a cut-off point > 1 [24].

The selection of variables to build the model using LDA began by separating the spectral data according to their pathophysiological status, NAFLD or Control, and obtained an average spectrum of each group. These spectra were subtracted, demonstrating the most important

chemical shifts (δ) to discriminate between the groups. These δ were used as input data for LDA, with 10 variables selected by Lambda Wilk in order to build the metabonomic model. Cross-validation was performed for this model.

The models built by PCA and LDA were processed using the software Statistica 8.0.

Results

Table 1 presents the mean serum levels of AST, ALT, GGT, glucose, TGR, TC, LDL and HDL in both groups, observing that the mean values of glucose and TGR were higher in the disease group, and LDL in the control group, $p < 0,05$.

INSERT TABLE 1

Figure 1 presents the results of subtracting the mean spectra from subjects in the NAFLD and control groups, obtained after normalization of the ^1H NMR spectra. It may be observed that the signals at δ in 3.05 and 4.10 ppm, attributed to creatinine, are less intense in the NAFLD group than in the control group. On the other hand, the signals at δ 1.20 1.95, 2.60, 2.70, 7:45, 7.60 and 7.85 ppm are more intense in the control group.

INSERT FIGURE 1

In the PLS-DA, discrimination was not satisfactory, but the VIP graph demonstrates the most important chemical shifts in order to discriminate the groups (Figure 1). These results support those observed in the subtraction of the mean spectra. The three variables with the highest VIP score, δ 4.10, 3.50 and 3.10 ppm, were less intense in the NAFLD group. It is also worth noting that the variables δ 1.20 1.95, 2.60, 2.70, 7.60, 7.65 and 7.85 ppm are more intense in the NAFLD group. Table 2 presents the main discriminating metabolites, their chemical shifts and the urinary levels for each group. With these data the LDA was performed using these regions of the ^1H NMR spectrum and the metabonomic model was obtained.

INSERT TABLE 2

From amongst the 20 urine samples of the NAFLD group, the metabonomic model identified 19 as positive and one negative. From amongst the 10 subjects in the control group, the model identified nine samples as negative and one as positive. The metabonomic model presented an accuracy of 93.3%, a sensitivity of 95% and a specificity of 90% ($p = 0.0038$) as presented in Table 3. In cross validation, the model presented an accuracy of 86.7%.

INSERT TABLE 3

Discussion

Due to the current increased occurrence of NAFLD in the population there is a clinical need for evaluating and monitoring liver disease by non-invasive methods, such as US [25]. A meta-analysis performed by Hernaez et al., with the aim of systematically reviewing and determining the diagnostic accuracy of US to differentiate patients with and without NAFLD, defined by the presence of moderate to severe steatosis ($\geq 30\%$) through liver biopsy, presenting a sensitivity and specificity of 84.8% (95% CI: 79.5 to 88.9) and 93.6% (87.2 to 97.0), respectively, with an area under the ROC curve of 0.93 (0.91 to 0.95) (6). In contrast, when all degrees of steatosis ($\geq 3\%$) were considered, a decrease was observed in sensitivity and specificity [8, 26-28].

The diagnostic accuracy of computed tomography (CT), as with US, is high for moderate to severe steatosis, but for diagnosing mild steatosis it is low, as well as presenting potential damage from ionizing radiation [7].

MRI and *in vivo* magnetic resonance spectroscopy (MRS) are able to assess steatosis objectively, using a quantitative index for measuring liver fat by proton density fat fraction (PDFF). Some studies, when comparing MRI/MRS, US and CT with histological examination to assess steatosis, have observed a better performance with MRI and MRS for the diagnosis

of NAFLD [25, 26, 28, 29]. The sensitivity and specificity of MRI to detect $\geq 5\%$ fat in hepatocytes ranged from 77% to 90% and 87% and 91%, respectively, and the corresponding MRS performance ranged from 80 % to 91% and 80% and 87%, respectively. These methods however, present certain disadvantages, such as high costs and prolonged examination time, thus requiring the presence of the patient [30].

In recent years, there has been an increasing number of studies into clinical research applying metabonomics [31] in the investigation of different diseases, such as diabetes [32, 33], hepatitis [20, 23, 34], cancer [35-38] amongst others. However, there has been a reduction in the number of studies that investigate NAFLD employing metabonomics strategies using NMR spectroscopy.

Kalhan et al. identified biomarkers in plasma samples, which may potentially discriminate patients diagnosed with NAFLD from healthy individuals with a sensitivity of 92% [39]. These authors applied metabolomics, using liquid and gas phase chromatography associated with mass spectrometry. In experimental study, Li et al., using ^1H NMR spectroscopy analysis on the serum of C57BL/6 mice (control) and others fed with a diet deficient in methionine and choline used to induce NAFLD, observed changes in some metabolites such as glucose, lactate, glutamate / glutamine, and taurine, which suggested that these could be used for the non-invasive diagnosis of NAFLD stages in mice [40].

The present clinical study has been the first to employ a metabonomics strategy to differentiate patients with NAFLD from healthy individuals, through the analysis of urine samples by ^1H NMR spectroscopy.

In our study, discrimination of the two groups using PLS-DA was not satisfactory, but through the VIP score, the most important shifts were identified for the discrimination of groups, which agree with those observed in the subtraction of the mean spectra levels (Figure 1). The two most important classification variables are the bins at δ 3.05 ppm and 4.10 ppm,

which may be attributed to creatinine signals. Because the areas of integration under these signals are lower in the urine samples of the NAFLD group, suggesting a relative lower concentration of creatinine in this group comparing with the control group. There are reports in the literature that describe changes in serum creatinine in the presence of liver diseases. In fact, Soga et al identified changes in serum creatinine levels when investigating patients with HBV infection, liver damage induced by drugs, HCV infection with persistently normal alanine aminotransferase, cirrhosis and hepatocellular carcinoma, non-alcoholic steatohepatitis and simple steatosis [45]. Moreover, Chen et al., observed a reduction in serum creatinine in patients with HCC [46], while Cocchetto et al., reported a reduction in the production of creatinine in patients with liver disease [47].

The signals at δ 4.00, 7.45, 7.60 and 7.85 ppm, attributed to hippurate, present higher integration areas in NAFLD urine samples. Unlike our study, Calvani et al. identified that the hippurate metabolite best discriminates between those suffering with morbid obesity and insulin resistance and a thin control group, since the obese group presented lower urinary levels of hippurate [48]. Nevertheless, Van Doorn et al reported that the higher levels of hippurate content in urine is related to an altered metabolism of glucose observed in patients with type II diabetes [49]. In the preset study, we observed higher urinary levels of hippurate amongst the patients with NAFLD and these patients presented high blood levels of glucose and triglycerides [41,42].

The signal at δ 1.95 ppm is assigned to acetate, which is also more intense in the group with NAFLD. There are reports in the literature of increased level of acetate in the urine of patients with type II diabetes [50]. Indeed, in our study, the highest levels of hippurate and acetate found in the urine of 20 patients with NAFLD may be attributed to higher serum glucose levels observed within this group in comparison to the controls.

The high levels of citrate (δ 2.60 and 2.70 ppm) observed in the NAFLD group may be explained considering that this group differs from the control group in the blood levels of triglycerides, given that during triglyceride metabolism there is glycerol formation, which is metabolized to pyruvate which, in Krebs cycle, is converted to citrate [51].

Männistö Ville T et al. investigated a serum low molecular weight molecules using ^1H NMR in morbidly obese individuals observed a lower citrate level in individuals with NASH compared to both individuals, with steatosis and normal liver. They didn't find any difference in acetate and creatinine levels between the groups [52].

The signal at δ 1.20 ppm is assigned to the methyl group of 3-aminoisobutanoic acid, which appears in higher concentrations in the urine of the NAFLD group than in the control group. In contrast, Munshi et al. reported a reduction in serum levels of 3-aminoisobutanoic acid in patients with hepatitis E [34].

Finally, in this study, when comparing the metabonomic model with other diagnosis tests described in the literature, such as US, CT, MRI and *in vivo* MRS, it presented the same levels of sensitivity and specificity, and offered a number of advantages. For example, it requires neither a doctor nor the presence of a patient during the course of the analysis, there is no variability in inter- or intra-operator interpretation and it may also be applied rapidly. Additionally, it analyses any changes in the liver as a whole and not just a part, as in liver biopsy or even *in vivo* MRS.

In conclusion, analysis using ^1H NMR spectroscopy revealed the metabolites of the urine samples that may diagnose patients with nonalcoholic fatty liver disease with high accuracy and the potential for application in clinical practice. It should be noted that in the cross-validation to check the model used, the test continued to perform well.

Acknowledgements

We wish to thank the Brazilian agencies: CNPq, FACEPE, PRONEX.

REFERENCES

- [1] Torres DM, Williams CD, Harrison O SA. Features, Diagnosis, and Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2012;10:837-858.
- [2] Cheung OP, Sanyal AJ. Hepatitis C Infection and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Clin Liver Dis* 2008;12:573-+.
- [3] Vuppalanchi R, Chalasani N. Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis: Selected Practical Issues in Their Evaluation and Management. *Hepatology* 2009; 9: 06-317.
- [4] Dyson JK, Anstee QM, McPherson S. Non-alcoholic fatty liver disease: a practical approach to treatment. *Frontline gastroenterology* 2014;5:277-286.
- [5] Nascimbeni F, Pais R, Bellentani S, Day CP, Ratzliff V, Loria P, et al. From NAFLD in clinical practice to answers from guidelines. *J Hepatol* 2013;59:859-871.
- [6] Hernaez R, Lazo M, Bonekamp S, Kamel I, Brancati FL, Guallar E, et al. Diagnostic Accuracy and Reliability of Ultrasonography for the Detection of Fatty Liver: A Meta-Analysis. *Hepatology* 2011;54:1082-1090.
- [7] Lee SS, Park SH. Radiologic evaluation of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2014;20:7392-7402.
- [8] Palmentieri B, de Sio I, La Mura V, Masarone M, Vecchione R, Bruno S, et al. The role of bright liver echo pattern on ultrasound B-mode examination in the diagnosis of liver steatosis. *Digest Liver Dis* 2006;38:485-489.
- [9] Dasarthy S, Dasarthy J, Khiyami A, Joseph R, Lopez R, McCullough AJ. Validity of real time ultrasound in the diagnosis of hepatic steatosis: A prospective study. *J Hepatol* 2009;51:1061-1067.

- [10] Nicholson JK, Connelly J, Lindon JC, Holmes E. Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function. *Nat Rev Drug Disc* 2002;1:153-161.
- [11] Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica* 1999;29:1181-1189.
- [12] Lindon JC, Holmes E, Nicholson JK. So whats the deal with metabonomics? Metabonomics measures the fingerprint of biochemical perturbations caused by disease, drugs, and toxins. *Anal Chem* 2003;75:384A-391A.
- [13] Lenz EM, Bright J, Wilson ID, Hughes A, Morrisson J, Lindberg H, et al. Metabonomics, dietary influences and cultural differences: a H-1 NMR-based study of urine samples obtained from healthy British and Swedish subjects. *J Pharm Biomed Anal* 2004; 6: 41-849.
- [14] Fernie AR, Trethewey RN, Krotzky AJ, Willmitzer L. Innovation - Metabolite profiling: from diagnostics to systems biology. *Nature Rev Mol Cell Biol* 2004;5:763-769.
- [15] Coen M, Holmes E, Lindon JC, Nicholson JK. NMR-based metabolic profiling and metabonomic approaches to problems in molecular toxicology. *Chem Res Toxicol* 2008;21:9-27.
- [16] Nicholson JK, Lindon JC. Systems biology - Metabonomics. *Nature* 2008;455:1054-1056.
- [17] Holmes E, Tsang TM, Tabrizi SJ. The Application of NMR-Based Metabonomics in Neurological Disorders. *NeuroRx* 2006;3:358-372.
- [18] Zhang AH, Sun H, Wu XH, Wang XJ. Urine metabolomics. *Clin Chim Acta* 2012; 414: 5-69.
- [19] Ryan D, Robards K, Prenzler PD, Kendall M. Recent and potential developments in the analysis of urine: A review. *Anal Chim Acta* 2011;684:17-29.

- [20] Zhang AH, Sun H, Han Y, Yan GL, Wang XJ. Urinary Metabolic Biomarker and Pathway Study of Hepatitis B Virus Infected Patients Based on UPLC-MS System. *Plos One* 2013;8.
- [21] Wang XJ, Zhang AH, Han Y, Wang P, Sun H, Song GC, et al. Urine Metabolomics Analysis for Biomarker Discovery and Detection of Jaundice Syndrome in Patients With Liver Disease. *Mol Cel Proteomics* 2012;11:370-380.
- [22] Shariff MIF, Ladep NG, Cox IJ, Williams HRT, Okeke E, Malu A, et al. Characterization of Urinary Biomarkers of Hepatocellular Carcinoma Using Magnetic Resonance Spectroscopy in a Nigerian Population. *J Proteome Res* 2010;9:1096-1103.
- [23] Godoy MMG, Lopes EPA, Silva RO, Hallwass F, Koury LCA, Moura IM, et al. Hepatitis C virus infection diagnosis using metabonomics. *J Viral Hep* 2010;17:854-858.
- [24] Akarachantachote N, Chadcham S, Saithanu K. Cutoff threshold of variable importance in projection for variable selection. [Int J Pure Appl Math](#). 2014;94:307-322.
- [25] Banerjee R, Pavlides M, Tunnicliffe EM, Piechnik SK, Sarania N, Philips R, et al. Multiparametric magnetic resonance for the non-invasive diagnosis of liver disease. *J Hepatol* 2014;60:69-77.
- [26] Lee SS, Park SH, Kim HJ, Kim SY, Kim MY, Kim DY, et al. Non-invasive assessment of hepatic steatosis: Prospective comparison of the accuracy of imaging examinations. *J Hepatol* 2010;52:579-585.
- [27] Almeida AD, Cotrim HP, Barbosa DBV, de Athayde LGM, Santos AS, Bitencourt AGV, et al. Fatty liver disease in severe obese patients: Diagnostic value of abdominal ultrasound. *World J Gastroenterol* 2008;14:1415-1418.
- [28] van Werven JR, Marsman HA, Nederveen AJ, Smits NJ, ten Kate FJ, van Gulik TM, et al. Assessment of Hepatic Steatosis in Patients Undergoing Liver Resection: Comparison of

US, CT, T1-weighted Dual-Echo MR Imaging, and Point-resolved H-1 MR Spectroscopy. *Radiology* 2010; 256: 59-168.

[29] Saadeh S, Younossi ZM, Remer EM, Gramlich T, Ong JP, Hurley M, et al. The utility of radiological imaging in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2002;123:745-750.

[30] Nouredin M, Lam J, Peterson MR, Middleton M, Hamilton G, Le TA, et al. Utility of Magnetic Resonance Imaging Versus Histology for Quantifying Changes in Liver Fat in Nonalcoholic Fatty Liver Disease Trials. *Hepatology* 2013;58:1930-1940.

[31] Duarte IF, Diaz SO, Gil AM. NMR metabolomics of human blood and urine in disease research. *J Pharm Biomed Anal* 2014;93:17-26.

[32] Huynh J, Xiong G, Bentley-Lewis R. A systematic review of metabolite profiling in gestational diabetes mellitus. *Diabetologia* 2014;57:2453-2464.

[33] Suhre K, Meisinger C, Doring A, Altmaier E, Belcredi P, Gieger C, et al. Metabolic Footprint of Diabetes: A Multiplatform Metabolomics Study in an Epidemiological Setting. *Plos One* 2010;5.

[34] Munshi SU, Taneja S, Bhavesh NS, Shastri J, Aggarwal R, Jameel S. Metabonomic analysis of hepatitis E patients shows deregulated metabolic cycles and abnormalities in amino acid metabolism. *J Viral Hep* 2011;18:E591-E602.

[35] Wang XJ, Zhang AH, Sun H. Power of Metabolomics in Diagnosis and Biomarker Discovery of Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology* 2013;57:2072-2077.

[36] Cheng Y, Xie GX, Chen TL, Qiu YP, Zou X, Zheng MH, et al. Distinct Urinary Metabolic Profile of Human Colorectal Cancer. *J Proteome Res* 2012;11:1354-1363.

[37] Napoli C, Sperandio N, Lawlor RT, Scarpa A, Molinari H, Assfalg M. Urine Metabolic Signature of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma by H-1 Nuclear Magnetic Resonance: Identification, Mapping, and Evolution. *J Proteome Res* 2012;11:1274-1283.

- [38] Lee YI, Lim YS, Park HS. Colorectal neoplasms in relation to non-alcoholic fatty liver disease in Korean women: A retrospective cohort study. *J Gastroenterol Hepatol* 2012;27:91-95.
- [39] Kalhan SC, Guo LN, Edmison J, Dasarathy S, McCullough AJ, Hanson RW, et al. Plasma metabolomic profile in nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism* 2011;60:404-413.
- [40] Li H, Wang L, Yan XZ, Liu QJ, Yu CH, Wei HD, et al. A Proton Nuclear Magnetic Resonance Metabonomics Approach for Biomarker Discovery in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *J Proteome Res* 2011;10:2797-2806.
- [41] Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, Nuremberg P, Horton JD, Cohen JC, et al. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: Impact of ethnicity. *Hepatology* 2004;40:1387-1395.
- [42] Adams LA, Angulo P, Lindor KD. Nonalcoholic fatty liver disease. *CMAJ* 2005;172:899-905.
- [43] Fracanzani AL, Valenti L, Fargion S. Risk of Severe Liver Disease in NAFLD with Normal ALT Levels: A Pediatric Report Reply. *Hepatology* 2008;48:2088-2088.
- [44] Mofrad P, Contos MJ, Haque M, Sargeant C, Fisher RA, Luketic VA, et al. Clinical and histologic spectrum of nonalcoholic fatty liver disease associated with normal ALT values. *Hepatology* 2003;37:1286-1292.
- [45] Soga T, Sugimoto M, Honma M, Mori M, Igarashi K, Kashikura K, et al. Serum metabolomics reveals gamma-glutamyl dipeptides as biomarkers for discrimination among different forms of liver disease. *J Hepatol* 2011;55:896-905.
- [46] Chen TL, Xie GX, Wang XY, Fan J, Qui YP, Zheng XJ, et al. Serum and Urine Metabolite Profiling Reveals Potential Biomarkers of Human Hepatocellular Carcinoma (vol 10, pg 1, 2011). *Mol Cell Proteomics* 2011;10.

- [47] Cocchetto DM, Tschanz C, Bjornsson TD. Decreased rate of creatinine production in patients with hepatic disease - Implication for estimation of creatinine clearance. *Therap Drug Monitoring* 1983;5:161-168.
- [48] Calvani R, Miccheli A, Capuani G, Miccheli AT, Puccetti C, Delfini M, et al. Gut microbiome-derived metabolites characterize a peculiar obese urinary metabotype. *Int J Obes* 2010;34:1095-1098.
- [49] van Doorn M, Vogels J, Tas A, van Hoogdalem EJ, Burggraaf J, Cohen A, et al. Evaluation of metabolite profiles as biomarkers for the pharmacological effects of thiazolidinediones in Type 2 diabetes mellitus patients and healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol* 2007;63:562-574.
- [50] Messana I, Forni F, Ferrari F, Rossi C, Giardina B, Zuppi C. Proton nuclear magnetic resonance spectral profiles of urine in type II diabetic patients. *Clin Chem* 1998;44: 1529-1534.
- [51] Kim SH, Yang SO, Kim HS, Kim Y, Park T, Choi HK. H-1-nuclear magnetic resonance spectroscopy-based metabolic assessment in a rat model of obesity induced by a high-fat diet. *Anal Bioanal Chem* 2009;395:1117-1124.
- [52] Männistö, V. T. et al. Ketone body production is differentially altered in steatosis and non-alcoholic steatohepatitis in obese humans. *Liver International*, 2015

Table 1. The mean biochemical serum levels of the 30 subjects, of whom 20 were diagnosed with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and 10 in the control group.

Characteristics	Groups		<i>p-value</i>
	NAFLD (n=20) Mean $\pm$ SD	Control (n=10) Mean $\pm$ SD	
AST/ULN	0.76 $\pm$ 0.47	0.63 $\pm$ 0.11	0.688
ALT/ULN	0.75 $\pm$ 0.68	0.42 $\pm$ 0.19	0.109
GGT/ULN	0.81 $\pm$ 0.66	0.50 $\pm$ 0.22	0.211
GLUCOSE	120.15 $\pm$ 40.75	72.68 $\pm$ 13.14	< 0.001
TGR	231.64 $\pm$ 221.64	104.20 $\pm$ 48.22	0.008
TC	186.01 $\pm$ 51.80	198.09 $\pm$ 31.56	0.164
LDL	101.46 $\pm$ 32.08	131.22 $\pm$ 19.54	0.031
HDL	49.64 $\pm$ 21.69	56.33 $\pm$ 9.26	0.441

AST - aspartate aminotransferase; ALT - alanine aminotransferase;

TGR - triglycerides; TC - total cholesterol; HDL - high density

lipids; LDL - low density lipids; GGT - gamma-glutamyl transferase;

ULN – Upper limit of normality.

Table 2. Identification of the main discriminant metabolites, their chemical shifts and the relative urine levels in 20 patients diagnosed with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and 10 in the control group.

Metabolites	δ (ppm)	NAFLD	Control
3-aminoisobutyric acid	1.10	+	–
Acetate	1.95	+	–
Citrate	2.60 and 2.70	+	–
Creatinine	3.05, 3.10 and 4.10	–	+
Hippurate	7.45, 7.60 and 7.85	+	–

δ chemical shift; ppm parts per million

+ more concentrated in the group;

– less concentrated in the group.

Table 3. Results of the metabonomics model based on the Linear Discriminant Analysis (LDA) to discriminate the nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and Control groups.

		Groups	
		NAFLD	Control
Metabonomic Model	Positive	19	1
	Negative	1	9
Sensitivity = 95%, Specificity = 90%, Accuracy = 93,3%, p-value = 0.0038			

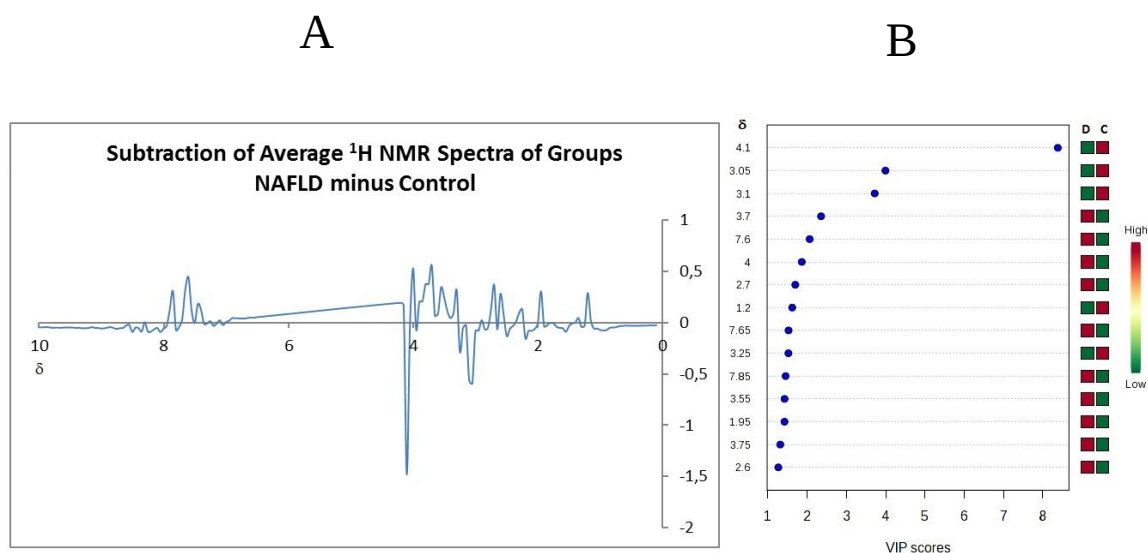


Fig. 1. Selection of variables. (A) Results of subtracting the mean ^1H NMR spectra of the urine from the nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and control groups. Negative signals imply high variable values in the control group and the positive signals indicate high variable values in the NAFLD group. (B) Importance scores of the variables for projection (VIP) obtained by PLS-DA.

D - NAFLD group; C - Control group; δ - chemical shift in ppm.

APÊNDICE D

Metabonômica aplicada às doenças hepáticas

Metabonomics applied to liver diseases

Michele Maria Gonçalves de Godoy¹, Edmundo Pessoa Lopes², Ricardo Oliveira Silva³

¹ Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical – Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

² Professor Associado do Departamento de Medicina Clínica do Centro de Ciências da Saúde da UFPE.

³ Professor Adjunto do Departamento de Química Fundamental do Centro de Ciências Exatas e da Natureza da UFPE.

Trabalho realizado no Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical – UFPE

Correspondência:

Hospital das Clínicas – Bloco A, Depto de Medicina Clínica.

Rua Prof. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária

CEP 50670-901, Recife - PE, Brasil.

E-mail: michelegodoy@oi.com.br

Resumo

A estratégia metabonômica tem atraído diversos pesquisadores, por dispor da capacidade de detectar mudanças no perfil de metabólitos das amostras biológicas analisadas, associadas com a patogênese de várias doenças. A espectroscopia de ressonância nuclear magnética é uma das principais ferramentas utilizadas para análise dessas alterações, permitindo o diagnóstico e seguimento de doenças, de forma rápida, não invasiva e reprodutível. O objetivo deste estudo foi apresentar os fundamentos da metabonômica e realizar revisão sistemática a respeito da aplicação da espectroscopia de ressonância nuclear magnética nas doenças hepáticas. Para tanto, foi realizada consulta na plataforma PubMed, no período de janeiro de 2010 a dezembro de 2014, usando os termos de busca “*metabonomic OR metabonomics OR metabolomic OR metabolomics AND liver disease*”. Foram encontrados 467 artigos e quando se restringiu a pesquisa ao uso de espectroscopia de RNM, foram identificados 80 artigos. Desses, foram selecionados apenas os 13, que aplicavam a espectroscopia de RNM em amostras de sangue ou urina para avaliação das doenças do fígado. A metabonômica tem sido empregada em praticamente todas as doenças que acometem o fígado, como as hepatites virais, a doença hepática gordurosa, as doenças auto-imunes e a doença alcoólica. Todavia, ainda há muito a ser estudado e explorado neste campo, implicando em cada vez mais interações entre profissionais de diferentes áreas, como médicos, bioquímicos, químicos e estatísticos. Enfim, a metabonômica abre grandes perspectivas diagnósticas para diversas enfermidades no futuro próximo.

Palavras-chave: Metabolômica, hepatopatias, espectroscopia de ressonância magnética.

Abstract

Metabonomics has attracted the attention of various researchers, by the ability to detect alterations in metabolite profile in biofluids samples, associated with the pathogenesis of several diseases. Nuclear magnetic resonance spectroscopy is one of the main tools used for these analyses, allowing to the diagnosis and monitoring of diseases, promptly, non-invasive and reproducible. The aim of this study was to present the fundamentals of metabonomics and perform systematic review about the application of spectroscopy of nuclear magnetic resonance in hepatic diseases. To this end, consultation was carried out on the platform PubMed, from January 2010 to December 2014, using the search terms "*metabonomic OR metabonomics OR metabolomic OR metabolomics AND liver disease*".

Therefore, were found 467 articles, and when it restricted the search to the use of NMR spectroscopy, 80 articles were identified. Of these, only 13 were selected, which applied NMR spectroscopy in blood or urine samples for evaluation of liver diseases. The metabonomics have been employed in virtually all diseases that affect the liver, such as viral hepatitis, non-alcoholic fatty liver disease, autoimmune diseases and the alcoholic disease. Nonetheless, there is still much to be studied and explored in this field, resulting in increasingly interactions between professionals from different areas, such as physicians, biochemists, chemists and statisticians. Anyway, the metabonomics opens great prospects for various diagnostic diseases in the near future.

Keywords: Metabolomics, liver diseases, magnetic resonance spectroscopy.

Introdução

O diagnóstico precoce das doenças hepáticas crônicas faz-se necessário, visto que permanecem assintomáticas por tempo prolongado, até a progressão para uma fase avançada. Diversos exames laboratoriais e de imagem para diagnóstico das doenças do fígado vêm sendo avaliados nos últimos anos.

De fato, observa-se crescente interesse na tecnologia metabonômica para diagnóstico de doenças, em função do seu potencial para detecção, identificação, quantificação e classificação das mudanças metabólicas, tempo-relacionadas, integrada ao sistema biológico, numa visão global do organismo ao invés da avaliação de células isoladamente¹. Uma das principais ferramentas utilizadas para análise dessas alterações metabólicas é a espectroscopia de Ressonância nuclear magnética (RNM), uma vez que possibilita identificar e fazer a quantificação relativa dos metabólitos em um dado biofluido.

Contudo, é necessário o emprego de ferramentas de estatística multivariada para investigar similaridades e diferenças espectrais em função do *status* bioquímico da amostra, considerando a complexidade dos espectros, que reportam centenas de componentes numa única medida, de forma simples, rápida e reprodutível.²

Em virtude do crescente número de publicações sobre metabonômica em diversas áreas médicas, o objetivo deste estudo será apresentar os fundamentos da metabonômica e realizar uma revisão bibliográfica a respeito da aplicação da espectroscopia de RNM nas doenças hepáticas nos últimos 5 anos.

Metabonômica

A metabonômica é definida como uma “medida quantitativa da resposta metabólica dinâmica e multiparamétrica dos organismos vivos às modificações fisiopatológicas ou genéticas”.¹ Envolve a determinação do perfil, dinâmico e tempo dependente, dos metabólitos dentro do organismo e como ele se altera em decorrência de algum processo biológico.³ O termo tem origem grega – “meta” significando mudança e “nomos” regras ou leis, e foi criado por Jeremy Nicholson, Elaine Holmes e John Lindon, do Imperial College of London, em 1999, para descrever a geração de modelos quimiométricos que têm capacidade para classificar as mudanças do metabolismo.⁴ É muito frequente encontrar na literatura o uso dos termos metabolômico e metabonômico como se fossem sinônimos. No entanto, há uma distinção procedimental quando se aplica uma ou outra estratégia. No emprego da

“metabolômica”, o pesquisador busca uma descrição analítica das amostras biológicas e tem por objetivo identificar e quantificar aqueles metabólitos presentes no biofluido estudado, que estejam associados à discriminação dos grupos com *status* bioquímico diferente e, portanto, com o estado de doença específico.^{5,6} No caso do emprego da estratégia “metabonômica”, a identificação de todos os metabólitos não é uma condição *sine qua non*, pois o pesquisador busca encontrar um perfil de metabólitos endógenos, presentes no analito, e associá-lo ao *status* bioquímico da amostra. Essa sutil diferença faz com que métodos analíticos diferentes sejam empregados em cada uma das estratégias. Na “metabolômica”, em função da necessidade de identificar e quantificar (concentração absoluta) os metabólitos, frequentemente utiliza-se uma técnica de separação de misturas, como cromatografia em fase gasosa ou líquida, associada a um sistema de detecção com alta sensibilidade, como a espectrometria de massas; no caso da “metabonômica”, é mais frequente o uso da espectroscopia de RNM, sem uma separação prévia dos componentes da mistura⁵. Isso faz com que, quando comparados à metabolômica, os métodos metabonômicos tenham menos intervenção do analista, diminuindo as possibilidades de erro humano, e sejam mais rápidos.

A metabonômica fundamenta-se em um princípio básico dos seres vivos chamado de homeostase. Quando um sistema vivo é exposto a situações de estresse, a uma doença ou a algum agente químico, ele responde no sentido de neutralizar a ação externa. Com isso, ocorrem mudanças na concentração e no fluxo dos metabólitos endógenos, quebrando o equilíbrio, desencadeando ajustes do ambiente intra e extracelular, de forma a manter o meio interno estável. Essa alteração no perfil dos metabólitos endógenos presentes nos biofluidos pode ser avaliada através da espectroscopia de RNM, provendo uma “impressão digital” metabólica, a qual é específica da natureza ou sítio da agressão.² Admite-se que a partir dos espectros de RNM é possível identificar e quantificar relativamente os metabólitos de baixo peso molecular presentes no biofluido.⁶⁻⁸ Além da espectroscopia de RNM, outros métodos podem ser utilizados para produzir o perfil metabólico dos biofluidos, como a espectrometria de massa por inserção direta (MS), a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC/MS), a cromatografia líquida de alta performance (HPLC) ou técnicas de espectroscopia óptica. A RNM e a MS são as melhores técnicas, na medida em que podem produzir rápida e adequadamente um conjunto de dados metabonômicos.⁹

Um fator limitante para o entendimento da informação gerada pelos espectros é a sua grande complexidade, contendo centenas de variáveis, que dificilmente poderiam ser processadas manualmente. Para sua eficiente interpretação faz-se necessário o uso de técnicas de estatística multivariada, reduzindo a dimensionalidade desse conjunto de dados, sendo

indispensáveis para a extração do máximo possível de informações. Entre as técnicas multivariadas, frequentemente empregadas com sucesso em estudos metabonômicos, estão a análise de componentes principais (PCA), análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA), análise discriminante linear (DA) e análise de classificação simples (SIMCA – Soft Independent Modelling of Class Analogy).^{8,10,11}

Os biofluidos mais frequentemente utilizados nesses estudos são a urina e o soro/plasma, obtidos de maneira não invasiva ou minimamente invasiva. Contudo, uma grande variedade de líquidos e secreções, como líquido cefalorraquiano (LCR), seminal, sinovial, amniótico, bile, aspirados pulmonares, sobrenadantes de cultura celular e até amostras de tecido também podem ser utilizados.^{4,12} Cada biofluido tem uma composição bioquímica característica e única, refletindo o estado fisiológico ou patológico do organismo e revelando as alterações metabólicas sofridas.⁹ Isso reflete o potencial da técnica e o crescimento do interesse acadêmico pela mesma.

A produção acadêmica empregando as estratégias metabonômica ou metabolômica está aumentando a cada dia, em função de seu enorme potencial na investigação do estado fisiológico, diagnóstico de doenças, descoberta de novos biomarcadores, identificação das vias metabólicas alteradas devido a doenças ou tratamentos.^{4,13,14} Dados coletados na plataforma PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>), referente ao período de janeiro de 2010 a dezembro de 2014, usando os termos de busca “*metabonomic OR metabonomics OR metabolomic OR metabolomics*”, resultou em 10.060 artigos. Quando a busca foi realizada considerando apenas os casos de doença hepática, foram apresentados 467 artigos (argumento de busca: “*metabonomic OR metabonomics OR metabolomic OR metabolomics AND liver disease*”). E quando restringimos a pesquisa ao uso de espectroscopia de RNM, foram apresentados 80 artigos (argumento de busca: “*metabonomic OR metabonomics OR metabolomic OR metabolomics AND liver disease AND NMR*”). Desses, foram selecionados apenas os que aplicavam a espectroscopia de RNM em amostras de sangue ou urina para avaliação das doenças hepáticas (Figura 1).

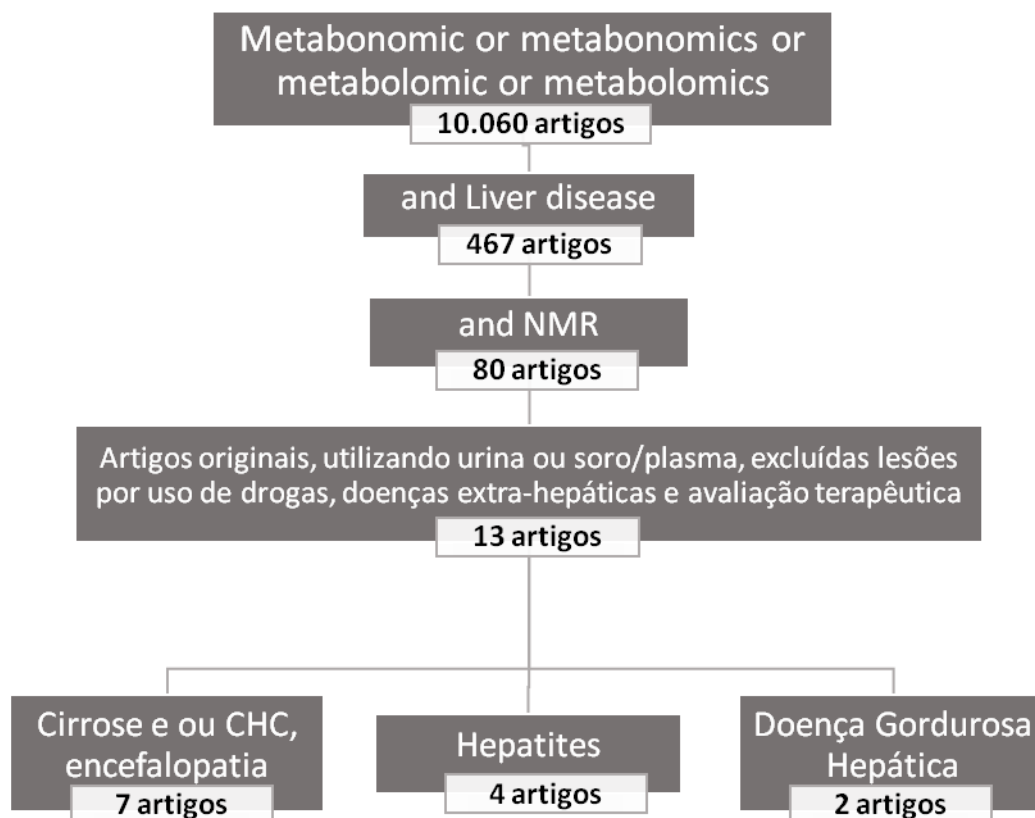


Figura 1. Fluxograma de sele  o dos artigos na pesquisa no PubMed, utilizando os termos “*metabonomic or metabolomic*”, entre janeiro de 2010 e dezembro de 2014.

Ressonância nuclear magnética de Hidrogênio-1 (RNM de ^1H)

A espectroscopia de RNM fundamenta-se na interação dos núcleos atômicos com a radiação eletromagnética, na presença de um campo magnético externo. Para que um núcleo atômico seja analisável por RNM, é necessário que ele possua spin nuclear (I) diferente de 0 (zero), ou seja, ele precisa ter número atômico e/ou número de massa ímpar. A abundância natural do isótopo de hidrogênio-1 (99,98%) e a sua frequência nos biofluidos fazem com que a RNM de ^1H seja a escolhida para gerar o perfil de metabólitos desse biofluido, em estudos que empregam a estratégia metabonômica, embora existam outros núcleos, como ^{13}C , ^{31}P e ^{15}N , que também poderiam ser utilizados.¹⁰

Na prática médica, é comum o emprego de imagens obtidas por ressonância nuclear magnética (MRI) ou da espectroscopia de ressonância magnética *in vivo* (MRS), usando campos magnéticos da ordem de 1 T, para fins de diagnóstico ou avaliação clínica. Na metabonômica, utiliza-se equipamentos com campos magnéticos acima de 7 T. Isso resulta em espectros com melhor resolução, possibilitando a identificação e quantificação relativa de diferentes metabólitos, associando-os ao *status* bioquímico da amostra.

Em princípio, todos os núcleos de um mesmo isótopo deveriam apresentar a mesma frequência de ressonância. No entanto, o ambiente químico no qual o núcleo está inserido provoca uma ligeira alteração na frequência de ressonância, que é chamado de deslocamento químico (δ), que é dependente também de outros fatores, como pH do meio, por exemplo. Na prática, o δ é expresso em ppm (partes por milhão), considerando que a frequência do núcleo é da ordem de mega-hertz (MHz) e a alteração provocada pelo ambiente químico é da ordem de hertz (Hz). Então, o espectro de RNM é apresentado de maneira tal que numa dimensão tem-se o δ e na outra a intensidade dos sinais. Com isso, salvo raras exceções, uma mesma substância apresenta diferentes sinais no espectro de RNM de ^1H , fornecendo dados acerca da estrutura química das espécies¹⁵. A intensidade do sinal está relacionada à quantidade de spins responsáveis por aquela ressonância em particular, portanto, esta intensidade é proporcional à concentração do metabólito ao qual foi atribuído. Para exemplificar, a Figura 1 apresenta espectros de RNM de ^1H (300 MHz) de amostras de urina e soro, com identificação de alguns metabólitos.

Na obtenção de espectros de RNM de amostras de biofluido alguns aspectos devem ser considerados, visando obter o máximo de informações. Via de regra, a água é o principal componente de um biofluido, implicando que o sinal atribuído à água domine o espectro (figura 1A). Para eliminar ou diminuir essa interferência, utiliza-se uma sequência de pulsos

de RF (radiofrequência) para suprimir o sinal da água. O espectro apresentado na figura 1B utiliza a sequência PRESAT, que é uma das mais utilizadas para esse fim. O pH das amostras de urina varia muito de paciente para paciente. Como o δ é função do pH do meio, esse é um fator que deve ser considerado e os espectros de urina sempre são obtidos utilizando uma solução-tampão para uniformizar o pH do meio. Como o sangue é tamponado, normalmente não há adição de solução-tampão quando o biofluido escolhido é soro ou plasma.

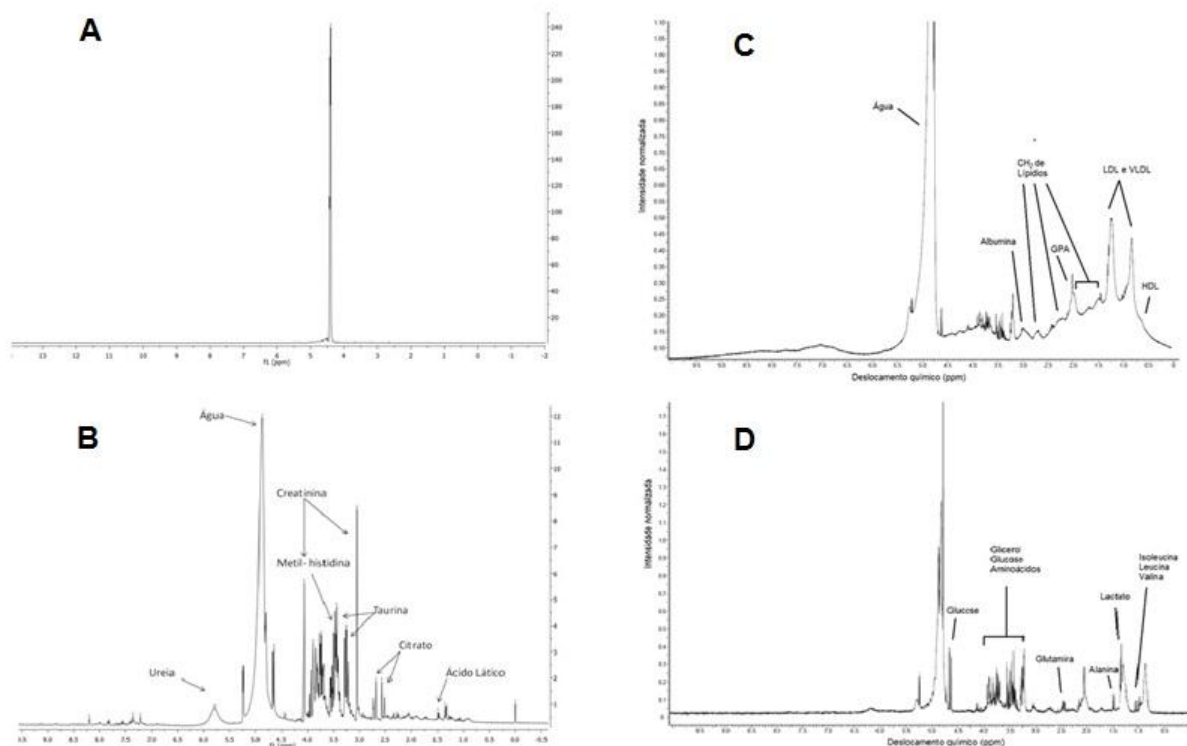


Figura 2: Espectros de RNM de ¹H (300 MHz) das amostras de urina (A) sem supressão do sinal da água; (B) amostra de urina utilizando PRESAT; (C) amostra de soro, usando apenas PRESAT; e (D) amostra de soro, associando PRESAT e um Filtro de T2 (CPMG). Alguns metabólitos estão assinalados nos espectros.

No caso de amostras de soro ou plasma, normalmente observam-se sinais alargados e intensos na região alifática (δ entre 0 e 2 ppm), dificultando a atribuição dos sinais. Isso acontece em função do alto teor de lipoproteína de baixa densidade (LDL) e lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL). Para superar essa dificuldade, normalmente utiliza-se uma sequência de pulsos de RF com Filtro de T2. Como essas espécies tem tempo de relaxação T2 menores, é possível filtrá-los, observando apenas as espécies com T2 maiores. A sequência mais comum para esse fim é a CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill). Os espectros apresentados nas figuras 1C e 1D ilustram bem essa interferência.

Apesar de a espectroscopia de RNM de ^1H ter seu papel original na elucidação das estruturas químicas, a técnica tem alcançado imenso e crescente valor em caracterizar as alterações metabólicas das doenças, toxicidades por drogas ou modificações genéticas ². A RNM é muitas vezes preferida em relação às outras ferramentas analíticas por apresentar a vantagem de constituir técnica não destrutiva, rápida, requerer pouco ou nenhum pré-tratamento, além de dispensar o uso de amostras padrões para a co-injeção e identificação dos compostos.^{3,9}

Uma grande preocupação, em relação ao uso da metabonômica em estudos clínicos, são as variações inerentes aos pacientes, quando comparadas às observadas em experimentos com animais, nos quais o pesquisador consegue controlar melhor as variáveis. Contudo, apesar da grande variação existente na população humana, em que os fatores genéticos e ambientais (incluindo dieta) são apenas minimamente controlados, amostras, tanto de urina como de plasma, podem ser utilizadas para análise metabonômica em estudos clínicos bem controlados, pois podem ser retiradas informações confiáveis dos dados espectrais, empregando ferramentas de estatística multivariada.^{1,9,15}

Em muitos casos, a inspeção visual dos espectros resulta apenas em informações pouco significativas. Dificilmente, reconhecem-se mudanças no perfil de metabólitos, por esse meio, pois as diferenças espectrais intrínsecas e a presença da variação biológica natural tornam difíceis essas avaliações.² Desta forma, o emprego de métodos estatísticos multivariados de reconhecimento de padrões é indispensável para a extração das informações de interesse.

Muitas vezes, as informações obtidas apenas com as ferramentas de reconhecimento de padrões, sem a atribuição dos sinais e o detalhamento da estrutura química dos metabólitos, podem ser suficientes para discriminar os grupos com *status* bioquímico distintos. Por outro lado, questionamentos mais avançados envolvem a identificação das substâncias no espectro, podendo servir como um “biomarcador”, diferenciando o estado patológico do normal. Sendo assim, os espectros de RNM dos biofluidos podem ser empregados para definir perfis espectrais associados a *status* bioquímicos distintos ou, indo mais além, identificando os metabólitos associados a essa discriminação, bem como a variação da concentração desses metabólitos em função da natureza da amostra.

Então, o emprego da estratégia metabonômica representa uma mudança de paradigma na análise clínica, migrando de um sistema que visa determinar o teor (concentração absoluta) de certas substâncias, biomarcadores específicos, para um sistema no qual inicialmente identificam-se perfis espectrais associados ao objeto de investigação, podendo-se identificar os metabólitos endógenos e suas concentrações relativas envolvidos nessas alterações. Assim, as mudanças no perfil dos metabólitos endógenos produzem um padrão do agente causador da

perturbação, produzindo uma “impressão digital”, bioquimicamente fundamentada, tendo significado diagnóstico ou classificatório, estabelecendo um contexto clínico ou biológico.¹²

Doenças hepáticas estudadas através da RNM de ^1H

São muitas as doenças hepáticas crônicas e muitas vezes o seu reconhecimento é realizado tardiamente, quando o paciente já se encontra com cirrose descompensada.

O fígado é o órgão de maior importância no metabolismo, uma das suas mais importantes funções. Uma agressão a ele, seja por doença, modificação genética ou toxicidade por drogas, pode desencadear mudanças mensuráveis, em termos de metabólitos. A metabonomica tem demonstrado ser uma ótima estratégia, capaz de detectar alterações metabólicas sobre diferentes processos fisiopatológicos.¹ Aplicá-la às doenças que acometem o fígado é uma opção que não pode ser negligenciada.

Nos estágios iniciais da cirrose, o fígado é capaz de compensar as alterações resultantes do desarranjo estrutural, das pontes de fibrose, e a maioria dos pacientes não apresenta sintomas. Contudo nos estágios mais avançados, com disfunção hepática grave, não mais conseguindo manter o metabolismo adequado, ocorrem complicações com descompensação da cirrose. A reserva hepática na descompensação não é capaz de compensar a perda de hepatócitos e as distorções estruturais, fazendo com que frequentemente grande parte dos pacientes perca a oportunidade de tratamento e recuperação.

Nos pacientes cirróticos, incluindo aqueles pacientes na lista de espera para transplante hepático, a avaliação do grau de insuficiência hepática é necessária para tomada de decisões, monitoração da doença, planejamento terapêutico, e avaliação prognóstica da doença. Os principais escores utilizados para essa avaliação são o Child-Turcotte-Pugh (CTP) e mais recentemente o escore MELD (Model of End Liver Disease). Este tem vantagem sobre o CTP por ser baseado em variáveis objetivas, como os níveis séricos de bilirrubina, INR, e creatinina. Já o CTP baseia-se em dados subjetivos, ou seja, graus de encefalopatia e ascite, anormalidades clínicas que não apresentam aferições aceitas internacionalmente. Amanthieu et al., em 2011, estudando pacientes com diferentes graus de insuficiência hepática avaliados pelo MELD, encontraram modificações no conteúdo de metabólitos séricos, no perfil metabolômico, correspondentes ao grau de comprometimento da função hepática. As principais vias metabólicas envolvidas nessa diferenciação foram as das lipoproteínas, glicose e aminoácidos.¹⁶ Qi et al., em 2012, além de demonstrar classificação entre os grupos de pacientes cirróticos e voluntários saudáveis, conseguiram distinguir o grupo de pacientes com

cirrose descompensada do grupo com cirrose compensada, com acurácia de 85% na validação do teste para diagnóstico, encontrando 12 metabólitos que influenciaram essa separação, sendo piruvato, fenilalanina e succinato, os de maior influência.¹⁷

A avaliação histológica das amostras de biópsia hepática é considerada o exame de referência porque permite determinação do grau de atividade da inflamação e da fibrose hepática. Entretanto, apresenta entre outras desvantagens o fato de ser invasiva, acarretando um pequeno, mas significativo, risco de complicações, induzindo a busca por biomarcadores não invasivos para esta avaliação.¹⁸ Sands, Guha e Kyriakides, analisando, através da estratégia metabonômica, o plasma de pacientes com infecção crônica pelo HCV, identificaram biomarcadores discriminantes associados com grau de fibrose hepática, estadiados pelo escore ELF e METAVIR. Observaram que o grau de fibrose mais avançado estava relacionado com níveis elevados de tirosina, fenilalanina, metionina, citrato e lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) e com baixos níveis de creatina, lipoproteína de baixa densidade (LDL), fosfatidilcolina e N-acetil α 1-ácido-glicoproteína. Apesar da área sob a curva ROC revelar elevada acurácia para classificação dos modelos, quando realizada a validação cruzada menos de 40% dos biomarcadores identificados foram validados naqueles baseados no escore METAVIR. Entretanto, nos modelos baseados no escore ELF, acima de 80% dos biomarcadores foram validados. Sugeriram que o escore ELF fornece uma avaliação mais robusta das alterações metabólicas associadas à fibrose hepática que a modelagem com o escore METAVIR.¹⁹

Segundo a OMS, o carcinoma hepatocelular (CHC) é a neoplasia maligna intra-abdominal mais frequente no mundo, sendo a segunda causa de morte relacionada a câncer, com uma taxa de sobrevida em 5 anos menor que 7%.²⁰ No momento de seu diagnóstico, grande parte dos pacientes encontra-se em fase avançada da doença, quando os tratamentos disponíveis são limitados e pouco eficazes. Portanto, a identificação precoce do CHC na população de risco, como os pacientes cirróticos, torna-se fundamental para o tratamento precoce e cura.

A alfa-feto proteína, utilizada na prática clínica para o diagnóstico precoce do tumor, apresenta baixa sensibilidade e especificidade, menores de 70%.²¹ Contudo, Liu et al. analisando amostras de soro de pacientes com CHC, cirrose hepática (CH) e indivíduos saudáveis, usando a RNM de ^1H e a cromatografia líquida associada à espectrometria de massa (LC/MS) em conjunto com a análise multivariada de Random Forest, identificaram 32 potenciais biomarcadores e a possibilidade de usá-los para o diagnóstico de CHC, obtendo 100% de sensibilidade, mesmo em pacientes com alfa-fetoproteína < 20 ng/mL. As alterações metabólicas encontradas, induzidas pelo CHC, mostraram desequilíbrio na síntese de corpos

cetônicos, ciclo do citrato, metabolismo de fosfolipídeos, esfingolipídeos, oxidação dos ácidos graxos, catabolismo de aminoácidos e metabolismo dos ácidos biliares.²²

Adicionalmente, Nahon et al. analisaram o soro de pacientes cirróticos por álcool, com e sem CHC, através da espectroscopia de RNM de ^1H e subdividiram o grupo de pacientes com CHC de acordo com os critérios de Milão. O modelo metabonômico construído discriminou os pacientes do grupo “CHC grande” (fora dos critérios de Milão) do grupo de cirróticos sem CHC. Em relação aos pacientes com CHC “pequeno”, o modelo mostrou uma distribuição heterogênea, entre as amostras de CHC grande e cirrose.²³ Shariff et al., utilizando amostras de urina, identificaram biomarcadores capazes de distinguir o grupo com CHC do grupo controle saudável e do grupo com cirrose, com sensibilidade/especificidade de 100%/93% e 89,5%/88,9%, respectivamente. Os metabólitos que mais fortemente contribuíram para essa diferenciação foram a creatinina, carnitina, creatina e acetona.²⁴

Os pacientes com cirrose também podem apresentar outras complicações, como encefalopatia hepática, distúrbio neuro-psiquiátrico abrangendo alterações na função intelectual, no nível de consciência, na função motora e de coordenação, sendo de difícil diagnóstico, principalmente no estágio inicial de seu aparecimento, com encefalopatia hepática mínima (EHM). Estudo realizado em amostras de soro de pacientes cirróticos, utilizando RNM de ^1H e subsequente análise multivariada, gerou modelo metabonômico capaz de diferenciar pacientes cirróticos com EHM do grupo de cirróticos sem EHM, com sensibilidade de 87%, especificidade de 95% e acurácia igual a 92%, sugerindo haver diferenças subjacentes nos perfis metabólicos de soro desses pacientes. Também permitiu discriminar o grupo de pacientes cirróticos dos indivíduos saudáveis com sensibilidade e acurácia de 98% e especificidade de 97%. Os autores concluíram que a metabonômica baseada na RNM de ^1H é uma ferramenta promissora para o diagnóstico da EHM, bem como para a elucidação das vias bioquímicas envolvidas na progressão da doença.²⁵

O diagnóstico da hepatite autoimune (HAI) é frequentemente confundido com outras doenças hepáticas, tais como cirrose biliar primária (CBP), hepatites virais crônicas agudizadas, lesão hepática induzida por drogas, na medida em que suas características podem também ser encontradas nestas entidades.^{26,27} O diagnóstico da HAI requer informação integrada entre ambos, clínica e laboratório, além da exclusão de outras doenças hepáticas, nem sempre de fácil realização, pois além de apresentarem sintomas semelhantes, a sobreposição sorológica pode confundir o diagnóstico, necessitando da biópsia hepática que em muitas ocasiões não pode ser realizada. Recentemente, com o objetivo de caracterizar o perfil metabólico da HAI e os potenciais biomarcadores para seu diagnóstico, Wang et al., empregando a espectroscopia

de RNM de ^1H , compararam o perfil metabolômico do plasma de pacientes com HAI, CBP, lesão hepática induzida por drogas e CBP/HAI (síndrome de sobreposição) com o grupo de indivíduos saudáveis. Evidenciaram que os pacientes com HAI exibiram níveis relativamente elevados no plasma de piruvato, lactato, acetato, acetoacetato e glicose. Como também, identificaram níveis elevados de aminoácidos aromáticos e diminuídos de aminoácidos de cadeia ramificada. Esses biomarcadores foram os principais metabólitos discriminantes capazes de distinguir HAI de outras doenças hepáticas com sensibilidade, especificidade e acurácia acima de 93%.²⁸

A hepatite também pode ser provocada por diferentes vírus apresentando diferentes desfechos. A infecção pelo vírus da hepatite A (HAV) ou pelo vírus da hepatite E (HEV) é quase sempre aguda e autolimitada, enquanto as infecções pelo vírus da hepatite B (HBV) ou pelo vírus da hepatite C (HCV) podem se tornar crônicas em seguida a fase aguda.

De fato, Munshi et al., pretendendo entender a rota metabólica envolvida na fisiopatologia da hepatite E, utilizaram a espectroscopia de RNM de ^1H para quantificar os metabólitos do plasma e da urina desses pacientes e avaliar se as alterações metabonômicas eram únicas da doença. Para isso, compararam os pacientes com infecção pelo HEV (doença) com os de infecção aguda pelo HBV (controle da doença) e voluntários saudáveis. Identificaram mudanças em vários metabólitos sugerindo que os pacientes com hepatite E, e não com hepatite B, estão mais propensos a acidose láctica e cetose.²⁹

Godoy et al. discriminaram, através de amostras de urina, pacientes com infecção crônica pelo HCV do grupo controle com sensibilidade e especificidade de 94% e 97% respectivamente através da RNM de ^1H associada a técnicas de análise multivariada.³⁰

A espectroscopia de RNM de ^1H associada à técnica de reconhecimento padrão, em amostras de soro, criou modelo que diferenciou pacientes com diagnóstico de cirrose pelo HBV dos pacientes com cirrose induzida por álcool, com identificação de cinco metabólitos, creatina, acetoacetato, isobutirato, glutamina e glutamato, como principais fatores que influenciaram a separação entre esses grupos.³¹

A doença hepática gordurosa alcoólica caracterizada pelo depósito de triglicerídeos nos hepatócitos, e desencadeada pelo consumo abusivo de álcool, apresenta um estágio inicial, a esteatose simples, reversível se parada a ingestão de bebida alcoólica, de outra forma que pode progredir para esteatohepatite (EH) e provocar cirrose. Fernando et al. estudaram as alterações no metaboloma lipídico do plasma e do fígado de 344 ratos Fisher, machos, com doença hepática gordurosa alcoólica induzida, para entender os mecanismos e padrão lipídico na fase inicial de doença. Após um mês de dieta com álcool, os ratos foram sacrificados e os

lipídeos do plasma e fígado extraídos e analisados pela RNM de ^1H e de ^{31}P . Os resultados mostram que o consumo de álcool alterou o metabolismo de colesterol, triglicerídeos e fosfolipídeos que contribuíram para o desenvolvimento da gordura hepática, também indicam que o estresse oxidativo e a inflamação precedem a doença alcoólica do fígado. Observaram que as semelhanças no perfil lipídico de metabólitos do plasma e fígado analisados pela RNM tem potencial para detectar a fase inicial de esteatose induzida por álcool.³²

Li et al., empregando a espectroscopia de RNM de ^1H na análise do soro de camundongos C57BL/6 (controles) e outros alimentados com dieta deficiente em metionina e colina, usada para induzir diferentes estágios de NAFLD, observaram alterações em alguns metabólitos, como glicose, lactato, glutamato/glutamina e taurina, sugeriram que estes poderiam ser utilizados para o diagnóstico não invasivo dos estágios da NAFLD em camundongos.³³

A tabela 1 apresenta, de forma resumida, a produção acadêmica relacionando metabonômica com doenças hepáticas nos anos de 2010 a 2014. São indicados o biofluido utilizado e os metabólitos (ou via metabólica) que sofreram alterações nos diferentes grupos estudados.

Tabela1. Sumário dos artigos que aplicaram a metabonômica no estudo de doenças hepáticas, no período compreendido entre janeiro de 2010 e dezembro de 2014.

Referência	Objeto do estudo		Biofluido	Metabólitos ou via metabólica alterada
Shariff et al., 2010	Cirrose: carcinoma hepatocelular (43 amostras)		Urina	Creatinina, carnitina, creatina e acetona
Jiménez et al., 2010	Cirrose: encefalopatia (170 amostras)		Soro	Glicose, lactato, metionina, TMAO, glicerol, colina, aminoácido de cadeia ramificada, alanina, glicina, acetato, NAC
Godoy et al., 2010	Hepatite C (66 amostras)		Urina	Não investigado
Amanthieu et al. 2011	Cirrose (124 amostras)	Menor MELD	Soro	HDL, ácido linoléico, β -hidroxibutirato, alanina, glicoproteína (N-acetil), colina e fosfocolina
		Maior MELD		Leucina, isoleucina, lactato, glutamina, metionina, piruvato, citrato, creatinina, β -glicose
Fernando et al., 2011*	Doença hepática gordurosa alcoólica (344 amostras)		Plasma e tecido hepático	Metabolismo de colesterol, triglicerídeos e fosfolipídeos
Li et al., 2011*	Doença Hepática Gordurosa não Alcoólica (60 amostras)		Soro	Glicose, lactato, glutamato/glutamina e taurina
Munshi et al., 2011	Hepatite E (89 amostras)		Plasma	L-isoleucina, acetona, glicerol e glicina
			Urina	Imidazol, ácido 3-aminoisobutanóico, 1-metilnicotinamida, biopterina, adenosina, 1-metilhistidina, ácido salicílico
Qi S et al., 2012	Hepatite B (61 Amostras)		Soro	Creatina, acetoacetato, isobutirato, glutamina e glutamato.
Qi et al.,	Cirrose: compensada		Soro	Succinato, piruvato, fenilalanina,

2012	<i>versus</i> descompensada (90 amostras)			lisina, histidina, alanina, glutamato, glutamina, creatina, LDL, VLDL e, acetona
Nahon et al., 2012	Cirrose: Carcinoma hepatocelular (tamanho do tumor - critérios de Milão) (154 amostras)	Grande CHC	Soro	Glutamato, acetato e N-acetil glicoproteína
		Cirrose		Lipídeos e glutamina
Liu et al., 2014	Cirrose: Carcinoma hepatocelular (165 amostras)		Soro	Síntese de corpos cetônicos, ciclo do citrato, metabolismo de fosfolipídeos, esfingolipídeos, oxidação dos ácidos graxos, catabolismo de aminoácidos e metabolismo dos ácidos biliares.
Wang et al., 2014	Hepatite autoimune (122 amostras)		Plasma	Piruvato, lactato, acetato, acetoacetato, glicose, aminoácidos aromáticos e aminoácidos de cadeia ramificada
Sands, Guha e Kyriakides, 2015	Cirrose: graus de fibrose (113 amostras)		Plasma	Tirosina, fenilalanina, metionina, citrato e VLDL, creatina, LDL, fosfatidilcolina e N-acetil – glicoproteína.

*Estudos experimentais.

TMAO – Óxido de trimetilamina; NAC – N- acetil cisteína; HDL – lipoproteína de alta densidade; LDL – lipoproteína de baixa densidade; VLDL – lipoproteína de muito baixa densidade; CHC – carcinoma hepatocelular; MELD – Model of End Liver Disease.

Enfim, é crescente o interesse e o desenvolvimento de métodos baseados na estratégia metabonômica para investigar e diagnosticar precocemente doenças do fígado e suas complicações. Esta ferramenta diagnóstica tem sido utilizada em praticamente todas as doenças hepáticas, como hepatites virais, a doença hepática gordurosa, doenças auto-imunes do fígado e doença hepática alcoólica. Todavia, ainda há muito a ser estudado e explorado nesta seara, implicando em cada vez mais interações entre profissionais de diferentes áreas,

como médicos, químicos, bioquímicos e estatísticos. A metabonômica abre grandes perspectivas diagnósticas no futuro próximo.

Referências Bibliográficas

1. Nicholson, J. K., Lindon, J. C. & Holmes, E. “Metabonomics”: understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica*. 1999;29:1181–9.
2. Lindon, J. C., Holmes, E. & Nicholson, J. K. So what’s the deal with metabonomics? *Anal. Chem*. 2003;75:384A–391A.
3. Nicholson, J. K., Connelly, J., Lindon, J. C. & Holmes, E. Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function. *Nat. Rev. Drug Discov*. 2002;1:153–61.
4. Zhang, A., Sun, H., Wang, P., Han, Y. & Wang, X. Recent and potential developments of biofluid analyses in metabolomics. *J. Proteomics*. 2012;75:1079–88.
5. Dunn, W. B. & Ellis, D. I. Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. *TrAC Trends Anal. Chem*. 2005;24:285–294.
6. Nicholson, J. K. & Lindon, J. C. Metabonomics. *Nature*. 2008;455:1054–1056.
7. Fernie, A. R., Trethewey, R. N. & Krotzky, A. J. Metabolite profiling: from diagnostics to systems biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2004;5:1–7.
8. Coen, M., Holmes, E., Lindon, J. C. & Nicholson, J. K. NMR-based metabolic profiling and metabonomic approaches to problems in molecular toxicology. *Chem. Res. Toxicol*. 2008;21:9–27.
9. Lenz, E. M. & Wilson, I. D. Analytical strategies in metabonomics. *J. Proteome Res*. 2007;6:443–58.
10. Keun, H. C. Metabonomic modeling of drug toxicity. *Pharmacol. Ther*. 2006;109: 92–106.
11. Lindon, J. C., Holmes, E. & Nicholson, J. K. Pattern recognition methods and applications in biomedical magnetic resonance. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc*. 2001;39:1–40.
12. Lindon, J. C., Holmes, E. & Nicholson, J. K. Metabonomics techniques and applications to pharmaceutical research & development. *Pharm. Res*. 2006;23:1075–88.
13. Bharti, S. K. & Roy, R. Quantitative ¹H NMR spectroscopy. *TrAC Trends Anal. Chem*. 2012;35:5–26.
14. Zhang, S., Nagana Gowda, G. a, Ye, T. & Raftery, D. Advances in NMR-based biofluid analysis and metabolite profiling. *Analyst*. 2010;135:1490–8.
15. Holmes, E., Tsang, T. M. & Tabrizi, S. J. The application of NMR-based metabonomics in neurological disorders. *NeuroRx*. 2006;3:358–72.

16. Amathieu, R. et al. Metabolomic approach by ¹H NMR spectroscopy of serum for the assessment of chronic liver failure in patients with cirrhosis. *J. Proteome Res.* 2011;10:3239–45.
17. Qi, S. et al. ¹H NMR-based serum metabolic profiling in compensated and decompensated cirrhosis. *World J. Gastroenterol.* 2012;18:285–290.
18. Stauber, R.-E. & Lackner, C. Noninvasive diagnosis of hepatic fibrosis in chronic hepatitis C. *World J. Gastroenterol.* 2007;13:4287–94.
19. Sands, C. J. et al. Metabolic phenotyping for enhanced mechanistic stratification of chronic hepatitis C-induced liver fibrosis. *Am. J. Gastroenterol.* 2015;110:159–69.
20. World Health Organization, International Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN 2012. (<http://globocan.iarc.fr>)
21. Furui, J., Furukawa, M. & Kanematsu, T. The low positive rate of serum alpha-fetoprotein levels in hepatitis C virus antibody-positive patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology.* 1995;42:445–9.
22. Liu, Y. et al. NMR and LC/MS-based global metabolomics to identify serum biomarkers differentiating hepatocellular carcinoma from liver cirrhosis. *Int. J. Cancer.* 2014;135:658–68.
23. Nahon, P. et al. Identification of serum proton NMR metabolomic fingerprints associated with hepatocellular carcinoma in patients with alcoholic cirrhosis. *Clin. Cancer Res.* 2012;18:6714–22.
24. Shariff, M. I. F. et al. Characterization of Urinary Biomarkers of Hepatocellular Carcinoma Using Magnetic Resonance Spectroscopy in a Nigerian Population research articles. *J. Proteome Res.* 2010;1096–1103.
25. Jiménez, B. et al. Serum metabolic signature of minimal hepatic encephalopathy by (1)H-nuclear magnetic resonance. *J. Proteome Res.* 2010;9:5180–7.
26. Zachou, K. et al. Review article: autoimmune hepatitis -- current management and challenges. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2013;38:887–913.
27. Manns, M. P. et al. Diagnosis and Management of Autoimmune Hepatitis. *Hepatology.* 2010;51:2193–213.
28. Wang, J., Pu, S., Sun, Y., Li, Z. & Niu, M. Metabolomic Profiling of Autoimmune Hepatitis: The Diagnostic Utility of Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *J. proteome.* 2014;13:3792–801.

29. Munshi, S. U. et al. Metabonomic analysis of hepatitis E patients shows deregulated metabolic cycles and abnormalities in amino acid metabolism. *J. Viral Hepat.* 2011;18:e591–602.
30. Godoy, M. M. G. et al. Hepatitis C virus infection diagnosis using metabonomics. *J. Viral Hepat.* 2010;17:854–8.
31. Qi, S. et al. Comparison of the metabolic profiling of hepatitis B virus-infected cirrhosis and alcoholic cirrhosis patients by using (1) H NMR-based metabonomics. *Hepatol. Res.* 2012;42:677–85.
32. Fernando, H. et al. ¹H and ³¹P NMR Lipidome of Ethanol-Induced Fatty Liver. *Alcohol Clin Exp Res* 2011;34:1937–47.
33. Li, H. et al. A proton nuclear magnetic resonance metabonomics approach for biomarker discovery in nonalcoholic fatty liver disease. *J. Proteome Res.* 2011;10:2797–806.

ANEXO A



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Comitê de Ética em Pesquisa

Av. da Engenharia, s/n – 1º Andar, Cid. Universitária, CEP 50740-600, Recife - PE,
Tel/fax: 81 2126 8588 - www.ufpe.br/ccs; e-mail: cepccs@ufpe.br

Of. Nº. 335/2012 - CEP/CCS

Recife, 04 de setembro de 2012

A
Profª. Michele Maria de Godoy
Hospital das Clínicas - UFPE

Registro do SISNEP FR - 448995
CAAE - 0382.0.172.000-11
Registro CEP/CCS/UFPE Nº 396/11
Título: Emprego da metabonômica no diagnóstico das doenças hepáticas em amostras de urina.
Pesquisador Responsável: Michele Maria de Godoy

Senhor (a) Pesquisador (a):

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE) registrou e analisou de acordo com a Resolução N.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, o protocolo de pesquisa em epígrafe, liberando-o para início da coleta de dados em 03 de setembro de 2012.

Ressaltamos que a aprovação definitiva do projeto será dada após a entrega do relatório final, conforme as seguintes orientações:

- a) Projetos com, no máximo, 06 (seis) meses para conclusão: o pesquisador deverá enviar apenas um relatório final;
- b) Projetos com períodos maiores de 06 (seis) meses: o pesquisador deverá enviar relatórios semestrais.

Dessa forma, o ofício de aprovação somente será entregue após a análise do relatório final.

Atenciosamente

Geraldo Bosco Lindoso Couto
Prof. Geraldo Bosco Lindoso Couto
Coordenador do CEP/CCS / UFPE

Recebi cópia em
04/02/13
Michele Godoy