



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FUNDAMENTAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Liana Ribeiro Gouveia

## **Metabonômica Aplicada ao Diagnóstico Diferencial de Doenças Hepáticas**

Recife  
2017

Liana Ribeiro Gouveia

# **Metabonômica Aplicada ao Diagnóstico Diferencial de Doenças Hepáticas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Oliveira da Silva.

Recife  
2017

Catálogo na fonte  
Bibliotecária Elaine Cristina de Freitas, CRB4-1790

G719m Gouveia, Liana Ribeiro  
Metabonômica aplicada ao diagnóstico diferencial de doenças hepáticas /  
Liana Ribeiro Gouveia – 2017.  
122 f.: fig., tab.

Orientador: Ricardo Oliveira da Silva.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCEN,  
Química Fundamental, Recife, 2017.  
Inclui referências e anexo.

1. Química Analítica. 2. Metabolômica. 3. Esteatohepatite. I. Silva, Ricardo  
Oliveira da (orientador). II. Título.

543

CDD (22. ed.)

UFPE- FQ 2017-50

**LIANA RIBEIRO GOUVEIA**

***METABONÔMICA APLICADA AO DIAGNÓSTICO  
DIFERENCIAL DE DOENÇAS HEPÁTICAS***

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação no  
Departamento de Química  
Fundamental da Universidade  
Federal de Pernambuco, como  
requisito parcial para a obtenção do  
título de Mestre em Química.

Aprovada em: 11/08/2017

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Ricardo Oliveira da Silva**  
Universidade Federal de Pernambuco  
Departamento de Química Fundamental

---

**Prof. Fernando Hallwass**  
Universidade Federal de Pernambuco  
Departamento de Química Fundamental

---

**Profa. Michele Maria Gonçalves Godoy**  
Hospital das Clínicas da  
Universidade Federal de Pernambuco

---

**Profa. Márcia Miguel Castro Ferreira**  
Instituto de Química  
Universidade Estadual de Campinas

*Dedico a Deus, pois sem Ele nada seria possível. À minha mãe, por ser meu porto seguro. E ao meu irmão, por sempre me ensinar a ser uma pessoa melhor.*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador Prof. Dr. Ricardo Oliveira pelas oportunidades concedidas, pelos ensinamentos e correções, pela paciência, pelo apoio, e, principalmente, pela confiança.

Ao Prof. Dr. Edmundo Pessoa Lopes pelas discussões sobre a parte clínica do desenvolvimento dos modelos.

Aos colegas de grupo da equipe de química, especialmente a Ronaldo Dionísio, pelas discussões e por todo o auxílio fornecido.

Aos colegas de grupo da equipe de medicina tropical, especialmente à Joelma Carvalho, pela companhia durante todo o processo, pelas indicações de livros/artigos a respeito das doenças e também pela revisão do texto sobre fígado.

Ao Laboratório da Central Analítica do Departamento de Química Fundamental e à sua equipe por ser uma parte essencial no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco pela disponibilização das amostras.

À CAPES pela bolsa de mestrado. Aos órgãos de fomento FACEPE e CNPq pelo apoio financeiro ao projeto.

## RESUMO

A estratégia metabonômica é uma ferramenta que utiliza dados analíticos, submetidos à análise estatística multivariada a fim de identificar mudanças na concentração dos metabólitos endógenos em um biofluido quando o organismo sofre alguma perturbação, como uma doença, por exemplo. A Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio-1 (RMN de  $^1\text{H}$ ) é geralmente o instrumento analítico utilizado. Para a interpretação dos dados espectrais resultantes são utilizadas ferramentas de estatística multivariada. Neste trabalho, foram construídos, a partir de amostras de soro sanguíneo de pacientes atendidos no Hospital das Clínicas da UFPE e de três hospitais privados da Região Metropolitana do Recife, modelos metabonômicos capazes de: 1) discriminar entre pacientes portadores de esteatose e portadores de esteatohepatite; e 2) discriminar pacientes monoinfectados com hepatite viral B (HBV) ou C (HCV) de pacientes coinfectados com HBV/HCV e esquistossomose mansônica. Foram construídos modelos usando os formalismos PLS-DA e OPLS-DA. Para o primeiro modelo, foram utilizadas 39 amostras, sendo obtidos valores de exatidão,  $R^2$ , sensibilidade e especificidade iguais a 81,1%, 75,0%, 71,4% e 83,3%, respectivamente. Estes resultados foram semelhantes ao do citoqueratina-18, o marcador sérico para esteatohepatite considerado mais eficiente. O segundo modelo usou 40 amostras, sendo obtidos valores de exatidão,  $R^2$  e  $Q^2$  iguais a 100%, 98,1% e 97,5%. Sendo assim, este estudo propõe que a estratégia metabonômica é uma alternativa, minimamente invasiva, para o diagnóstico diferencial de doenças hepáticas.

**Palavras-chave:** Metabolômica. RMN. Esteatohepatite. Hepatite. Esquistossomose.

## ABSTRACT

Metabonomics can be defined as a tool that associates analytical data and multivariate statistics analysis to identify changes in the concentration of endogenous metabolites in biofluids when there is a disturbance in the organism caused by a disease, for example.  $^1\text{H}$  Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy ( $^1\text{H}$ -NMR) is usually the analytical instrument used in the experiments. It is also necessary to use chemometrics techniques to extract the information of the spectra. Herein, we used blood serum samples from patients of Clinics Hospital of UFPE and from three hospitals of Recife city to built metabonomics models able to: 1) distinguish between steatosis and steatohepatitis; and 2) distinguish between monoinfected patients with viral hepatitis B (HBV) or C (HCV) and coinfecting patients with HBV/HCV and schistosomiasis. These models were built using PLS-DA and OPLS-DA formalisms. The first model contains 39 samples and achieved values of accuracy,  $R^2$ , sensitivity and specificity of 81.1%, 75.0%, 71.4% and 83.3%, respectively. This result was similar to the one obtained by cytokeratin-18, an efficient noninvasive biomarker for steatohepatitis. The second model contains 40 samples and achieved values of accuracy,  $R^2$  and  $Q^2$  equal to 100.0%, 98.1% and 97.5%, respectively. The metabonomics strategy, a minimally invasive strategy, showed potential to assess the presence of hepatic lesions.

**Keywords:** Metabolomics. NMR. Steatohepatitis. Hepatitis. Schistosomiasis.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema dos objetivos deste trabalho. ....	18
<b>Figura 2.</b> No equilíbrio, a amostra possui um vetor de magnetização total paralelo ao campo magnético aplicado. ....	23
<b>Figura 3.</b> Se o campo magnético ao longo do eixo z for substituído rapidamente por um ao longo do eixo x, a magnetização precessará em relação ao eixo x e se moverá para o plano transversal. ....	24
<b>Figura 4.</b> Ilustração da precessão de Larmor. ....	24
<b>Figura 5.</b> Ilustração da bobina no plano xy (o desenho só a mostra em uma parte do eixo x). ....	25
<b>Figura 6.</b> Ilustração da componente x do vetor de magnetização. ....	25
<b>Figura 7.</b> Ilustração da precessão do vetor de magnetização no plano xy. ....	25
<b>Figura 8.</b> Ilustração dos sinais das componentes x e y da magnetização. ....	26
<b>Figura 9.</b> Ilustração dos dois campos magnéticos $B_1++$ e $B_1--$ se unindo para formar o campo magnético que oscila ao longo do eixo x. ....	27
<b>Figura 10.</b> Ilustração do campo magnético efetivo como a soma vetorial do campo reduzido $\Delta B$ e do campo $B_1$ . ....	28
<b>Figura 11.</b> Ilustração das 3 partes de um experimento simples de RMN. ....	29
<b>Figura 12.</b> A magnetização começa ao longo do eixo $-y$ e rotaciona através de um ângulo $\Omega t$ após um tempo $t$ . ....	29
<b>Figura 13.</b> Relaxação longitudinal de $M$ para $M_0$ . ....	30
<b>Figura 14.</b> Ilustração da relaxação transversal que ocorre com a magnetização no decorrer do tempo. ....	30
<b>Figura 15.</b> Ilustração da relação entre $T_1$ e $T_2$ para moléculas pequenas. ....	31
<b>Figura 16.</b> A transformada de Fourier é uma operação matemática que transforma uma função dependente do tempo – como o FID – em uma função dependente da frequência – como o espectro. ....	31
<b>Figura 17.</b> Ilustração da blindagem diamagnética do núcleo pelos elétrons circulando ao seu redor. ....	32
<b>Figura 18.</b> Deslocamentos químicos no espectro de RMN de $^1H$ dos tipos mais comuns de funções orgânicas. ....	33
<b>Figura 19.</b> Ilustrações das estruturas de Lewis do a) tetrametilsilano (TMS) e do b) ácido 3-trimetilsilil propiônico (TSP). ....	34
<b>Figura 20.</b> Exemplo de espectro de RMN bidimensional. ....	35
<b>Figura 21.</b> Ilustração da sequência de pulsos de RF utilizada para supressão do sinal da água. ....	37
<b>Figura 22.</b> Sequência de pulsos CPMG. ....	37
<b>Figura 23.</b> Ilustração do comportamento do vetor de magnetização durante a sequência de pulsos CPMG. ....	38
<b>Figura 24.</b> Interdisciplinaridade da quimiometria. ....	40
<b>Figura 25.</b> Rotação das variáveis originais para obtenção das componentes principais. ....	46
<b>Figura 26.</b> Ilustração gráfica do escore de uma amostra. ....	47
<b>Figura 27.</b> Ilustração gráfica do peso de uma variável. ....	47
<b>Figura 28.</b> Representação esquemática das matrizes presentes na PCA. ....	47
<b>Figura 29.</b> Ilustração das matrizes X e Y da PLS-DA. ....	48
<b>Figura 30.</b> Demonstração das principais diferenças entre a) PLS-DA e b) OPLS-DA. ....	50
<b>Figura 31.</b> Tabela de contingência dos resultados de uma classificação. ....	52

<b>Figura 32.</b> Face diafragmática do fígado. ....	54
<b>Figura 33.</b> Ilustração dos lóbulos hepáticos do fígado. ....	55
<b>Figura 34.</b> Fluxos migratórios da esquistossomose e distribuição dos hospedeiros intermediários do <i>Schistosoma mansoni</i> no Brasil. ....	58
<b>Figura 35.</b> Distribuição da esquistossomose, de acordo com a faixa de positividade, por município brasileiro entre 2010 e 2015. ....	59
<b>Figura 36.</b> Ciclo de vida do <i>Schistosoma</i> . ....	60
<b>Figura 37.</b> Possíveis evoluções da infecção por HBV em adultos. ....	62
<b>Figura 38.</b> Mudanças no fígado pela fibrose após doença hepática crônica. ....	70
<b>Figura 39.</b> Matriz de bins para construção dos modelos metabonômicos, onde E é esteatose e EH é esteatohepatite. ....	73
<b>Figura 40.</b> Espectro de RMN (300 MHz) de $^1\text{H}$ de soro sanguíneo após as sequências de pulsos PRESAT e CPMG. ....	75
<b>Figura 41.</b> Comparação das figuras de mérito do modelo proposto por Shen et al (2012) com o estudo piloto que estamos propondo. ....	76
<b>Figura 42.</b> Estrutura química dos principais candidatos a biomarcadores para o diagnóstico diferencial de esteatose e esteatohepatite. Em destaque, o deslocamento químico. a) lactato; b) glutamato; c) creatinina; d) glicose e e) taurina. ....	78
<b>Figura 43.</b> Resultados da OPLS-DA. a) Escores discriminando entre os pacientes com esteatose e os com esteatohepatite; b) Gráfico de pesos (loadings) da primeira variável latente. ....	78
<b>Figura 44.</b> Gráfico obtido a partir do vetor de regressão do modelo OPLS-DA. ....	79
<b>Figura 45.</b> Matriz de bins para construção dos modelos metabonômicos, onde V é o grupo mono-infectado e VE é o grupo coinfetado. ....	83
<b>Figura 46.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (300 MHz) de uma amostra de soro sanguíneo após aplicação das sequências de pulsos PRESAT e CPMG. ....	86
<b>Figura 47.</b> Resultados da PCA. a) Escores das 2 primeiras componentes (PC1 e PC2) da PCA dos pacientes coinfetados e dos pacientes monoinfectados; (b) Gráfico dos pesos (loadings) das 2 primeiras componentes da PCA. ....	86
<b>Figura 48.</b> Resultados da PLS-DA. a) Escores discriminando entre os pacientes monoinfectados e os coinfetados; b) O número ideal de componentes da PLS-DA de acordo com o $R^2$ , o $Q^2$ e a acurácia do modelo. ....	87
<b>Figura 49.</b> Resultados da PLS-DA. a) Escores VIP utilizando duas componentes. Os quadrados posicionados à direita representam a importância dos bins em cada grupo (monoinfectados e coinfetados); b) Teste de permutação envolvendo 2000 permutações com $p < 0,0005$ . ....	88
<b>Figura 50.</b> Gráfico obtido a partir do vetor de regressão do modelo PLS-DA. ....	88
<b>Figura 51.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (PRESAT-CPMG, 300 MHz) do soro, com atribuição dos sinais responsáveis pela separação entre os grupos. ....	89

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Alguns núcleos importantes para a RMN.....	22
<b>Tabela 2.</b> Níveis séricos das enzimas hepáticas, ferritina, glicose e insulina dos pacientes com esteatose (n=31) e esteatohepatite (n=8).....	74
<b>Tabela 3.</b> Tabela de contingência para o modelo esteatose versus esteatohepatite. ...	75
<b>Tabela 4.</b> Possíveis metabólitos responsáveis pela discriminação entre os grupos. ...	79
<b>Tabela 5.</b> Características clínicas e laboratoriais dos grupos de coinfectados (n=18) e monoinfectados (n=22).....	84

## LISTA DE ABREVIATURAS

ALP	Fosfatase alcalina
ALT	Alanina aminotransferase
APRI	APRI, do inglês, <i>Aspartate aminotransferase Platelet Radio Index</i>
AST	Aspartato aminotransferase
CHC	Carcinoma hepatocelular
CPMG	Sequência de pulsos Carr-Pucell-Meiboom-Gill
DHGNA	Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DQF	Departamento de Química Fundamental
ELISA	Ensaio imunoenzimático
FID	Decaimento livre de indução, do inglês, <i>Free-Induction decay</i>
GGT	Gama-glutamil transferase
HBV	Vírus da hepatite B
HCV	Vírus da hepatite C
HDL	Lipoproteínas de alta densidade, do inglês, <i>high density lipoproteins</i>
INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade, do inglês, <i>low density lipoproteins</i>
LOOCV	Validação cruzada total, do inglês, <i>Leave-one-out cross validation</i>
LV	Variável latente, do inglês, <i>Latent Variable</i>
MATLAB	MATLAB, do inglês, <i>MATrix LABoratory</i>
MRI	Imagem por Ressonância Magnética, do inglês, <i>Magnetic Resonance Imaging</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPLS-DA	OPLS-DA, do inglês, <i>Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis</i>
OSC	OSC, do inglês, <i>Orthogonal Signal Correction</i>
PC	Componente Principal, do inglês, <i>Principal Component</i>
PCA	Análise de componentes principais, do inglês, <i>Principal Component Analysis</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase, do inglês, <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PLS	Mínimos quadrados parciais
PLS-DA	Análise discriminante por mínimos quadrados parciais
PRESAT	Sequência de pulsos para saturação do sinal da água
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNA	Ácido ribonucleico
SNV	Do inglês, <i>Standard Normal Variate</i>
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TMS	Tetrametilsilano
TPS	Ácido 3-trimetilsililpropiónico
US	Ultrassonografia
VIP	Do inglês, <i>Variance Importance in Projection</i>
VPN	Valor preditivo negativo
VPP	Valor preditivo positivo

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	15
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS GERAIS</b>	18
<b>3</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b>	19
<b>3.1</b>	<b>Metabonômica</b>	19
<b>3.2</b>	<b>Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear</b>	21
3.2.1	Princípios Básicos	21
3.2.2	PRESAT	36
3.2.3	CPMG	37
<b>3.3</b>	<b>Quimiometria</b>	40
3.3.1	Pré-processamento dos dados	43
3.3.2	Análise de Componentes Principais	45
3.3.3	Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais	48
3.3.4	Figuras de Mérito	51
<b>3.4</b>	<b>Fígado</b>	54
3.4.1	Esquistossomose	57
3.4.2	Hepatites B e C	61
3.4.3	Coinfecção Esquistossomose e Hepatites Virais B e C	66
3.4.4	Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica	66
3.4.5	Fibrose Hepática	69
<b>4</b>	<b>DISCRIMINAÇÃO ENTRE ESTEATOSE E ESTEATOHEPATITE</b>	72
<b>4.1</b>	<b>Objetivos Específicos</b>	72
<b>4.2</b>	<b>Metodologia</b>	72
4.2.1	Amostras	72
4.2.2	Aquisição dos espectros de RMN de <sup>1</sup> H	73
4.2.3	Análise estatística multivariada	74
<b>4.3</b>	<b>Resultados e Discussão</b>	74
<b>4.4</b>	<b>Conclusão</b>	80
<b>4.5</b>	<b>Perspectivas</b>	80
<b>5</b>	<b>DIAGNÓSTICO DE ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA</b>	81
<b>5.1</b>	<b>Objetivos Específicos</b>	81
<b>5.2</b>	<b>Metodologia</b>	81
5.2.1	Características dos Pacientes	81
5.2.2	Coleta das amostras e análise laboratorial	82
5.2.3	Análise estatística univariada	82

5.2.4	Aquisição dos espectros de RMN de $^1\text{H}$ .....	82
5.2.5	Análise estatística multivariada .....	83
<b>5.3</b>	<b>Resultados e Discussão.....</b>	<b>84</b>
<b>5.4</b>	<b>Conclusão .....</b>	<b>91</b>
<b>5.5</b>	<b>Perspectivas.....</b>	<b>91</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>93</b>
<b>7</b>	<b>PERSPECTIVAS GERAIS .....</b>	<b>93</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>94</b>
	<b>ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA PARA PROJETO DE DISCRIMINAÇÃO ENTRE ESTEATOSE E ESTEATOHEPATITE.....</b>	<b>105</b>
	<b>ANEXO B – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA PARA PROJETO DE DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE COINFECÇÃO DE HBV/HCV COM ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA .....</b>	<b>108</b>
	<b>ANEXO C – ARTIGO PUBLICADO .....</b>	<b>113</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O direito à saúde, por estar interligado ao direito à vida e à existência digna, representa um dos fundamentos da República Federativa do Brasil, sendo plenamente assegurado pela Constituição Federal de 1988. *In verbis*:

*“Art. 196. A saúde é direito de todos e dever do Estado, garantido mediante políticas sociais e econômicas que visem à redução dos riscos de doença e de outros agravos e o acesso universal e igualitário às ações e serviços para sua promoção, proteção e recuperação.”*

Entretanto, os serviços de saúde prestados, seja pelo estado ou pela iniciativa privada, muitas vezes não satisfazem as necessidades da população. É comum haver reclamações devido à demora no atendimento, longas filas de espera, serviços de baixa qualidade, instalações precárias, falta de humanização, falta de profissionais especializados, deficiência de recursos físicos e materiais, entre outros motivos. (Lima et al. 2014)

Em muitos casos, a espera demorada para conseguir atendimento dificulta um diagnóstico precoce de doenças que rapidamente podem evoluir para um estado clínico grave, podendo levar à morte. Por exemplo, o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) atribui a taxa de mortalidade do câncer de colo de útero ao diagnóstico em estágios avançados da doença, algo que acontece devido à dificuldade de acesso da população aos serviços e programas de saúde. (Panobianco et al. 2012)

A dificuldade de diagnosticar rapidamente numerosas doenças não é algo que acontece apenas no Brasil. Esta incapacidade está mais presente nos países em desenvolvimento em comparação aos já desenvolvidos, devido a inúmeros fatores, entre eles a falta de infraestrutura dos laboratórios e a falta de pessoal qualificado para atender às demandas da população. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a maioria dos casos clínicos pode ser solucionada em um primeiro atendimento se ele for rápido e eficiente, pois quando isso não acontece, eles evoluem para casos mais complicados. Sendo assim, os países desenvolvidos investem mais no atendimento primário do que os países em desenvolvimento, o que acarreta em uma melhoria na saúde da população do primeiro grupo de países. (Sharma et al. 2015; Walt 2004)

Uma situação ideal seria o paciente chegar ao hospital e a partir de exames de rotina, como sangue e urina, serem realizados testes de *screening* de diversas doenças. Assim, dependendo do resultado, o paciente seria encaminhado ao médico especialista para fazer os exames necessários para a confirmação do diagnóstico. Apesar de isso parecer uma situação hipotética, através do desenvolvimento das tecnologias ômicas, incluindo a metabonômica, isso tem se tornado cada vez mais próximo da realidade.

As doenças hepáticas, por exemplo, são problemas mundiais de saúde pública que necessitam de marcadores específicos de diagnóstico clínico, e os diagnósticos possuem alta subjetividade, imprecisão e limitação. Com o desenvolvimento da metabonômica, o campo de pesquisa das doenças hepáticas se tornou bastante atraente e cada vez mais estudos vêm sendo realizados a fim de utilizar a metabonômica para auxiliar no diagnóstico dessas doenças. (Yu et al. 2017)

Em 2010, Godoy e colaboradores construíram um modelo metabonômico baseado em RMN de  $^1\text{H}$  capaz de diagnosticar a hepatite C a partir de amostras de urina dos pacientes. Esse modelo obteve 94% de sensibilidade e 97% de especificidade. (Godoy et al. 2010) Um estudo publicado em 2015 mostra que, através da metabonômica baseada em RMN de  $^1\text{H}$  de amostras de urina, é possível diagnosticar depressão em pacientes com hepatite B, com sensibilidade de 82,1% e especificidade de 90,7%. (Hou et al. 2015)

Em 2016, Hou Q *et al.* publicaram um artigo de revisão que inclui 11 estudos metabonômicos envolvendo soro e urina de pacientes com hepatite B para analisar a possibilidade desses pacientes desenvolverem hepatite B crônica, cirrose e carcinoma hepatocelular. Esses estudos mostraram que existem diferenças metabólicas significativas entre as doenças relacionadas com a hepatite B, o que torna possível detectar e elucidar os marcadores específicos dessas doenças, proporcionando assim um diagnóstico precoce. (Hou & Duan 2016)

Além das doenças hepáticas, a metabonômica também é utilizada para o diagnóstico de outras doenças, como doença de Parkinson (Öhman & Forsgren 2015), câncer de tireóide (Tian et al. 2015), diabetes tipo 2 (Yang et al. 2004), doença pulmonar obstrutiva crônica (Wang et al. 2013), doença de



Crohn (Fathi et al. 2013), câncer urológico (Araújo et al. 2017), entre outras. Em todos esses estudos, é enfatizado o potencial que a metabonômica possui para auxiliar os médicos na obtenção de um diagnóstico precoce a partir de estratégias não invasivas e de rotina, como coleta de sangue e/ou urina.

O câncer é uma doença que quanto mais cedo for diagnosticada, maior a chance de o paciente ter sucesso no tratamento. Portanto, a metabonômica também tem sido estudada para diagnosticar vários tipos de câncer. Em 2008, Frickenschmidt *et al.* publicaram um estudo metabonômico onde examinaram amostras de urina de pacientes com câncer de mama e de voluntários saudáveis, obtendo sensibilidade e especificidade de 87,67% e 89,90%, respectivamente. (Frickenschmidt et al. 2008) Um estudo piloto visando o diagnóstico de câncer urológico pela metabonômica foi publicado em 2017, onde a partir de amostras de urina foram obtidas sensibilidade e especificidade de 90,9% e 100%, respectivamente. (Araújo et al. 2017) Além desses dois tipos de câncer, também foram construídos modelos metabonômicos para os diagnósticos de câncer no ovário (Garcia et al. 2012), câncer colorretal (Ni et al. 2014), câncer de pulmão (Yang et al. 2010), entre outros.

O potencial da metabonômica tem sido estudado não somente para o diagnóstico de doenças, como também na área farmacêutica. Pode-se citar como exemplo o estudo de antidepressivos realizado por Jia *et al.*, onde o objetivo foi descobrir os componentes químicos que contribuem para o efeito antidepressivo de tradicionais remédios chineses (Jia et al. 2013). Além disso, a indústria alimentícia também tem utilizado a metabonômica, onde temos como exemplos a identificação de grãos de soja submetidos à radiação gama (Ribeiro et al. 2014), e a discriminação entre vinhos do tipo tinto provenientes de uvas orgânicas e biodinâmicas (Laghi et al. 2014).

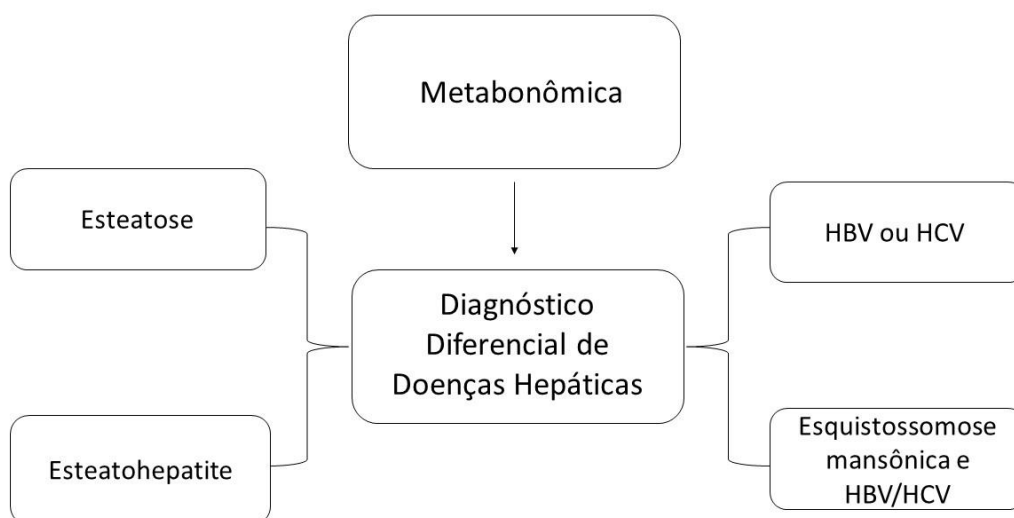
## 2 OBJETIVOS GERAIS

Os objetivos deste trabalho foram construir modelos metabonômicos a partir de amostras de soro sanguíneo que sejam capazes de:

- 1) Diferenciar entre os seguintes grupos:
  - a. Pacientes portadores de esteatose;
  - b. Pacientes portadores de esteatohepatite.
- 2) Diferenciar entre os seguintes grupos:
  - a. Pacientes monoinfectados com hepatite viral B ou C;
  - b. Pacientes coinfectados com esquistossomose mansônica e hepatite viral B ou C.

A Figura 1 ilustra esquematicamente os objetivos deste trabalho. É importante ressaltar que as doenças hepáticas não se restringem apenas às apresentadas na Figura 1. Nesta figura foram apresentadas apenas as doenças de interesse deste estudo.

**Figura 1.** Esquema dos objetivos deste trabalho.



Autoria própria.

### **3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

Este estudo tem um caráter multidisciplinar, sendo de interesse de profissionais da Química, mas também de médicos, biomédicos, biólogos, entre outros. Sendo assim, a Fundamentação Teórica está estruturada de forma que os conceitos, as ferramentas e os objetos de estudo envolvidos sejam apresentados de maneira clara, concisa e acessível aos profissionais dos diferentes campos do conhecimento. Apesar de alguns conceitos utilizados neste estudo estarem bastante difundidos na literatura (especialmente RMN), como se trata de um trabalho multidisciplinar, eles foram detalhados a fim de que uma pessoa que está iniciando os estudos sobre esses assuntos possa entender de uma forma clara.

#### **3.1 Metabonômica**

É comum o uso dos termos metabonômica e metabolômica como sinônimos, gerando certa confusão entre aqueles que pretendem estudar o tema. Sendo assim, antes de iniciar a discussão sobre a metabonômica, é importante esclarecer isso. A questão é que, por definição, são estratégias diferentes. A metabonômica é definida como “a medida quantitativa da resposta metabólica multiparamétrica dinâmica de sistemas vivos a estímulos fisiopatológicos ou modificação genética” (Nicholson et al. 1999). Este termo foi proposto por Jeremy Nicholson, Elaine Holmes e John Lindon, a partir das raízes gregas “meta” (alteração) e “nomos” (regras ou leis) em referência aos modelos quimiométricos capazes de classificar as mudanças no metabolismo. A parte “ômica” significa uma abordagem capaz de gerar um conjunto de dados de tudo que está sendo medido, seja transcrições (transcriptômica), proteínas (proteômica), ou metabólitos (metabonômica). A origem do termo metabolômica, por sua vez, é misteriosa. O conceito de metaboloma só foi utilizado rotineiramente em publicações a partir do final dos anos 90. Fiehn, em 2001, indicou o termo metabolômica como sendo “uma análise abrangente e quantitativa de todos os metabólitos...”. (Fiehn 2001; Robertson 2005)

Sendo assim, enquanto a metabolômica visa identificar e quantificar os metabólitos endógenos que sofrem mudanças em suas concentrações após interferência de agentes externos (Keun 2006), a metabonômica busca o perfil

sistemático dos metabólitos presentes nos biofluidos e tecidos de organismos e suas mudanças temporais causadas por diversos fatores, como tratamento médico, nutrição, estilo de vida, efeitos genéticos ou doenças (Walker 2011; Ribeiro et al. 2014; Godoy et al. 2010). Neste estudo, o enfoque foi especificamente a estratégia metabonômica.

A metabonômica é reconhecida como a mais nova das tecnologias “ômicas”. Isto acontece porque o interesse no perfil sistemático dos metabólitos só cresceu largamente durante a última década. (Walker 2011) A fim de obter dados confiáveis e válidos, é importante usar técnicas com alta sensibilidade e especificidade, que sejam capazes de detectar a maioria dos metabólitos em uma determinada amostra biológica, e também de proporcionar alta reprodutibilidade, de preferência a baixo custo. Nenhuma das ferramentas analíticas disponíveis atualmente possui todas essas características, mas a Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear e a Espectrometria de Massa acoplada à cromatografia gasosa, cromatografia líquida ou eletroforese capilar aproximam-se dessas características ideais e são as técnicas mais amplamente aplicadas. (Editor & Walker 2015)

A espectroscopia de RMN é bastante utilizada pela metabonômica, e essa parceria tornou-se uma ferramenta bastante útil para diagnósticos clínicos. A espectrometria de massa, por sua vez, é utilizada tradicionalmente pela estratégia metabolômica. (Keun 2006) Isso acontece porque há diferenças consideráveis entre as duas técnicas analíticas: a espectroscopia de RMN é não destrutiva, não seletiva, rápida e exige intervenções mínimas na preparação da amostra, adequando-se melhor à estratégia metabonômica; por outro lado, a espectrometria de massa é muito mais sensível e normalmente está associada a uma técnica cromatográfica, sendo essa associação indicada para o isolamento, a identificação e a quantificação dos metabólitos, como requer a estratégia metabolômica. (Goldsmith et al. 2010)

O tratamento dos dados espectrais é feito frequentemente por técnicas quimiométricas, pois elas são capazes de identificar padrões e classificar as amostras. Sendo assim, é possível observar as diferenças entre as amostras de pacientes saudáveis e pacientes doentes ou entre pacientes com diferentes tipos de doenças. (Jian-fei et al. 2009)

As próximas sessões abordarão os princípios da espectroscopia de ressonância magnética nuclear e de quimiometria, para que seja possível uma melhor compreensão da estratégia metabonômica. Além disso, haverá uma sessão sobre fígado e as doenças hepáticas envolvidas nesse estudo.

### 3.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

#### 3.2.1 Princípios Básicos

A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear é uma técnica baseada na interação entre a radiação eletromagnética e a matéria, sendo isso a definição de uma técnica espectroscópica. (Ross et al. 2007) O fenômeno de RMN foi descoberto em 1946 por Purcell e Bloch (Mlynarik 2016), e desde então se tornou uma ferramenta de análise bastante útil para a ciência (Ross et al. 2007).

Essa ferramenta baseia-se na interação entre os momentos magnéticos dos núcleos de vários átomos e um campo magnético externo. O momento magnético dos núcleos está associado a um *spin* nuclear ( $I$ ). Quando o núcleo atômico tem um número par de prótons e nêutrons,  $I$  é igual a zero; quando há um número ímpar de prótons ou nêutrons,  $I$  é diferente de zero e, dessa forma, o núcleo possui um momento magnético  $\mu$  (Equação 1) proporcional ao spin e à constante magnetogírica ( $\gamma$ ), uma constante física característica de cada núcleo que é definida como a razão entre o momento magnético nuclear e o seu momento angular. (Mlynarik 2016)

Equação 1. 
$$\mu = \frac{hI\gamma}{2\pi}$$

onde  $h$  é a constante de Planck.

Há  $2I + 1$  estados de *spin* permitidos com diferenças inteiras que vão de  $+I$  a  $-I$ . Portanto, se o  $I$  for igual a zero, apenas um estado é permitido e não é possível falar em espectroscopia nesse caso. A Tabela 1 apresenta alguns núcleos importantes para a RMN, assim como os seus respectivos números quânticos de *spin* e suas abundâncias isotópicas. (Mlynarik 2016)

**Tabela 1.** Alguns núcleos importantes para a RMN.

Núcleo	$^1\text{H}$	$^2\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^{15}\text{N}$	$^{17}\text{O}$	$^{19}\text{F}$	$^{31}\text{P}$	$^{23}\text{Na}$
$I$	1/2	1	1/2	1/2	5/2	1/2	1/2	3/2
Abund	99,9%	0,015%	1,1%	0,37%	0,04%	100%	100%	100%

Fonte: (Veeman 1997).

Na espectroscopia de RMN, os núcleos são submetidos a um campo magnético externo homogêneo denominado  $B_0$ , e se  $I$  for igual a 1/2, por exemplo, dois estados de *spin* são observados, normalmente identificados por  $\alpha$  e  $\beta$ . Um desses estados está paralelo ao campo magnético  $B_0$  e o outro tem uma orientação antiparalela em relação ao campo magnético  $B_0$ . Esses dois estados têm energias diferentes, sendo o de menor energia o que está paralelo ao campo magnético externo. É importante ressaltar que os núcleos não estão restritos aos estados  $\alpha$  e  $\beta$ , podendo estar em uma combinação desses estados. (Keeler 2002; Mlynarik 2016)

A diferença de energia entre os estados de spin possíveis é dependente do campo externo aplicado,  $B_0$ . Quanto maior a força do campo magnético, maior é a diferença de energia entre os estados de spin.

Equação 2 
$$\Delta E \sim B_0$$

A relação entre a diferença de energia e a constante magnetogírica é

Equação 3 
$$\Delta E = \gamma \frac{h}{2\pi} B_0 = h\nu$$

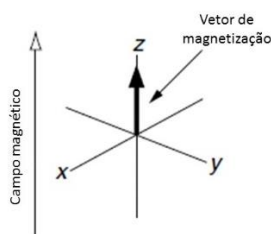
Em um experimento de RMN, não se observa apenas um núcleo, mas sim um enorme número deles, podendo chegar a  $10^{20}$ . Se o momento magnético de todos esses núcleos apontarem em direções aleatórias, inevitavelmente um cancelará o outro; entretanto, o que se observa no equilíbrio é uma organização tal que há uma magnetização paralela à direção do campo magnético aplicado  $B_0$ . (Keeler 2002)

A ideia por trás da espectroscopia de RMN baseia-se no seguinte: quando é aplicado um pulso de radiofrequência (RF) cuja energia corresponde à diferença de energia entre os estados de spin  $\alpha$  e  $\beta$ , ocorre a transição do núcleo no estado de spin  $\alpha$  para o estado de spin  $\beta$ . Ao retornarem aos seus estados de origem, os núcleos emitem sinais eletromagnéticos cuja frequência depende da diferença de energia entre os estados de spin. Esses sinais são detectados pelo espectrômetro de RMN e são apresentados como um registro

da frequência do sinal *versus* sua intensidade, o espectro de RMN. A seguir, será explicado detalhadamente todo o processo que ocorre para que seja possível a obtenção de um espectro de RMN.

A magnetização de todos os núcleos pode ser representada por um vetor - chamado de vetor de magnetização - que é a soma vetorial de todos os momentos magnéticos individuais e aponta na direção do campo magnético aplicado (por convenção, eixo z), como mostra a Figura 2. (Keeler 2002)

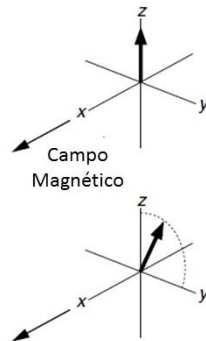
**Figura 2.** No equilíbrio, a amostra possui um vetor de magnetização total paralelo ao campo magnético aplicado.



Fonte: Adaptado (Keeler 2002).

A aplicação do pulso de radiofrequência ao sistema resulta em uma corrente que cria um campo magnético oscilante ao longo do eixo x. Este campo magnético oscila em uma frequência próxima ou igual à frequência de Larmor, ou seja, é ressonante com essa frequência. A frequência de Larmor depende da constante magnetogírica do núcleo, do deslocamento químico e do campo magnético aplicado  $B_0$ . Isso é capaz de transferir a rotação do vetor de magnetização para um pouco longe do eixo z, mesmo na presença de um campo magnético aplicado muito forte ( $B_0$ ) (Figura 3), e isso é chamado de “Efeito Zeeman”, porque foi descoberto pelo físico holandês Peter Zeeman em 1897. (Keeler 2002)

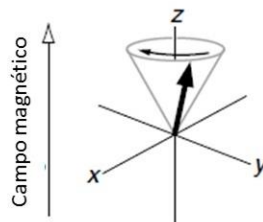
**Figura 3.** Se o campo magnético ao longo do eixo z for substituído rapidamente por um ao longo do eixo x, a magnetização precessará em relação ao eixo x e se moverá para o plano transversal.



Fonte: Adaptado (Keeler 2002).

Uma vez que o vetor de magnetização é afastado do eixo z, o seu movimento de rotação agora é no formato de um cone com um ângulo constante (Figura 4). Esse movimento é chamado de precessão de Larmor. (Keeler 2002)

**Figura 4.** Ilustração da precessão de Larmor.



Fonte: Adaptado (Keeler 2002).

Se o campo magnético é  $B_0$ , a frequência da precessão de Larmor é  $\omega_0$  (em rad/s):

Equação 4 
$$\omega_0 = \gamma B_0$$

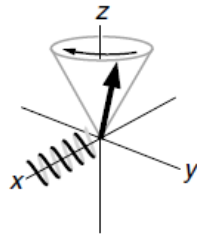
ou se a frequência for em Hz

Equação 5 
$$\nu_0 = \frac{1}{2\pi} \gamma B_0 \quad (\text{Keeler 2002}).$$

Em um experimento de RMN, o que é detectado é a precessão do vetor de magnetização. Tudo que precisa ser feito é colocar uma bobina ao redor da amostra com o eixo da bobina alinhado no plano xy (Figura 5). (Keeler 2002)



**Figura 5.** Ilustração da bobina no plano xy (o desenho só a mostra em uma parte do eixo x).

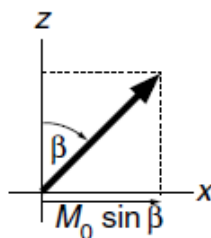


Fonte: (Keeler 2002).

À medida que o vetor de magnetização se aproxima da bobina, uma corrente é induzida, podendo ser amplificada e registrada – o resultado é chamado de decaimento livre de indução (FID, do inglês, *free induction decay*), o sinal de RMN que é detectado. (Keeler 2002)

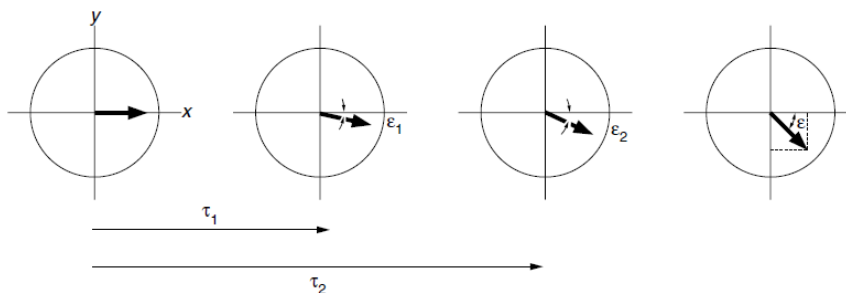
Basicamente, a bobina detecta a componente x da magnetização. Supondo que o vetor de magnetização no equilíbrio é  $M_0$ ; se esse vetor for inclinado por um ângulo  $\beta$  na direção do eixo x, a componente x é  $M_0 \sin \beta$  (Figura 6). É possível visualizar o que acontece com as componentes x e y fazendo a projeção no plano xy (Figura 7). (Keeler 2002)

**Figura 6.** Ilustração da componente x do vetor de magnetização.



Fonte: (Keeler 2002).

**Figura 7.** Ilustração da precessão do vetor de magnetização no plano xy.



Fonte: (Keeler 2002)

No tempo zero, assume-se que há somente a componente x. Após um tempo  $\tau_1$ , o vetor de magnetização rotacionou de um certo ângulo chamado  $\epsilon_1$ .

Como o vetor rotaciona a uma velocidade de  $\omega_0$  radianos por segundo, no tempo  $\tau_1$  o vetor se moveu através de  $(\omega_0 \times \tau_1)$  radianos; então  $\varepsilon_1 = \omega_0 \tau_1$ . Após mais algum tempo, diga-se  $\tau_2$ , o vetor teve mais tempo para precessar, e o ângulo  $\varepsilon_2$  será  $\omega_0 \tau_2$ . No geral, pode-se dizer que após um tempo  $t$ , o ângulo é  $\varepsilon = \omega_0 t$ . (Keeler 2002)

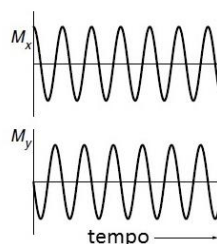
A componente x é proporcional ao  $\cos \varepsilon$  e a componente y é negativa (ao longo de  $-y$ ) e proporcional ao  $\sin \varepsilon$ . Relembrando que no tempo inicial o vetor de magnetização é  $M_0 \sin \beta$ , pode-se deduzir que as componentes x e y,  $M_x$  e  $M_y$ , respectivamente, são:

Equação 6 
$$M_x = M_0 \sin \beta \cos(\omega_0 t)$$

Equação 7 
$$M_y = -M_0 \sin \beta \sin(\omega_0 t).$$

$M_x$  e  $M_y$  são oscilações simples da frequência de Larmor (Figura 8). Aplicando-se a transformação de Fourier nesses sinais, obtém-se o espectro de RMN. (Keeler 2002)

**Figura 8.** Ilustração dos sinais das componentes x e y da magnetização.

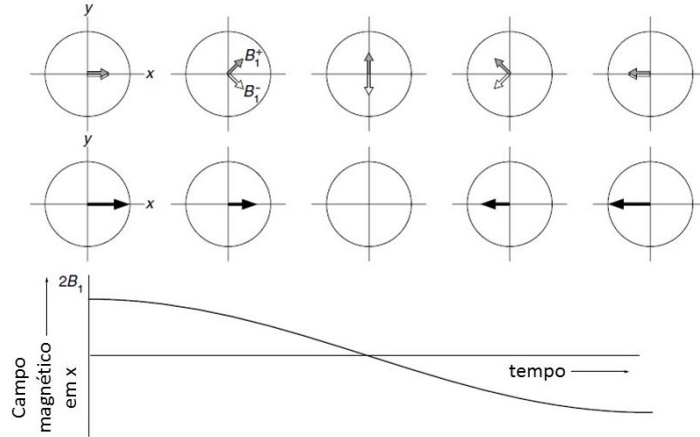


Fonte: Adaptado (Keeler 2002).

Para entender como o pulso de radiofrequência pode rotacionar a magnetização, é necessário introduzir a ideia de *rotating frame*, que é basicamente rotacionar o sistema para que seja possível observar o que acontece no plano xy. Quando o pulso de RF é aplicado na bobina ao longo do eixo x, o resultado é um campo magnético oscilando ao longo desse eixo. Este campo magnético se movimenta ao longo do eixo x, indo de  $+x$  a  $-x$  e passando pelo zero. Assume-se que a frequência da oscilação é  $\omega_{RF}$  (em rad/s) e o campo magnético é  $2B_1$  (em Tesla); a razão para ser  $2B_1$  é que para entender o que está acontecendo é mais fácil substituir, em nossas mentes, o campo que está oscilando linearmente por dois campos oscilando em direções contrárias (Figura 9). Esses dois campos tem a mesma magnitude  $B_1$ .  $B_1^+$

rotaciona no sentido positivo (de x a y), e  $B_1^-$  rotaciona no sentido negativo. (Keeler 2002)

**Figura 9.** Ilustração dos dois campos magnéticos  $B_1^+$  e  $B_1^-$  se unindo para formar o campo magnético que oscila ao longo do eixo x.



Fonte: Adaptado (Keeler 2002).

No tempo inicial, os dois campos estão alinhados no eixo x resultando em um campo total de  $2B_1$  nesse eixo. Enquanto o tempo passa, os vetores se afastam do eixo x em direções opostas. Como os dois vetores têm a mesma magnitude e rotacionam na mesma frequência, as componentes y sempre se cancelam. Entretanto, as componentes x se aproximam de zero à medida que esses vetores se aproximam de rotacionar  $90^\circ$ . Como o ângulo cresce depois desse ponto, a componente x cresce mais uma vez, mas na parte negativa do eixo x, alcançando um máximo quando o ângulo de rotação é  $180^\circ$ . (Keeler 2002)

Chama-se de offset ( $\Omega$ ) a diferença entre a frequência  $\omega_0$  citada anteriormente e a frequência presente no *rotating frame*

Equação 8 
$$\Omega = \omega_0 - \omega_{rot.frame}.$$

Sendo assim, o campo magnético no *rotating frame* também deve ser diferente do que é aplicado. Usando a relação existente entre o campo magnético e a frequência de precessão:

Equação 9 
$$\omega = \gamma B$$

então pode-se calcular o campo magnético aparente,  $\Delta B$ , a partir da frequência de Larmor aparente,  $\Omega$ :

Equação 10 
$$\Delta B = \frac{\Omega}{\gamma}$$

sendo  $\Delta B$  geralmente chamado de campo reduzido. (Keeler 2002)

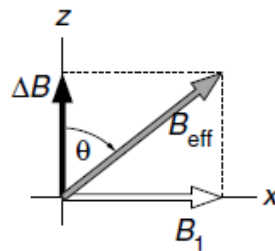
Quando um pulso de RF é aplicado, há dois campos magnéticos presentes: o de magnitude  $B_1$  produzido pelo pulso de RF (o deixaremos estático colocando a frequência igual a  $-\omega_{RF}$ ), e o campo reduzido,  $\Delta B$ , dado por  $\Omega/\gamma$ . Sabendo que  $\Omega = \omega_0 - \omega_{rot.fram.}$  e  $\omega_{rot.fram.} = -\omega_{RF}$ , segue-se que o offset é:

Equação 11 
$$\Omega = \omega_0 - (-\omega_{RF}) = \omega_0 + \omega_{RF}$$

No *rotating frame*, o campo reduzido (eixo z) e o campo  $B_1$  do pulso de RF (eixo x) se adicionam vetorialmente resultando no campo efetivo  $B_{eff}$  (Figura 10). (Keeler 2002)

Equação 12 
$$B_{eff} = \sqrt{B_1^2 + \Delta B^2}$$

**Figura 10.** Ilustração do campo magnético efetivo como a soma vetorial do campo reduzido  $\Delta B$  e do campo  $B_1$ .



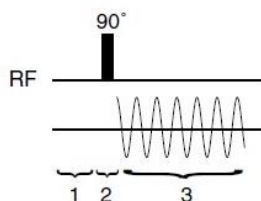
Fonte: (Keeler 2002).

Quando o *offset* é pequeno ou igual a zero, o campo efetivo se aproxima do plano xy e a magnetização rotaciona do eixo z para esse plano, sendo isso o esperado no experimento de RMN. Apesar de  $B_0$  ser muito maior que  $B_1$ , pode-se afetar a magnetização com  $B_1$  o fazendo oscilar próximo à frequência de Larmor. Isso é o chamado fenômeno de ressonância. (Keeler 2002)

Basicamente, o experimento de RMN pode ser dividido em 3 partes (Figura 11):

- 1) Espera-se que a amostra chegue ao equilíbrio;
- 2) O(s) pulso(s) de RF é(são) aplicado(s) por tempo suficiente para rotacionar a magnetização (por exemplo,  $90^\circ$ );
- 3) Após a aplicação do(s) pulso(s) de RF, é possível detectar o sinal que surge da magnetização à medida que ela rotaciona no plano transversal.

**Figura 11.** Ilustração das 3 partes de um experimento simples de RMN.



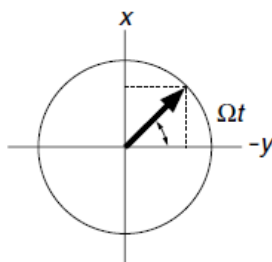
Fonte: (Keeler 2002).

Durante a parte 1, a magnetização em equilíbrio encontra-se ao longo do eixo z. Em seguida, aplica-se um pulso de RF de, por exemplo, 90° no eixo x, que rotaciona a magnetização para o eixo -y, caracterizando o fim da parte 2. Na parte 3, a magnetização precessa no plano transversal a uma frequência chamada de *offset*, que já foi descrita anteriormente. Observando a Figura 12, podemos deduzir como as componentes x e y da magnetização variam com o tempo. O *offset* é  $\Omega$  e após certo tempo  $t$ , o vetor precessou através de um ângulo  $\Omega t$ . Sendo assim, a componente y é proporcional a  $\cos \Omega t$  e a componente x à  $\sin \Omega t$ . (Keeler 2002)

Equação 13 
$$M_y = -M_0 \cos(\omega t)$$

Equação 14 
$$M_x = M_0 \sin(\omega t)$$

**Figura 12.** A magnetização começa ao longo do eixo -y e rotaciona através de um ângulo  $\Omega t$  após um tempo  $t$ .



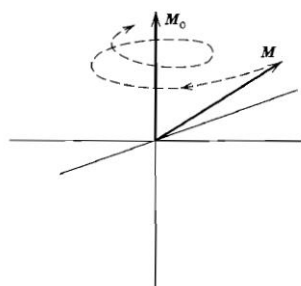
Fonte: (Keeler 2002).

A magnetização tem a tendência de retornar ao seu estado de equilíbrio ( $M_0$  ao longo do eixo z sem magnetização transversal no plano xy) através de um processo chamado relaxação. Então, com o passar do tempo, a relaxação faz com que a magnetização transversal decaia para zero. O FID, sinal produzido pela precessão da magnetização no plano xy também diminui em amplitude. Essa perda de intensidade das componentes x e y da magnetização é chamada de relaxação transversal. A componente z também tende a retornar

à sua posição inicial de equilíbrio, e esse processo é chamado de relaxação longitudinal. (Keeler 2002)

A relaxação longitudinal é designada pelo tempo  $T_1$ , e envolve a transferência de energia dos spins “excitados” para aqueles que estão com a frequência apropriada. A Figura 13 mostra a perda da componente xy pelo processo de relaxação longitudinal enquanto a magnetização retorna para o eixo z. (Robert M. Silverstein, Francis X. Webster 2005)

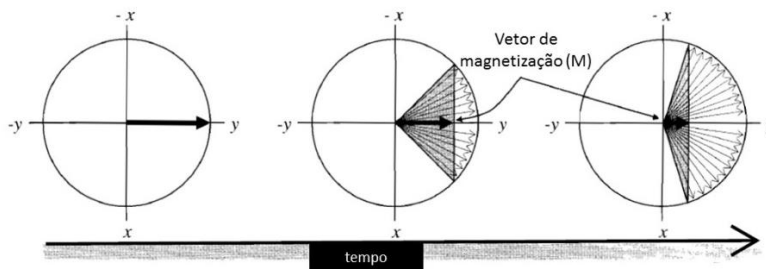
**Figura 13.** Relaxação longitudinal de M para  $M_0$ .



Fonte: (Keeler 2002).

A relaxação transversal, caracterizada pelo tempo  $T_2$ , envolve a transferência de energia entre os núcleos que estão precessando, o que provoca defasagem, alargamento dos picos e a perda do sinal (Figura 14).

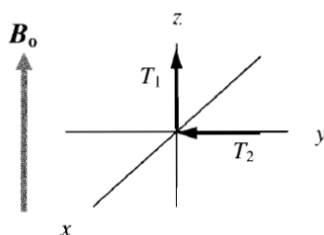
**Figura 14.** Ilustração da relaxação transversal que ocorre com a magnetização no decorrer do tempo.



Fonte: Adaptado (Keeler 2002).

Tipicamente, em moléculas pequenas,  $T_1$  e  $T_2$  são similares em magnitude; a relação entre essas duas grandezas está ilustrada na Figura 15. (Robert M. Silverstein, Francis X. Webster 2005)

**Figura 15.** Ilustração da relação entre  $T_1$  e  $T_2$  para moléculas pequenas.

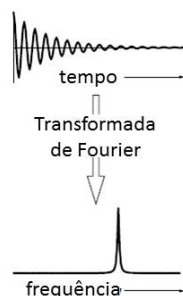


Fonte: (Keeler 2002).

Enquanto a relaxação transversal ocorre, a magnetização diminui no plano xy ao transferir energia para o eixo z. Para moléculas maiores (ou outros núcleos além de  $^1\text{H}$ ), a relaxação longitudinal demora mais tempo do que a transversal.

O FID, o sinal obtido pela precessão da magnetização, é apresentado numa escala de tempo. Aplicando a transformada de Fourier, obtêm-se os dados apresentados numa escala de frequência, o espectro propriamente dito. (Figura 16). (Keeler 2002)

**Figura 16.** A transformada de Fourier é uma operação matemática que transforma uma função dependente do tempo – como o FID – em uma função dependente da frequência – como o espectro.



Fonte: Adaptado (Keeler 2002).

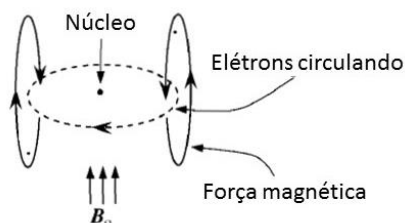
De acordo com a equação  $\nu_1 = (\gamma/2\pi)B_0$ , apenas um pico seria esperado no espectro de RMN. Porém, a situação não é assim tão simples. Considerando os núcleos de  $^1\text{H}$  presentes numa estrutura química, eles encontram-se blindados pelas nuvens de elétrons, e essa densidade eletrônica varia de acordo com o ambiente químico. Essa variação é o que promove as diferenças nas posições dos deslocamentos químicos. Sendo assim, agora a equação fundamental da espectroscopia de RMN é modificada para os núcleos equivalentes de uma espécie:

Equação 15 
$$\nu_{eff} = \frac{\gamma}{2\pi} B_0 (1 - \sigma)$$

onde  $\sigma$  é a constante de blindagem, cujo valor é proporcional ao grau de blindagem da nuvem eletrônica. (Robert M. Silverstein, Francis X. Webster 2005)

Para um determinado valor de  $B_0$ , a frequência efetiva,  $\nu_{eff}$ , durante a ressonância é menor do que a frequência aplicada,  $\nu_1$ . Os elétrons que estão sob a influência do campo magnético produzem o seu próprio campo magnético oposto ao campo magnético aplicado, sendo isso o “efeito blindagem” (Figura 17). Este efeito é responsável pelo diamagnetismo observado por todos os materiais orgânicos. No caso dos materiais com elétron desemparelhado, o paramagnetismo associado a esse elétron substitui o diamagnetismo dos elétrons emparelhados. (Robert M. Silverstein, Francis X. Webster 2005)

**Figura 17.** Ilustração da blindagem diamagnética do núcleo pelos elétrons circulando ao seu redor.

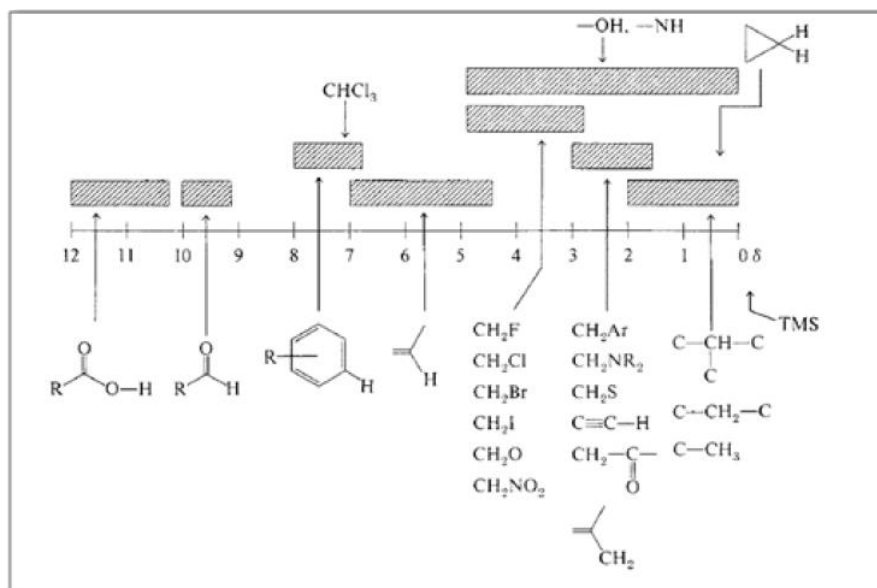


Fonte: Adaptado (Keeler 2002).

O grau de blindagem depende da densidade eletrônica e o grau de blindagem de um núcleo de  $^1\text{H}$  ligado a um átomo de carbono depende também do efeito indutivo de outros grupos ligados ao carbono. Por exemplo, quanto mais eletronegativo for o grupo ligado ao carbono, menor a blindagem eletrônica e, dessa forma, maior o deslocamento químico (Figura 18). A diferença entre a posição de absorção de um determinado núcleo e a posição de absorção de um núcleo de referência é o que chamamos de deslocamento químico daquele núcleo. Dessa forma, núcleos de hidrogênio em diferentes ambientes químicos possuem diferentes deslocamentos químicos, e, conseqüentemente, aqueles em um mesmo ambiente químico possuem o mesmo deslocamento químico. (Robert M. Silverstein, Francis X. Webster 2005)



**Figura 18.** Deslocamentos químicos no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  dos tipos mais comuns de funções orgânicas.



Fonte: (Lampman et al. 2009).

A frequência depende do campo aplicado, sendo assim, ao indicar a posição de um determinado núcleo no espectro, sempre seria necessário indicar em qual campo o espectro foi obtido. Porém, para solucionar esse problema, foi criada uma escala de referência que independe do campo,  $\delta$ . (Keeler 2002)

Equação 16

$$\delta = \frac{\nu_A - \nu_R}{\nu_0}$$

sendo  $\nu_A$ ,  $\nu_R$  e  $\nu_0$  as frequências do núcleo na amostra, na referência e a frequência do espectrômetro, respectivamente, dadas por

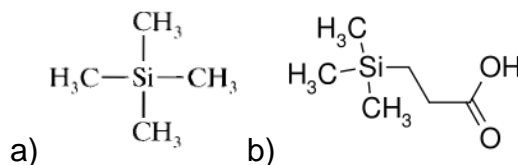
Equação 17

$$\nu_A = B_0(1 - \sigma_A) \frac{\gamma}{2\pi}, \quad \nu_R = B_0(1 - \sigma_R) \frac{\gamma}{2\pi}, \quad \text{e} \quad \nu_0 = B_0(1 - \sigma_0) \frac{\gamma}{2\pi}$$

A unidade de  $\delta$  é ppm (partes por milhão), porque o numerador está em Hz e o denominador em MHz.

No caso da espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$ , a referência utilizada é o TMS (Figura 19a) para solventes orgânicos, e o TSP (Figura 19b) quando o sistema é aquoso. Por definição, os spins desses materiais tem deslocamento químico igual a zero e a escala de  $\delta$  sempre aumenta da direita para esquerda no espectro. (Keeler 2002; Robert M. Silverstein, Francis X. Webster 2005)

**Figura 19.** Ilustrações das estruturas de Lewis do a) tetrametilsilano (TMS) e do b) ácido 3-trimetilsilil propiônico (TSP).



Autoria própria.

A espectroscopia de RMN é uma poderosa ferramenta utilizada para elucidação estrutural, amplamente empregada na química, sobretudo a Química Orgânica. Mas, ela também se constitui em poderosa ferramenta para identificar mudanças no perfil metabólico como resultado de mudanças no *status* bioquímico, pois oferece uma análise não-invasiva, que é capaz de apresentar os metabólitos e as suas concentrações relativas com precisão (Godoy et al. 2010; Araújo et al. 2017).

Entretanto, a identificação de biomarcadores e dos metabólitos responsáveis pela discriminação entre os grupos de amostras não é algo trivial. Há, na literatura, algumas revisões sobre como fazer essa identificação através da espectroscopia de RMN. Sabe-se que um grande número de informações é proporcionado através do espectro de RMN de <sup>1</sup>H unidimensional, incluindo: 1) deslocamentos químicos; 2) multiplicidade dos sinais; 3) constantes de acoplamento homonuclear; 4) constantes de acoplamento heteronuclear ; 5) a integral do sinal e 6) a estabilidade do sinal (variação da integral com o tempo).

Uma grande vantagem da espectroscopia de RMN é que os deslocamentos químicos são muito sensíveis à mudanças na estrutura e no ambiente químico. A sensibilidade dos deslocamentos químicos às mudanças no pH pode ser utilizada para distinguir ou identificar metabólitos, especialmente aqueles contendo grupos funcionais ionizáveis. Essa sensibilidade diminui a probabilidade de duas moléculas similares terem espectros de RMN idênticos.

A análise da multiplicidade dos sinais também é importante para a identificação dos metabólitos. Através de certos tipos de experimentos de *spin-echo* é possível distinguir sinais com diferentes multiplicidades, o que permite identificar metabólitos.

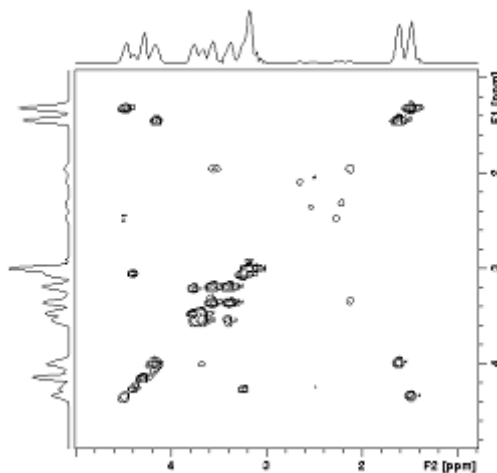
A detecção da presença de acoplamento entre dois hidrogênios não equivalentes é muito importante na identificação de metabólitos, uma vez que

as magnitudes das constantes de acoplamento são características da densidade eletrônica entre os dois tipos de hidrogênio.

Os metabólitos que estão presentes em concentrações relativamente altas ou que apresentam sinais distintos na região espectral podem ser identificados pela inspeção visual de um único espectro unidimensional de RMN de  $^1\text{H}$ . Isto pode ser feito baseando-se na base de dados metabolômicos HMDB. A identificação de metabólitos que estão presentes em níveis relativamente baixos, ou que tem sinais parcialmente ou completamente superpostos, é difícil através de métodos de RMN unidimensional. Sendo assim, é necessário utilizar a espectroscopia de RMN bidimensional.

O experimento de RMN bidimensional consiste em obter duas dimensões de tempo e, conseqüentemente, duas frequências. Sendo assim, é construído um gráfico com dois eixos dos sinais nas respectivas frequências, e eles são ortogonais entre si. Na Figura 20 observa-se um exemplo de como o espectro de RMN bidimensional é apresentado.

**Figura 20.** Exemplo de espectro de RMN bidimensional.



Alguns exemplos de experimentos de RMN bidimensionais são: JRES (do inglês, *J-Resolved*), COSY (do inglês, *Chemical Shift Correlation Spectroscopy*), TOCSY (do inglês, *Total Correlation Spectroscopy*), HSQC (do inglês, *Heteronuclear Single Quantum Correlation*), HMBC (do inglês, *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*). Através deles, é possível observar a correlação entre os spins, o que proporciona mais informação a respeito dos metabólitos presentes.

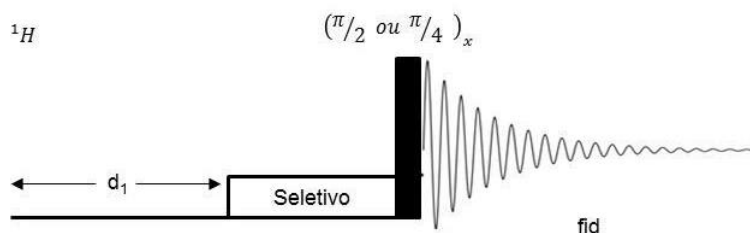
O STOCYSY (do inglês, *Statistical Correlation Spectroscopy*) é uma técnica utilizada para a identificação de metabólitos que se baseia na

espectroscopia de correlação bidimensional e é tradicionalmente aplicada ao experimento de RMN de  $^1\text{H}$  unidimensional. Ele analisa a covariância das variáveis de intensidade e produz uma matriz de correlação, que se apresenta na forma de um espectro de RMN, revelando o grau de correlação entre cada variável no espectro (unidimensional ou bidimensional). Dependendo da força da correlação, as variáveis correlacionadas podem pertencer à mesma espécie (forte correlação) ou a espécies da mesma via metabólica (correlação mais fraca). Para a metabonômica, esta técnica é bastante útil na análise de misturas complexas, como urina, onde a identificação dos metabólitos pode ser difícil. A eficiência do STOCSY para detectar corretamente as correlações depende do grau de sobreposição entre as ressonâncias, assim como de baixas concentrações. Uma sobreposição significativa dos picos distorce a covariância de diferentes ressonâncias pertencentes à mesma espécie em um espectro, e as ressonâncias que estão mais próximas dos ruídos são mais difíceis de analisar. Estes problemas levaram ao desenvolvimento de outras técnicas, incluindo STORM (do inglês, *SubseT Optimization by Reference Matching*) que utiliza um método iterativo para calcular as correlações e é mais adequado para lidar com possíveis sobreposições ou baixas concentrações. (Dona et al. 2016)

### 3.2.2 PRESAT

A supressão do solvente é necessária quando o solvente contém prótons não deuterados, porque o sinal do solvente pode ser muito superior em comparação aos sinais de interesse. Há algumas sequências de pulsos que podem ser utilizadas a fim de fazer a supressão do solvente: *Watergate*, *Double PFG spin echo* e PRESAT, que foi a sequência utilizada neste trabalho. PRESAT é uma sequência de dois pulsos de RF: um pulso relativamente longo e de baixa potência para saturar seletivamente uma frequência específica, geralmente a frequência atribuída ao sinal da água, e outro pulso não seletivo de  $45^\circ$  ou  $90^\circ$  para excitar as frequências de interesse. Em seguida, o sinal é adquirido (Figura 21). Antes da aplicação dos pulsos de RF, tem-se um tempo de espera ( $d_1$ ) para que o equilíbrio seja estabelecido. (Keeler 2002)

**Figura 21.** Ilustração da sequência de pulsos de RF utilizada para supressão do sinal da água.



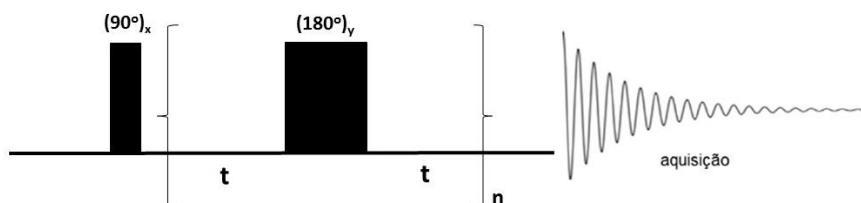
Fonte: (Costa 2016).

Esta sequência de pulsos é particularmente útil para amostras aquosas ou para aquelas que apresentam o sinal do solvente muito intenso. Com a devida otimização do experimento, é possível obter um espectro praticamente livre do sinal do solvente e também obter uma melhoria na relação sinal/ruído. (Keeler 2002)

### 3.2.3 CPMG

Moléculas mais pesadas, como os lipídios, possuem um menor tempo de relaxação transversal ( $T_2$ ), fazendo com que seus sinais no espectro se apresentem de forma alargada. Isso dificulta, muitas vezes, a visualização de sinais menos intensos. Porém, é possível eliminar esses sinais alargados utilizando a sequência de pulsos CPMG (Carr-Pucell-Meiboom-Gill), como um filtro de  $T_2$ . Essa sequência de pulsos foi descrita pela primeira vez em 1958 por Meiboom e Gill, sendo uma adaptação da sequência proposta por Carr e Pucell, por isso é chamada de Carr-Pucell-Meiboom-Gill. (Meiboom & Gill 1958) Ela consiste em um pulso de  $90^\circ$  aplicado no eixo x e sucessivos pulsos de  $180^\circ$  entre intervalos de tempo  $t = (2n + 1)\tau$  com  $n = 0, 1, 2, \dots$  (Figura 22).

**Figura 22.** Sequência de pulsos CPMG.

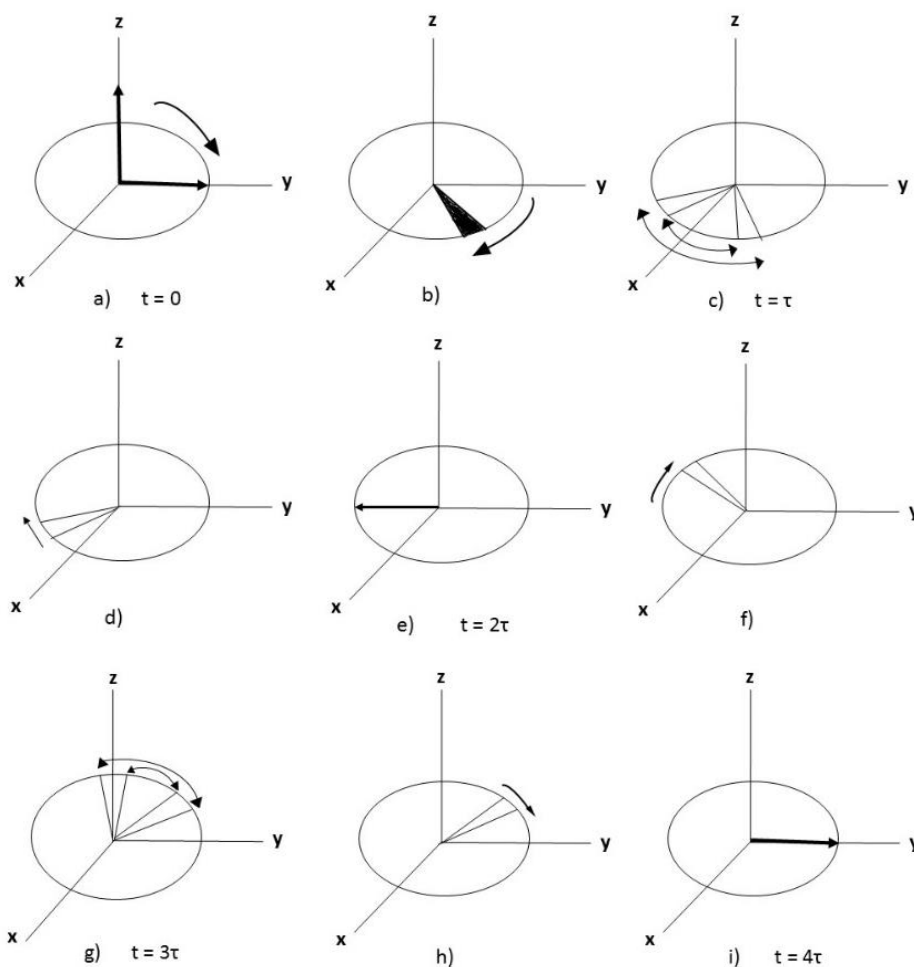


Autoria própria.

Esta sequência consiste em um pulso de  $90^\circ$  aplicado no eixo x e sucessivos pulsos de  $180^\circ$  entre intervalos de tempo  $t = (2n + 1)\tau$  com  $n = 0, 1, 2, \dots$  (Figura 22). Durante o intervalo  $\tau$  entre o pulso de  $90^\circ$  (Figura 23a) e o

primeiro pulso de  $180^\circ$ , o vetor de magnetização precessa por um ângulo  $\theta = \tau(\gamma B_{eff} - \omega)$ . Uma vez que  $B_{eff}$  não é homogêneo, os vetores pertencentes aos diferentes elementos de volume da mesma amostra precessam em velocidades diferentes. O resultado disto está indicado na Figura 23b pelo vetor sombreado. A Figura 23c ilustra o efeito do primeiro pulso de  $180^\circ$ . Durante o próximo intervalo, os vetores continuam a precessar, Figura 23d, cada um na sua própria velocidade, e ao final deste intervalo todos eles alcançam o eixo y negativo simultaneamente, produzindo o eco (Figura 23e). A Figura 23f ilustra a situação após o eco, enquanto a Figura 23g ilustra o efeito do segundo pulso de  $180^\circ$ , a Figura 23h a magnetização após esse pulso, e a Figura 23i o segundo eco. O processo então se repete com um período igual a  $4\tau$ . (Meiboom & Gill 1958)

**Figura 23.** Ilustração do comportamento do vetor de magnetização durante a sequência de pulsos CPMG.



Autoria própria.

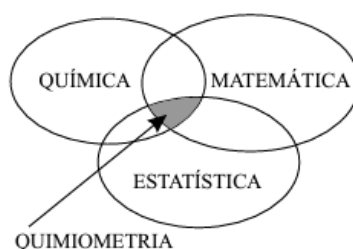
Nesse experimento, o intervalo entre os pulsos é ajustado de tal forma que se torna maior do que o tempo  $T_2$  dos spins cujos sinais não são de interesse e menor do que o  $T_2$  daqueles de interesse. Sendo assim, o espectro apresenta-se mais definido. Isso facilita a análise quimiométrica, que será discutida na próxima seção deste trabalho.

### 3.3 Quimiometria

A quimiometria é uma área da química que vem se desenvolvendo por mais de 40 anos a fim de suprir a necessidade de métodos estatísticos e matemáticos avançados que surgiu devido à crescente sofisticação dos processos e da instrumentação química. (Hopke 2003; Wold & Sjöström 1998)

Massart et al. definiram a quimiometria como “uma disciplina química que usa matemática, estatística e lógica (a) para desenhar ou selecionar procedimentos experimentais adequados; (b) para fornecer as informações químicas relevantes a partir da análise dos dados químicos; e (c) para obter conhecimento a respeito dos sistemas químicos.”. (Slutsky 1998) A quimiometria possui três campos de atuação: planejamento de experimentos, reconhecimento de padrões e calibração multivariada (Neto et al. 2002). Uma ilustração que representa a quimiometria é a Figura 24, onde coloca essa disciplina como a intersecção entre química, matemática e estatística.

**Figura 24.** Interdisciplinaridade da quimiometria.



Fonte: (Ferreira 2015).

A Sociedade Internacional de Quimiometria (*International Chemometrics Society*) foi fundada em 1974 para auxiliar o desenvolvimento desta área. (Hopke 2003) O primeiro artigo com o nome “quimiometria” no título foi publicado em 1975 (Kowalski 1975), escrito por Bruce Kowalski. Neste trabalho, ele sugere que a quimiometria se desenvolveu a um ponto que agora funcionava como uma área de pesquisa dentro da ciência da química. Porém, durante esta época havia impedimentos na publicação de artigos sobre quimiometria, pois a comunidade de cientistas analíticos ainda estava cética quanto à necessidade de ferramentas complexas para a análise dos dados. Na visão de muitos químicos, a necessidade dessas “complicadas” ferramentas era um sinal de que os experimentos apropriados não eram realizados, ao



invés de compreenderem que uma análise avançada dos dados é uma parte integrante da utilização das novas tecnologias em evolução. (Ferreira 2015)

Em 1977, a introdução da seção “*Computer Techniques and Optimization*” na revista *Analytica Chimica Acta* foi a primeira seção de uma revista claramente dedicada à essa área em desenvolvimento. Em 1980, a *Analytical Chemistry* mudou o nome da seção de revisão “*Statistical and Mathematical Methods in Analytical Chemistry*” para “*Chemometrics*”. Em 1982, uma seção separada na *Analytica Chimica Acta* foi finalizada porque a quimiometria se tornou aceita o suficiente para não precisar dessa atenção especial. Subsequentemente, foram lançadas duas revistas dedicadas a quimiometria: *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* e *Journal of Chemometrics*. (Ferreira 2015) Assim, a quimiometria continuou se desenvolvendo e com o passar dos anos passou a ter um papel importante dentro da química analítica. (Hopke 2003)

Em muitos estudos químicos, a concentração de uma ou mais espécies é estimada baseando-se nas propriedades medidas do sistema. Um exemplo clássico é a absorção da radiação eletromagnética em um comprimento de onda específico, que está relacionada com a concentração através da lei de Beer-Lambert.

Equação 18 
$$\frac{I(\lambda)}{I_0(\lambda)} = e^{-\varepsilon_{\lambda}cl}$$

Onde  $I(\lambda)$  é a intensidade da luz no comprimento de onda  $\lambda$  passando através de uma amostra de comprimento  $l$ ,  $I_0(\lambda)$  é a intensidade da luz incidente na amostra,  $\varepsilon_{\lambda}$  é a absorvidade molar, e  $c$  é a concentração.

Tipicamente, devido aos coeficientes de absorvidade molar não serem bem caracterizados, é necessário fazer uma calibração do sistema medindo a absorção da luz de uma série de amostras em que as concentrações das espécies de interesse são conhecidas.

Entretanto, para as amostras que contem múltiplas espécies, o problema se torna mais complicado porque podem ocorrer muitas componentes no sistema que absorvem em diferentes comprimentos de onda. Isso gera uma variedade de problemas que podem ser solucionados utilizando métodos de regressão, pois podem proporcionar uma melhor predição dos componentes na mistura. Tais métodos são comumente chamados de métodos de calibração

multivariada, e são amplamente aplicados porque permitem um estudo com várias espécies presentes ao mesmo tempo. (Hopke 2003; Ferreira et al. 1999)

Dessa forma, ficou claro que a tradicional estatística univariada não era mais suficiente para descrever todos os modelos químicos, uma vez que sistemas multivariados são muito comuns na química. Sendo assim, a quimiometria se coloca como alternativa, pois ela supera os limites da estatística univariada ao fazer uso de técnicas de análise multivariada, mesmo quando muitas variáveis são correlacionadas entre si. (Geladi 2003)

O campo da quimiometria utilizado neste trabalho foram as técnicas de reconhecimento de padrões, que são divididas em dois grupos: supervisionado e não supervisionado. O não supervisionado não utiliza a informação de classe das amostras na construção do modelo, buscando encontrar padrões naturais de agrupamento. Um exemplo é a Análise de Componentes Principais (PCA). O supervisionado, por sua vez, utiliza a informação de classe das amostras para construir modelos de classificação capazes de predizer a que classe uma amostra desconhecida pertence. Dois exemplos de análise supervisionada são Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) e *Soft Independent Modelling by Class Analogy* (SIMCA).

Entretanto, a utilização de ferramentas de estatística multivariada não dispensa o uso de estatística univariada. Os postulados desta continuam válidos e a abordagem multivariada se diferencia por ser mais avançada. Neste estudo, foi necessário utilizar alguns testes estatísticos univariados a fim de identificar se existiam diferenças significativas entre os grupos para algumas variáveis de interesse, como idade, sexo, colesterol, triglicerídeos, entre outras. Os testes estatísticos utilizados foram: teste  $t$  de Student não pareado, teste  $U$  de Mann-Whitney e teste exato de Fisher.

O teste  $t$  de Student não pareado é o teste  $t$  utilizado para amostras de populações (grupos) distintas com distribuição normal quando há interesse em verificar se há diferença significativa entre as médias das populações. O teste exato de Fisher é utilizado quando é necessário aplicar um teste de independência em uma tabela 2x2, onde as amostras são classificadas de duas maneiras diferentes, e é necessário avaliar a significância da associação entre as duas classificações. (Beiguelman 2006) O teste  $U$  de Mann-Whitney é utilizado quando a variável numérica não apresenta uma distribuição normal e

o teste  $t$  não pode ser utilizado. Ele é utilizado para amostras independentes e o requisito é que os grupos tenham a mesma distribuição. Ao contrário do teste  $t$ , que testa a igualdade das médias, o teste  $U$  testa a igualdade das medianas. (Callegari-Jacques 2003)

### 3.3.1 Pré-processamento dos dados

Uma vez que os dados foram coletados e organizados da forma apropriada, eles devem, se necessário, ser pré-tratados antes da análise quimiométrica a fim de reduzir as variações indesejáveis que podem influenciar no resultado da análise.

Há dois tipos de pré-processamento: um deles é aplicado às amostras, e o outro, às variáveis. O pré-processamento escolhido depende da técnica analítica utilizada e também do tipo de amostra que foi analisada. Existem dois tipos de contribuições dos sinais registrados por um instrumento analítico: contribuição determinística do sinal, que contém o sinal verdadeiro, e contribuição estocástica, que corresponde às variações indesejadas (ruído). O ruído não pode ser eliminado, mas pode ser reduzido quando se adicionam medidas repetidas. Na espectroscopia de RMN, que utiliza transformada de Fourier, os espectros são registrados rapidamente e então adicionados a fim de reduzir o ruído. (Ferreira 2015)

Além do ruído, também podem estar presentes informações sistemáticas que não estão relacionadas com o objeto de estudo. Por exemplo, o deslocamento na linha de base de um espectro (no eixo das ordenadas), causado pelo equipamento ou pela própria amostra, é uma variação sistemática indesejável. (Ferreira 2015)

Um método de alinhamento geralmente utilizado nos espectros de RMN é o *binning* ou *bucketing*, que consiste em dividir o espectro em janelas, o que permite alinhar os espectros e também filtrar ruídos. (Ferreira 2015)

Neste trabalho, as amostras foram soro de sangue (biofluido), e é natural que haja diferenças de diluição entre essas amostras. Neste caso, há vários tipos de pré-processamento para impedir que as amostras mais concentradas tenham uma maior importância na construção do modelo. Os dois tipos de pré-

processamento nas amostras utilizados neste trabalho foram normalização pela soma e *Standard Normal Variate* (SNV).

A normalização pela soma é quando cada bin ( $x_{ij}$ ) é dividido pela soma de todos os bins da amostra (Equação 19).

Equação 19 
$$x'_{ij} = \frac{x_{ij}}{\sum_{j=1}^J |x_{ij}|}$$

Onde  $x'_{ij}$  é o valor obtido após a normalização,  $x_{ij}$  é o valor da amostra  $i$  na variável  $j$ , e  $|x_{ij}|$  é o módulo do valor da amostra  $i$  na variável  $j$ . (Ferreira 2015)

Essa normalização iguala a magnitude de cada amostra, pois remove a informação da distância de cada amostra à origem dos dados, preservando a direção. Geralmente utiliza-se a normalização pela soma quando o objetivo é manter a informação que distingue qualitativamente uma amostra da outra e remover toda a informação que poderia discriminar duas amostras de composição idêntica, mas com concentrações diferentes. (Ferreira 2015)

SNV, por sua vez, subtrai do valor da amostra em cada variável o valor da média de todos os valores da determinada amostra em todas as variáveis e divide esse valor pelo desvio padrão (Equação 20).

Equação 20 
$$x_{ij \text{ snv}} = \frac{x_{ij} - \bar{x}_i}{s_i} \quad \text{onde}$$

$$\bar{x}_i = \frac{1}{J} \sum_{j=1}^J x_{ij} \quad \text{e} \quad s_i = \sqrt{\sum_{j=1}^J (x_{ij} - \bar{x}_i)^2}.$$

Onde  $x_{ij \text{ snv}}$  é o valor obtido após o SNV,  $\bar{x}_i$  é o valor médio dos bins de cada amostra e  $s_i$  é o desvio padrão dos bins de cada amostra. (Ferreira 2015)

Quanto às variáveis (colunas dos dados), também há vários tipos de pré-processamento que podem ser utilizados para evitar que as diferenças entre elas influenciem na construção do modelo. Neste estudo, foram utilizados a centragem dos dados na média e o autoescalamamento.

Para centrar os dados na média, calcula-se o valor médio de cada coluna da matriz de dados e, a seguir, esse valor é subtraído de cada um dos valores da respectiva coluna (Equação 21).

Equação 21 
$$x_{ij(cm)} = x_{ij} - \bar{x}_j$$

Onde  $x_{ij(cm)}$  é o valor obtido após a centragem dos dados na média, e  $\bar{x}_j$  é o valor médio dos bins de cada coluna:  $\bar{x}_j = \frac{1}{I} \sum_{i=1}^I x_{ij}$ . (Ferreira 2015)

O autoescalamamento, por sua vez, consiste em subtrair de cada elemento de uma coluna o valor médio da respectiva coluna e dividir o resultado pelo desvio padrão dessa coluna (Equação 22).

Equação 22 
$$x_{ij(a)} = \frac{x_{ij} - \bar{x}_j}{s_j}$$

Onde  $x_{ij(a)}$  é o valor obtido após o autoescalamamento, e  $s_j$  é o desvio padrão dos bins de cada coluna:  $s_j = \sqrt{\sum_{i=1}^I (x_{ij} - \bar{x}_j)^2}$ . (Ferreira 2015)

Observa-se que o autoescalamamento torna os dados adimensionais, ou seja, com valores invariantes com respeito à unidade utilizada originalmente. (Ferreira, 2015) A seguir, serão apresentadas as técnicas de reconhecimento de padrões utilizadas neste estudo.

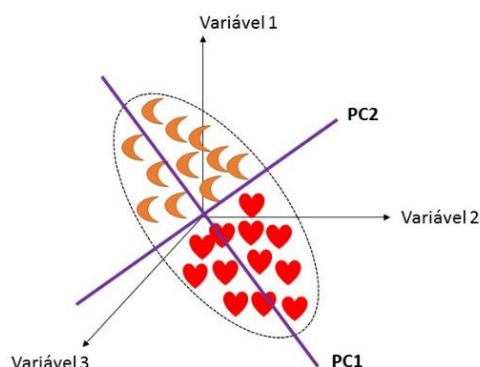
### 3.3.2 Análise de Componentes Principais

A Análise de Componentes Principais (do inglês, *Principal Component Analysis*) é uma análise não supervisionada, e é frequentemente o primeiro passo na análise de dados, pois funciona como uma análise exploratória ao detectar padrões no conjunto de dados. (Berrueta et al. 2007) A primeira publicação na literatura sobre PCA foi de Karl Pearson em 1901, mas o tratamento formal do método é devido ao trabalho de Hotelling em 1933, que causou uma revolução no uso de métodos multivariados na área da psicologia. Porém, apenas décadas depois, quando os computadores eletrônicos se tornaram acessíveis, que foi computacionalmente possível usar a PCA em conjuntos de dados que não fossem trivialmente pequenos. (Jolliffe & Cadima 2016)

A ideia por trás da PCA é simples: reduzir a dimensionalidade do conjunto de dados enquanto preserva o máximo de variabilidade (informação estatística) possível. O que se entende por “preservar o máximo de variabilidade possível” é encontrar novas variáveis que são funções lineares das variáveis originais, que maximizam a variância sucessivamente e que não

se correlacionam umas com as outras. Essas novas variáveis são chamadas de componentes principais (PC), e elas são eixos ortogonais entre si que representam as direções da maior variância de dados (Figura 25). (Ferreira 2015)

**Figura 25.** Rotação das variáveis originais para obtenção das componentes principais.



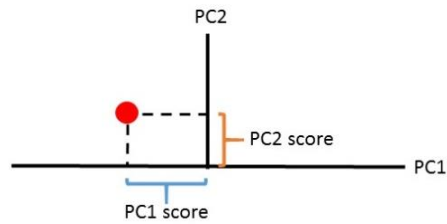
Autoria própria.

A primeira componente principal (PC1) explica a maior variância dos dados, a segunda componente principal (PC2) não é correlacionada com a primeira e explica o máximo da variância residual, e assim sucessivamente até que toda a variância dos dados seja explicada. (Jolliffe & Cadima 2016; Berrueta et al. 2007)

A Figura 24 ilustra um conjunto de amostras no espaço tridimensional definido pelas três variáveis e as respectivas componentes principais, PC1 e PC2. É possível observar que as amostras estão agrupadas em dois grupos distintos. Como são necessárias duas componentes principais para descrever todas as amostras, é possível dizer que a dimensionalidade intrínseca desse conjunto de dados é dois. Neste caso, a primeira componente, PC1, discrimina os grupos, enquanto a PC2 descreve alguma outra fonte de variabilidade dos dados.

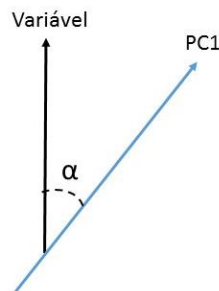
Os novos eixos se relacionam com as amostras através dos escores e com as variáveis originais através dos pesos (*loadings*). O escore é o valor que representa a amostra no espaço definido entre ela e a respectiva componente principal (Figura 26). O peso corresponde ao cosseno do ângulo entre os eixos da PC e da variável original (Figura 27). (Ferreira 2015)

**Figura 26.** Ilustração gráfica do escore de uma amostra.



Autoria própria.

**Figura 27.** Ilustração gráfica do peso de uma variável.



Autoria própria.

Após a PCA, a matriz de dados  $X$  ( $I \times J$ ) se divide em duas submatrizes, escores e pesos, que dependem do número de PCs (Figura 28). Sendo assim, pode-se representar matematicamente a PCA a partir da Equação 23. (Ferreira 2015)

**Figura 28.** Representação esquemática das matrizes presentes na PCA.

$$\boxed{X \ (I \times J)} = \boxed{T \ (I \times A)} \boxed{P \ (A \times J)} + \boxed{E \ (I \times J)}$$

Autoria própria.

Equação 23

$$X = TP^t + E$$

Onde  $A$  é o número de PCs,  $X$  é matriz dos dados pré-processados,  $P$  é a matriz de pesos,  $T$  é a matriz de escores e  $E$  é a matriz dos resíduos, que corresponde a parte não explicada pelo modelo.

Através da PCA, além de ser possível observar os agrupamentos das amostras quando projetadas nas componentes principais, também é possível observar a presença de amostras anômalas (*outliers*), que são aquelas que não se encontram dentro do padrão observado pelas outras amostras. Com a

PCA também são removidos as informações redundantes e os ruídos, fazendo com que a dimensionalidade dos dados seja reduzida. (Ferreira 2015)

### 3.3.3 Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais

A Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (do inglês *Partial Least Squares Discriminant Analysis*, PLS-DA) faz parte dos métodos de classificação multivariada, ou seja, é uma técnica supervisionada de reconhecimento de padrões. A primeira vez que a PLS-DA surgiu na literatura foi em 2003 (Barker & Rayens 2003), mas ela vem sendo utilizada desde aproximadamente 20 anos atrás. (Brereton & Lloyd 2014)

Na PLS-DA busca-se a relação entre as variáveis dependentes ( $\mathbf{Y}$ ) e as variáveis independentes ( $\mathbf{X}$ ). A matriz  $\mathbf{X}$  consiste nos dados originais pré-processados. A matriz  $\mathbf{Y}$  contém a informação de classe das amostras, sendo um vetor para cada classe. Então, se temos  $L$  classes envolvidas, a matriz  $\mathbf{Y}$  tem dimensões  $(I \times L)$ , onde  $I$  é o número de amostras. Para a classe observada, é atribuído o número um (1) para as amostras dessa classe, e o número zero (0) é atribuído a todas as outras amostras não pertencentes a essa classe. A Figura 29 ilustra as matrizes  $\mathbf{X}$  e  $\mathbf{Y}$  da PLS-DA para um conjunto de amostras com duas classes, A e B. (Ballabio & Consonni 2013)

**Figura 29.** Ilustração das matrizes  $\mathbf{X}$  e  $\mathbf{Y}$  da PLS-DA.

		X					Y		
		Variáveis					Classes		
		1	2	3	...	j	A	B	
Casos	1	$x_{11}$	$x_{12}$	$x_{13}$		$x_{1j}$	1	0	Amostras da classe A
	2	$x_{21}$	...	:		:	1	0	
	3	$x_{31}$	...	$x_{33}$		:	1	0	
	4	$x_{41}$	...	:		:	0	1	Amostras da classe B
	:						:	:	
	i	$x_{i1}$	...	$x_{i3}$		$x_{ij}$	0	1	

Fonte: Adaptado (Costa 2016).

A PLS-DA se baseia em encontrar as variáveis latentes (LVs), que são combinações lineares das variáveis originais e representam as direções que melhor discriminam as classes. Ou seja, as LVs explicam a máxima correlação



entre as matrizes **X** e **Y**, e através de pequenas rotações dessas variáveis é possível obter a melhor relação entre essas duas matrizes. Similarmente à PCA, é possível construir um sistema de coordenadas com as variáveis latentes e, se for o caso, visualizar diferentes padrões nos dados, como também as relações com os escores e os pesos dessas variáveis latentes. (Brereton & Lloyd 2014)

Assim como na PCA, os pesos são os coeficientes das variáveis nas combinações lineares que determinam as LVs, e portanto pode ser interpretado como a influência de cada variável em cada LV, enquanto os escores representam as coordenadas das amostras na projeção da LV. (Ballabio & Consonni 2013)

Os valores da variável dependente estimados pelo modelo final não necessariamente são os números inteiros zero (0) e um (1), mas sim valores que estão próximos desses números. Por isso estabelece-se um valor de corte entre zero e um para delimitar as duas classes, como, por exemplo, 0,5. (Ballabio & Consonni 2013)

Para a metabonômica, é importante a matriz **P**, pois nela é possível identificar as variáveis que indicam as regiões do espectro mais importantes para a classificação e, assim, associar essas regiões aos metabólitos discriminantes.

A utilização da informação de classe na PLS-DA permite uma melhor separação entre os grupos. Entretanto, a variação não correlacionada diretamente com **Y** pode complicar a interpretação do modelo PLS-DA construído, uma vez que ela está presente nos escores. Este problema pode ser solucionado aplicando um filtro de correção de sinal ortogonal (OSC, do inglês *Orthogonal Signal Correction*) no modelo PLS. Ele atua utilizando a informação contida na matriz **Y** para decompor a matriz **X** em dois conjuntos: variância correlacionada com **Y** e variância ortogonal a **Y**:

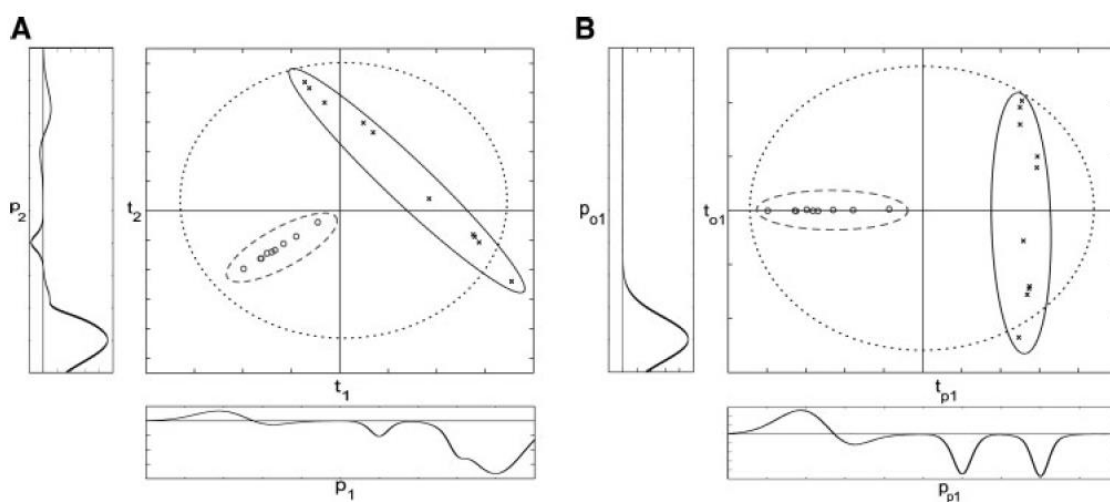
$$\text{Equação 24} \quad \mathbf{X} = \mathbf{TP}^t + \mathbf{T}_0\mathbf{P}_0^t + \mathbf{E}$$

Onde **T**<sub>0</sub> e **P**<sub>0</sub> são os escores e os pesos, respectivamente, para a variação não correlacionada com **Y** identificada pelo filtro OSC.

Os escores preditivos da OPLS-DA e os pesos usados para estimar **Y** são então compostos de variâncias diretamente correlacionadas com **Y**. A

OPLS-DA fornece uma melhor interpretação dos dados quando comparada com a PLS-DA porque a OPLS-DA separa a variância preditiva da não preditiva (ortogonal). Por exemplo, na PLS-DA tem-se as componentes  $t_1$  e  $t_2$  responsáveis pela discriminação entre as classes (Figura 30a). Os correspondentes vetores dos pesos  $p_1$  e  $p_2$  contêm uma mistura de propriedades discriminantes e não discriminantes que são principalmente confundidas na direção de  $t_2$ . No mesmo exemplo, a OPLS-DA separa efetivamente a direção discriminatória em  $t_{p,1}$  da direção ortogonal a  $Y$  ( $t_{o,1}$ ) tornando o vetor do peso preditivo correspondente ( $p_{p,1}$ ) fácil de interpretar (Figura 30b). As regiões do espectro responsáveis pela variância remanescente podem ser identificadas através do vetor ortogonal  $p_{o,1}$ , que está relacionado à variância presente dentro de uma das classes. Quando em  $X$  não há variância não correlacionada com  $Y$ , o modelo OPLS-DA obtido é idêntico ao PLS-DA. (Worley & Powers 2015; Bylesjö et al. 2007)

**Figura 30.** Demonstração das principais diferenças entre a) PLS-DA e b) OPLS-DA.



Fonte: (Bylesjö et al. 2007).

O passo seguinte é a validação do modelo, cujo objetivo é determinar o número de variáveis necessárias para a modelagem do conjunto de dados, avaliar a representatividade dos dados utilizados na construção do modelo, e apresentar a capacidade do modelo de classificar corretamente novas amostras. A situação ideal é quando há amostras suficientes para construir dois conjuntos: de treinamento, usado na construção do modelo, e de teste, usado para avaliar o modelo. Quando isso não é possível, a validação cruzada pode ser aplicada. (Westad & Marini 2015)

A validação cruzada LOOCV (do inglês *leave-one-out-cross-validation*) calcula o erro do modelo utilizando  $n-1$  amostras (onde  $n$  é o número de amostras), e testando a amostra restante. Este processo é repetido para todos os  $n$  subconjuntos de tamanho  $n-1$ . LOOCV também é utilizada para determinar o número de variáveis latentes para o modelo PLS-DA, fornecendo os valores da capacidade preditiva ( $Q^2$ ), do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e da precisão do modelo. (Berrueta et al. 2007)

Neste trabalho, foi utilizada a validação cruzada LOOCV e também o teste de permutação, que consiste em permutar as classificações das amostras muitas vezes para verificar se o modelo permutado é mais preciso ou não do que o modelo original. (Berrueta et al. 2007)

Outra ferramenta utilizada pela PLS-DA é o VIP (do inglês, *Variable Importance Projection*), um método proposto em 1993 por Wold *et al.*. Os escores VIP apresentam a influência das variáveis no modelo. Esses escores fornecem uma forma útil de selecionar quais são as variáveis que mais contribuem para a explicação da variância nos dados. Para certo conjunto de dados e um dado modelo, haverá sempre somente um vetor de escores VIP, resumindo todas as componentes e variáveis. Sendo assim, sabendo a importância de cada variável na projeção do modelo, é possível identificar quais as variáveis mais importantes para a discriminação das amostras. (Farrés et al. 2015)

### 3.3.4 Figuras de Mérito

Os erros cometidos pelos modelos classificatórios são organizados em uma tabela de contingência, também chamada de matriz de classificação ou matriz de confusão (Figura 31). Nas colunas dessa tabela estão as classes verdadeiras das amostras, enquanto nas linhas estão as classes estimadas pelo modelo classificatório. Os elementos internos indicam o número de amostras de cada classe e onde elas foram classificadas. Por exemplo, AA é o número de amostras que são verdadeiramente da classe A e que foram corretamente classificadas. BA é o número de amostras da classe B que foram incorretamente classificadas em A. A soma a seguir,  $AA + BA$ , é o número total de amostras previstas pelo modelo na classe A. Na linha seguinte estão as

amostras previstas como sendo da classe B, em que AB são amostras de A incorretamente classificadas em B, e BB são as amostras da classe B corretamente classificadas. A soma  $AB + BB$  é o número total de amostras previstas pelo modelo na classe B. A soma  $AA + AB$  é o número total de amostras da classe A, enquanto a soma  $BA + BB$  é o número total de amostras da classe B. As amostras corretamente classificadas encontram-se na diagonal principal, e tudo que aparece fora da diagonal representa os insucessos obtidos no modelo. (Ferreira 2015)

**Figura 31.** Tabela de contingência dos resultados de uma classificação.

		Classe verdadeira		
		A	B	
Classe prevista	A	AA	BA	$AA + BA$
	B	AB	BB	$AB + BB$
		$AA + AB$	$BA + BB$	

Fonte: Adaptado (Ferreira 2015).

As figuras de mérito são calculadas a partir das hipóteses consideradas na análise dos dados. Por exemplo, considerando que a classe A representa pacientes acometidos por alguma doença e a classe B representa os pacientes saudáveis, temos 2 hipóteses:

$H_0$ : a amostra é de um paciente saudável (classe B) e

$H_1$ : a amostra é de um paciente doente (classe A).

Um erro designado de falso positivo (*FP*) acontece quando a hipótese  $H_0$  é verdadeira e rejeitada, ou seja, quando uma amostra da classe B é classificada erroneamente como sendo da classe A. Porém, se uma amostra da classe B é classificada corretamente, tem-se um verdadeiro negativo (*VM*). Se a hipótese  $H_0$  é falsa e é aceita, ou seja, se a hipótese  $H_1$  é verdadeira e é rejeitada, tem-se um erro designado de falso negativo (*FN*). E se  $H_1$  é verdadeira e é aceita, não há erro e tem-se um verdadeiro positivo (*VP*). (Ferreira 2015)

As cinco figuras de mérito que podem ser calculadas utilizando a tabela de contingência são: exatidão, sensibilidade, especificidade, valor preditivo

positivo e valor preditivo negativo. Elas são expressas em porcentagem e estão definidas nas equações abaixo. (Kawamura 2002)

A exatidão é a probabilidade de acerto do modelo:

Equação 25 
$$EXAT = \frac{AA+BB}{AA+AB+BA+BB} 100$$

A sensibilidade é a capacidade que o modelo apresenta de detectar os verdadeiros positivos:

Equação 26 
$$SEN = \frac{AA}{AA+AB} 100$$

A especificidade é a capacidade que o modelo apresenta de detectar os verdadeiros negativos:

Equação 27 
$$ESP = \frac{BB}{BA+BB} 100$$

O valor preditivo positivo é a probabilidade de um verdadeiro positivo ser realmente positivo:

Equação 28 
$$VPP = \frac{AA}{AA+BA}$$

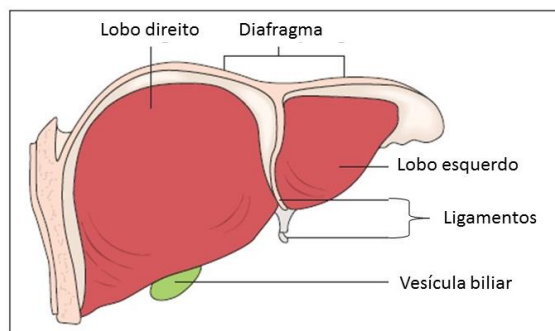
O valor preditivo negativo é a probabilidade de um verdadeiro negativo ser realmente negativo:

Equação 29 
$$VPN = \frac{BB}{BB+AB}$$

### 3.4 Fígado

O fígado é o segundo maior órgão do corpo humano (o maior é a pele), e a maior glândula, funcionando como glândula exócrina (liberando secreções) e endócrina (liberando substâncias no sangue e no sistema linfático). Em um adulto normal, pesa de 1200 a 1600 g, constituindo aproximadamente 2,5% do peso corporal. Ele se encontra no lado direito da região abdominal, logo abaixo do diafragma, e é dividido em duas regiões principais: o lobo direito e o lobo esquerdo, que são separados por ligamentos (Figura 32). O direito é cerca de seis vezes maior que o esquerdo, e é subdividido em segmentos menores: os lóbulos caudado e quadrado, que estão nas partes posterior e inferior, respectivamente. (Junqueira & Carneiro 2013; Kumar et al. 2010; McCormick 2011)

**Figura 32.** Face diafragmática do fígado.



Fonte: (Kumar et al. 2010)

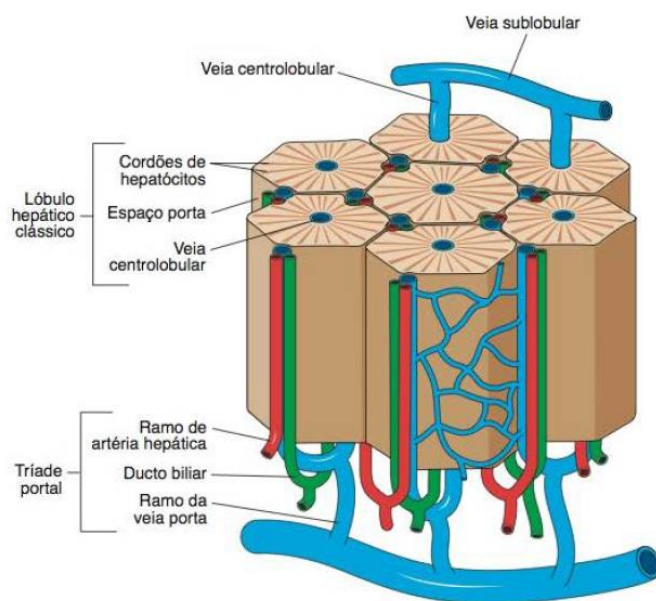
Este órgão funciona como uma ponte entre o sistema digestório e o sangue, pois é nele que os nutrientes absorvidos no trato digestório são processados e armazenados para serem utilizados por outros órgãos. O fígado capta, transforma e acumula metabólitos para a neutralização e eliminação de substâncias tóxicas. Atuando como uma glândula exócrina, ele elimina a bile, uma secreção importante para a digestão de lipídios. Além disso, o fígado também exerce uma função muito importante na produção de proteínas plasmáticas, como a albumina e outras proteínas carreadoras. (Junqueira & Carneiro 2013)

A veia porta fornece uma grande parte do sangue para o fígado (cerca de 70 a 80%), enquanto a menor percentagem é suprida pela artéria hepática. A primeira traz sangue venoso dos intestinos e do baço; e a segunda supre o

fígado com sangue proveniente do tronco celíaco da aorta abdominal. Todos os nutrientes absorvidos pelo intestino chegam ao fígado pela veia porta, exceto os lipídios complexos, que chegam pela artéria hepática. (Junqueira & Carneiro 2013; Kumar et al. 2010; McCormick 2011)

As células hepáticas (hepatócitos) compreendem aproximadamente 60% do fígado. Elas são poliédricas, com seis ou mais superfícies, com diâmetro de 20 a 30  $\mu\text{m}$ . Agrupam-se em placas interconectadas por capilares, os sinusoides hepáticos. Existem aproximadamente  $202 \times 10^3$  células em cada miligrama do fígado de um ser humano normal. Unidades estruturais denominadas lóbulos hepáticos podem ser observadas, e o fígado humano, por exemplo, contém de 3 a 6 espaços porta por lóbulo, cada um contendo um ramo da veia porta, um ramo da artéria hepática, um ducto (parte do sistema de ductos biliares) e vasos linfáticos (Figura 33). (Junqueira & Carneiro 2013; McCormick 2011)

**Figura 33.** Ilustração dos lóbulos hepáticos do fígado.



Fonte: (Junqueira & Carneiro 2013).

Os hepatócitos geralmente contêm glicogênio, que é um depósito de glicose, sendo mobilizado quando a glicose sanguínea cai abaixo do nível adequado. Desta maneira, as células hepáticas contribuem para manter a glicemia estável, representando uma das principais fontes de energia para utilização pelo organismo. Além disso, os perioxissomos (organelas que contêm enzimas) são abundantes nos hepatócitos, e algumas das suas funções são:

oxidação de ácidos graxos em excesso, quebra do peróxido de hidrogênio gerado por esta oxidação, quebra de purinas em excesso com consequente formação de ácido úrico e participação na síntese do colesterol, ácidos biliares e alguns lipídios utilizados para a síntese de mielina. O complexo de Golgi no hepatócito é responsável pela formação de lisossomos e pela secreção de proteínas plasmáticas, glicoproteínas e lipoproteínas. Dessa forma, o hepatócito é, provavelmente, a célula mais versátil do organismo, pois além de ter funções endócrinas e exócrinas, também acumula, detoxifica e transporta diversas substâncias. (Junqueira & Carneiro 2013)

O fígado armazena lipídios e carboidratos na forma de triglicerídeos e glicogênio, respectivamente, suprindo o organismo da energia necessária entre as refeições. Além disso, também armazena algumas vitaminas, especialmente a vitamina A. No hepatócito, acontece a conversão de aminoácidos em glicose, sendo também o principal sítio de desaminação de aminoácidos, processo que resulta na produção de ureia. Após isso, a ureia é transportada para os rins pelo sangue, sendo excretada na urina. (Junqueira & Carneiro 2013)

Em humanos, o fígado apresenta uma capacidade de regeneração consideravelmente restrita, mas sua importância reside no fato de que podem ser usadas partes deste órgão em transplantes cirúrgicos. (Junqueira & Carneiro 2013)

As principais doenças que acometem o fígado são as hepatites virais, a doença hepática alcoólica, a doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) e o carcinoma hepatocelular (CHC). Além disso, doenças como insuficiência cardíaca descompensada, câncer disseminado e infecções extra-hepáticas podem fazer a lesão hepática ocorrer secundariamente. Apesar de o fígado ser vulnerável a uma grande quantidade de metabólitos tóxicos, microbianos, circulatórios e neoplásicos, ele possui uma enorme reserva funcional que mascara o impacto clínico quando a lesão hepática é leve, porém, com a progressão da doença, as consequências são severas e podem levar à morte. (Kumar et al. 2010)



### 3.4.1 Esquistossomose

A esquistossomose é uma doença infecciosa tropical comum principalmente na África, Ásia e América do Sul. A Organização Mundial da Saúde (OMS) a considera como a segunda doença socioeconomicamente mais importante (a primeira é malária), e a terceira doença parasitária mais frequente na saúde pública, afetando aproximadamente 200 milhões de pessoas em 74 países, com uma taxa de infecção de 1 em cada 30 indivíduos nessa população. (Sah et al. 2015; Gasim et al. 2015; Elbaz & Esmat 2013)

Esta doença é causada por parasitas do gênero *Schistosoma*, pertencente à classe *Trematoda*. Entre 25 espécies conhecidas desse gênero, as com importância epidemiológica na medicina humana são apenas cinco: *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma mekongi* e *Schistosoma intercalatum*. Entre elas, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma japonicum* e *Schistosoma intercalatum* são os principais parasitas causadores de doenças em humanos. (Sah et al. 2015). *Schistosoma mansoni* é a espécie mais dominante em certas áreas tropicais e sub-tropicais da África subsariana, do Oriente Médio, da América do Sul e do Caribe. A infecção por *Schistosoma haematobium* é adquirida no norte da África, na África subsariana, no Oriente Médio e na Índia. *Schistosoma japonicum* ocorre somente na Ásia. *Schistosoma intercalatum* ocorre na África central e ocidental, enquanto *Schistosoma mekongi* é restrita a Laos e Camboja. Atualmente, o maior número de casos de esquistossomose ocorre no Egito, Iêmen e Argélia. (Elbaz & Esmat 2013)

Apesar de esta doença ter sido reconhecida apenas em 1851, por Theodore Bilharz, que confirmou a presença do verme conhecido hoje como *Schistosoma haematobium* em vasos mesentéricos de um camponês egípcio autopsiado, os ovos do *Schistosoma* foram encontrados em múmias egípcias que datam de 3500 a.C.. Entretanto, a síndrome de Katayama, uma forma aguda da infecção pelo *Schistosoma japonicum*, foi descoberta por Fuji em 1847, 4 anos antes da descoberta de Bilharz. Mas, somente em 1914 que os moluscos do gênero *Oncomelania* foram identificados como os hospedeiros intermediários do *Schistosoma japonicum*. Em 1902, Manson encontrou ovos em Antilhas, indicando uma nova espécie de *Schistosoma*, que foi classificada

como *Schistosoma mansoni* em 1907 por Sambon. No Brasil, esta mesma espécie teve sua presença confirmada em 1908 através da descrição de quatro casos registrados por Pirajá da Silva, na Bahia. (Coura & Amaral 2004)

No Brasil, a esquistossomose foi provavelmente introduzida logo após a chegada dos europeus ao país, com a vinda dos escravos africanos. Na sequência, através dos fluxos migratórios, a doença se disseminou no interior. A Figura 34 ilustra como a esquistossomose se espalhou para todo o país, assim como a distribuição dos hospedeiros intermediários *Biomphalaria glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila*. (Coura & Amaral 2004)

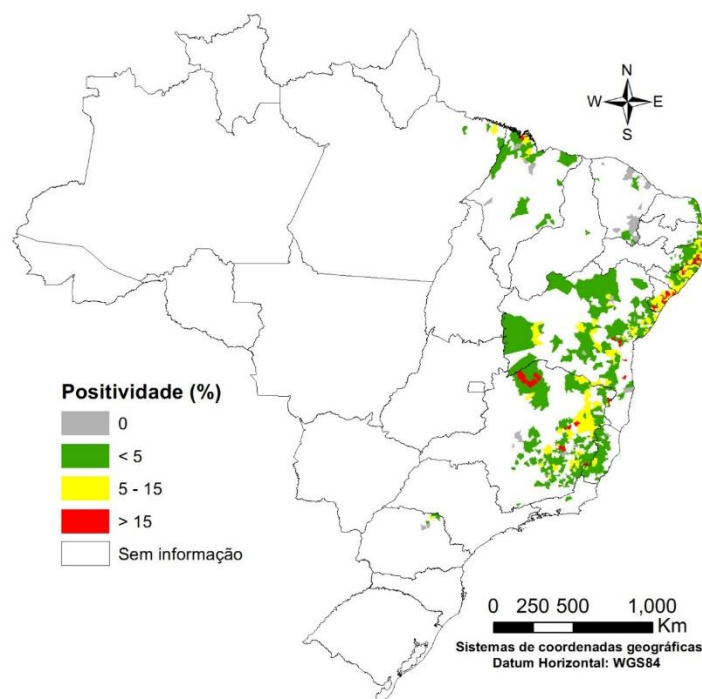
**Figura 34.** Fluxos migratórios da esquistossomose e distribuição dos hospedeiros intermediários do *Schistosoma mansoni* no Brasil.



Fonte: (Coura & Amaral 2004)

Atualmente, a doença é detectada em todas as regiões do país, mas os estados das regiões Nordeste e Sudeste são os mais afetados. As áreas endêmicas compreendem os estados de Alagoas, Bahia, Pernambuco, Rio Grande do Norte (faixa litorânea), Paraíba, Sergipe, Espírito Santo e Minas Gerais (predominantemente no norte e nordeste do estado). No Pará, Maranhão, Piauí, Ceará, Rio de Janeiro, São Paulo, Santa Catarina, Paraná, Rio Grande do Sul, Goiás e no Distrito Federal, a transmissão é focal, não atingindo grandes áreas. Esses dados estão ilustrados na Figura 35 (Da Martins et al. 2015)

**Figura 35.** Distribuição da esquistossomose, de acordo com a faixa de positividade, por município brasileiro entre 2010 e 2015.

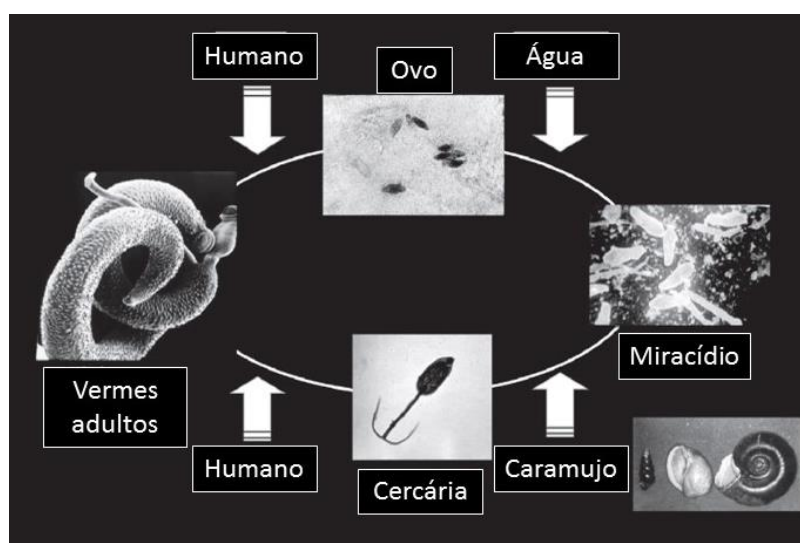


Fonte: Ministério da Saúde.

A transmissão da esquistossomose ocorre amplamente em todo o Brasil, atingindo aproximadamente 6 milhões de pessoas com formas avançadas da doença, e estima-se que 25 milhões de pessoas vivam em áreas onde existe o risco de transmissão. Apesar disso, a incidência e a morbidade da doença diminuíram em alguns estados devido a políticas governamentais. (Da Martins et al. 2015)

A esquistossomose hepática é a forma mais comum dessa doença e usualmente resulta da infecção pelo *Schistosoma mansoni*. (Elbaz & Esmat 2013). O ciclo de vida desse parasita possui dois hospedeiros: um intermediário e um definitivo. O principal hospedeiro é o homem, sendo a partir de suas fezes que os ovos são disseminados na natureza (fontes de água doce, como rios, riachos e cachoeiras). Na água, os ovos se transformam em miracídeos, que invadem o tecido do hospedeiro intermediário (caramujo, caracol ou lesma). Neste hospedeiro, o parasita modifica-se de miracídio para uma larva denominada cercária. Este ciclo está ilustrado na Figura 36. (Barsoum et al. 2013)

**Figura 36.** Ciclo de vida do Schistosoma.



Fonte: (Barsoum et al. 2013).

Uma vez que as cercárias penetram na epiderme, elas atingem a corrente sanguínea, por onde são transportadas até o intestino e o fígado, fixando-se por meio de ventosas e reproduzindo-se assexuadamente. As fêmeas produzem ovos por volta da sexta semana, e estes são depositados em vários tecidos, principalmente no fígado. Trata-se de uma doença inicialmente assintomática que pode evoluir para formas clínicas extremamente graves, e levar o paciente a morte. Aproximadamente 40% dos pacientes infectados são assintomáticos e apenas 10% apresentam a forma mais grave da doença (Barsoum et al. 2013).

Os sintomas na fase inicial incluem febre, tosse, diarreia, coceiras, vômitos e emagrecimento. Enquanto na fase avançada os sintomas mais comuns são diarreia, aumento do fígado e do baço, hemorragias e “barriga d’água”. (Garcia-Perez et al. 2010; Sah et al. 2015) No fígado, a patogênese da esquistossomose está relacionada à formação de granuloma ao redor dos ovos, levando à fibrose periportal e subsequente hipertensão portal, esplenomegalia e varizes esofágicas. (Elbaz & Esmat 2013)

O diagnóstico da esquistossomose é feito tradicionalmente através da detecção dos ovos do parasita nas fezes do paciente. Este método é baseado em microscopia e é simples e barato, porém, devido à distribuição desigual dos ovos em fezes sólidas e à considerável variação diária da produção dos ovos, não é um método preciso o suficiente. Alternativamente, a detecção de anticorpos é um método sensível e específico, porém, os resultados são

difíceis de interpretar nos pacientes que tem um histórico de infecção prévia. (Balog et al. 2011)

A ultrassonografia (US) é considerada a principal modalidade de escolha e desempenha um papel fundamental no diagnóstico do comprometimento hepático na esquistossomose, uma vez que permite a identificação de fibrose, esplenomegalia, dimensões aumentadas da veia porta e a presença de vasos colaterais (Elbaz & Esmat 2013; Guimarães Cavalcanti et al. 2015). Entretanto, a US é um procedimento subjetivo, dependente do examinador, e a heterogeneidade do parênquima hepático resultante da infecção viral pode dificultar a visualização da fibrose periportal em alguns pacientes (Lambertucci 2014).

### 3.4.2 Hepatites B e C

As hepatites virais são doenças infecciosas que afetam o fígado através de um grupo de vírus conhecidos como vírus hepatotrópicos, que são os vírus das hepatites A, B, C, D e E. (Kumar et al. 2010) Nesta seção serão discutidas especificamente as hepatites B e C, os objetos de estudo deste trabalho.

#### *Hepatite B*

Em 1963, o vírus da hepatite B (HBV) foi descoberto por Baruch Blumberg durante sua pesquisa sobre o antígeno Australia, que posteriormente ficou conhecido como o antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg). Esse vírus pertence à família *Hepadnaviridae*, e possui uma molécula de DNA circular de fita parcialmente dupla, que possui 3200 nucleotídeos. O HBV é o menor vírus DNA fita dupla conhecido, apresentando forma esférica com 42 nm de diâmetro. (Kumar et al. 2010; Saeed et al. 2014)

O vírion de HBV maduro, também conhecido como “partícula de Dane”, é responsável por infeccionar aproximadamente 5% da população mundial, atingindo um total de 2 bilhões de pessoas infectadas com o vírus e cerca de 350 milhões apresentam infecção crônica. Este vírus é responsável por 600 mil mortes a cada ano, e é reconhecido mundialmente como um problema de saúde pública (Saeed et al. 2014). A transmissão se dá fundamentalmente

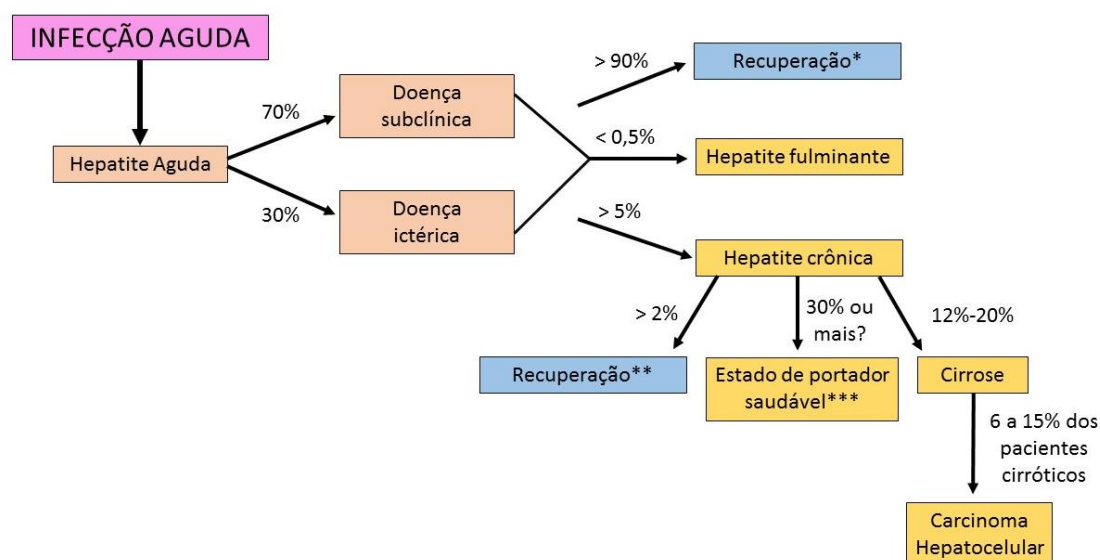
através das vias parenteral e sexual, e o vírus atua nas células do fígado, onde replica o seu DNA. (Dény & Zoulim 2010)

As formas de manifestação e evolução clínica da infecção pelo HBV são as seguintes:

- 1) Hepatite aguda com recuperação e eliminação do vírus;
- 2) Hepatite crônica não progressiva;
- 3) Doença crônica progressiva terminando em cirrose;
- 4) Hepatite fulminante com necrose hepática maciça; e
- 5) Estado de portador assintomático. (Kumar et al. 2010)

A Figura 37 ilustra as frequências aproximadas das evoluções clínicas da infecção por HBV.

**Figura 37.** Possíveis evoluções da infecção por HBV em adultos.



\*Recuperação completa. \*\*Recuperação indicada por um teste negativo para HBsAg.

\*\*\*Indicado por HBsAg positivo por > 6 meses; HBeAg negativo; HBV-DNA sérico < 10<sup>5</sup> cópias/mL; níveis persistentes normais das enzimas hepáticas AST e ALT; ausência de inflamação significativa e necrose na biópsia hepática.

Fonte: Adaptado (Kumar et al. 2010).

O período de incubação do HBV é prolongado, durando cerca de 4 a 26 semanas. A maioria dos pacientes infectados (70%) apresentam sintomas inespecíficos ou até mesmo nenhum, e não desenvolvem icterícia. Os outros 30%, além de manifestarem sintomas inespecíficos, como anorexia, febre, fadiga, e dor no quadrante superior direito do abdômen, apresentam icterícia.

Na maioria dos casos, a infecção desaparece sem a necessidade de tratamento. (Kumar et al. 2010)

As pessoas que desenvolvem hepatite B crônica, morrem, em média, 22 anos mais cedo do que aquelas que não possuem HBV. Isso acontece devido a complicações da doença, como cirrose, carcinoma hepatocelular e insuficiência hepática. (Rajbhandari & Chung 2016)

Na fase inicial da doença, antes mesmo do início dos sintomas, o HBsAg aparece. Ele atinge seu pico durante a fase evidente da doença e então diminui até níveis indetectáveis em 3 a 6 meses. Após o desaparecimento do HBsAg, que é quando a fase aguda acaba, o anticorpo anti-HBs aumenta e passa a ser detectável no sangue. Esses anticorpos podem permanecer no corpo humano durante toda a vida, funcionando como uma forma de proteção. A intensa replicação do vírus também é manifestada através da presença de HBeAg, HBV-DNA e DNA polimerase, que aparecem logo após HBsAg. O período de duração do HBeAg é curto, então quando ele permanece além de três meses no sangue pode indicar a evolução do quadro clínico para hepatite crônica. Quando isto não acontece, o antígeno HBeAg é substituído pelo anticorpo anti-HBe, que indica que uma infecção aguda atingiu seu pico e está declinando. (Kumar et al. 2010; Dény & Zoulim 2010)

O anti-HBc IgM também é um indicativo da fase aguda, e torna-se detectável no soro pouco antes do início dos sintomas, simultaneamente ao aumento das aminotransferases AST (aspartato aminotransferase) e ALT (alanina aminotransferase), cujo aumento é um indicativo da ocorrência de destruição celular no indivíduo. O anti-HBc IgG aparece na fase aguda a partir do declínio do anti-HBc IgM, e pode permanecer em menor quantidade mesmo após a cura do paciente. (Kumar et al. 2010; Dény & Zoulim 2010)

O marcador epidemiológico mais importante na infecção pelo HBV é o anti-HBc. A detecção do HBsAg, anti-HBc (IgM e IgG) e HBeAg/anti-HBe se faz atualmente através de técnicas imunoenzimáticas (ELISA) e de quimioluminescência. (Kumar et al. 2010; Dény & Zoulim 2010; Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. 2015)

Os casos de hepatite B mais graves, em que o HBsAg desaparece rapidamente (cerca de 4 semanas após a infecção), possuem o seu diagnóstico baseado na presença do anti-HBc IgM. Devido à intensa replicação

viral que ocorre no início da doença, sempre deve ser solicitado o exame de reação em cadeia da polimerase (PCR) para a detecção do DNA viral. Se ocorre a progressão para a hepatite crônica e a replicação viral ainda estiver acontecendo, os resultados para HBeAg e HBV-DNA são positivos, caso contrário, o resultado para HBV-DNA é negativo. Além disso, a biópsia hepática, apesar de ser invasiva, auxilia no diagnóstico, pois permite avaliar a evolução da doença. (Ferreira 2000)

A vacina de prevenção à hepatite B é preparada a partir de HBsAg purificado produzido em levedura e induz uma resposta protetora de anticorpos anti-HBs em mais de 95% dos casos. (Kumar et al. 2010)

### *Hepatite C*

O vírus da hepatite C (HCV) foi descoberto em 1989 como um membro da família *Flaviridae*. Diferentemente do HBV, é um vírus de RNA pequeno, envelopado e de fita única. O HCV é inerentemente instável, originando múltiplos genótipos e subtipos. Esta instabilidade genômica e a variabilidade antigênica são os fatores que impedem o desenvolvimento de uma vacina de prevenção ao HCV. Esse vírus afeta aproximadamente 170 milhões de pessoas ao redor do mundo, sendo relacionado ao desenvolvimento de câncer de fígado (carcinoma hepatocelular) em vários países. Dos mais de 500 mil casos que ocorrem todo ano de carcinoma hepatocelular, 22% decorrem da infecção por HCV. Sendo assim, essa doença é de importância global que requer eficientes métodos de prevenção e controle. (Kumar et al. 2010; Lavanchy 2011)

Os fatores de risco mais comuns para infecção por HCV são:

- 1) Abuso de drogas intravenosas;
- 2) Múltiplos parceiros sexuais;
- 3) Realização de cirurgia nos últimos 6 meses;
- 4) Acidente com material biológico;
- 5) Atividade profissional na área médica ou odontológica. (Kumar et al. 2010)

Ao contrário do HBV, o HCV não gera uma resposta adequada do organismo, o que ocasiona menos sintomas na fase aguda, mas também faz



com que a doença evolua mais facilmente para a fase crônica. Cerca de 80% dos casos evoluem para hepatite crônica, 10 a 20% desenvolvem complicações como cirrose ao longo de duas a três décadas após a infecção, e 1 a 5% desenvolvem carcinoma hepatocelular. (Conry-Cantilena 1997; Kumar et al. 2010; Lavanchy 2011)

Similarmente ao HBV, o HCV também possui um período de incubação relativamente longo, que varia de 2 a 26 semanas. Na grande maioria dos indivíduos afetados (85%), o quadro clínico da fase aguda é assintomático e facilmente ignorado ou apresenta sintomas muito inespecíficos, como letargia, dores musculares e articulares. (Conry-Cantilena 1997; Kumar et al. 2010)

Na fase inicial da doença, ocorrem elevações dos níveis das aminotransferases séricas (ALT e AST), e o HCV-RNA é detectável no sangue por 1 a 3 semanas. Os anticorpos são detectados na fase aguda em apenas 50 a 70% dos casos; nos demais, os anticorpos anti-HCV surgem após 3 a 6 semanas. Apesar de infecção persistente e hepatite crônica serem as marcas registradas da infecção por HCV, a fase aguda do HCV é mais leve do que a do HBV. Os fatores que levam a infecção por HCV à cronicidade ainda não são bem compreendidos, mas se sabe que o vírus desenvolveu uma resistência à imunidade antiviral do hospedeiro. (Kumar et al. 2010)

Na infecção crônica, o HCV-RNA persiste em mais de 90% dos casos, apesar da presença de anticorpos neutralizantes. Sendo assim, para avaliar a replicação viral e confirmar o diagnóstico, deve ser realizado o teste de HCV-RNA. A insuficiência hepática fulminante raramente ocorre nas infecções por HCV. (Kumar et al. 2010)

O diagnóstico da hepatite C é frequentemente realizado por meio de imunoensaios empregados em laboratório e de testes rápidos que detectam o anticorpo anti-HCV, indicando contato prévio com o vírus. Além dos imunoensaios e dos testes rápidos, o teste molecular para detecção do HCV-RNA oferece uma alternativa para a detecção cada vez mais precoce da infecção pelo HCV e também para a confirmação dos casos anti-HCV reagentes. (Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. 2015)

### 3.4.3 Coinfecção Esquistossomose e Hepatites Virais B e C

Os dados sobre a coinfecção entre a esquistossomose e a hepatite B ou hepatite C são inconsistentes (Van-Lume et al. 2013).

Quando o paciente apresenta esquistossomose e hepatite B ou C, a progressão da fibrose hepática para cirrose e carcinoma hepatocelular pode ocorrer mais rapidamente do que quando só a hepatite viral está presente, e essa coinfecção é observada frequentemente em áreas endêmicas, como Egito e Brasil (Van-Lume et al. 2013; Kamal et al. 2004). Em Pernambuco, por exemplo, a prevalência da coinfecção varia de 3% para HBV a 7,4% para HCV entre pacientes ambulatoriais com esquistossomose do Hospital das Clínicas da UFPE (Silva et al. 2011).

Em alguns casos, a esquistossomose pode se apresentar assintomática, o que torna difícil o diagnóstico, muitas vezes descoberto por causa da infecção com HBV ou HCV. Como essa coinfecção agrava consideravelmente o estado do paciente, isto indica a urgente necessidade de um diagnóstico mais preciso e sensível.

### 3.4.4 Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) é uma condição clínico-patológica caracterizada por acúmulo de lipídios no interior dos hepatócitos e ausência de consumo excessivo de álcool, definido como > 210 g de etanol/semana para homem e > 140 g de etanol/semana para mulher. DHGNA abrange um amplo leque de doenças hepáticas, variando de simples esteatose macrovesicular a esteatohepatite, fibrose avançada e cirrose. (Sass et al. 2005; Hassan et al. 2014)

O enfoque deste estudo foi esteatose e esteatohepatite. Esteatose é a presença de lipídios dentro do citoplasma dos hepatócitos. Esteatohepatite, por sua vez, é definida como esteatose na presença de danos nos hepatócitos, inflamação e/ou subsequentes cicatrizes e substituição do tecido com colágeno tipo 1. Aproximadamente 10 a 29% dos pacientes com esteatohepatite desenvolverão cirrose em um período de 10 anos. (Hassan et al. 2014)

É possível ter essa doença em qualquer idade, etnia ou país, apesar de ser mais comum entre americanos descendentes de hispânicos e europeus do que americanos descendentes de africanos (essas diferenças podem estar relacionadas aos diferentes metabolismos de lipídios). (J.K. & J.W. 2011) Encontra-se usualmente associada com a obesidade e resistência à insulina, incluindo diabetes, e com outras características do metabolismo, como altos níveis de triglicerídeos e baixos níveis de colesterol HDL. A DHGNA é uma doença mais comum em homens, aumentando com a idade e após a menopausa das mulheres. (Cotrim et al. 2011)

Devido ao problema da obesidade ter se tornado uma epidemia entre os séculos XX e XXI, a DHGNA se tornou uma das doenças mais comuns e conhecidas mundialmente. Por exemplo, nos Estados Unidos, a DHGNA é a causa mais comum de doença hepática, representando mais de 75% das doenças hepáticas crônicas. Além disso, por poder evoluir para cirrose e carcinoma hepatocelular, é um indicativo da necessidade de transplante de fígado, contribuindo para a morbidade e a mortalidade desse país. (Hassan et al. 2014)

Helma *et al.* relataram que a DHGNA é comum na América Latina e não é uma doença exclusiva da população ocidental, uma vez que atingiu proporções epidêmicas entre japoneses adultos saudáveis ao redor do mundo. (Cotrim et al. 2011) No Brasil, segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), o sobrepeso em adultos passou de 51,1% em 2010 para 54,1% em 2014. Em 2010, 17,8% da população era obesa; em 2014, o índice chegou aos 20%, sendo a maior prevalência entre as mulheres, 22,7%. Estes dados devem alertar a sociedade e o governo devido aos impactos importantes na saúde, necessitando ser um tema prioritário.

O diagnóstico da DHGNA é altamente provável na presença de características como obesidade, diabetes e apneia obstrutiva do sono. Como a maioria dos pacientes são assintomáticos, a suspeita desse diagnóstico ocorre principalmente quando os níveis de atividade das aminotransferases encontram-se alterados nos exames de rotina. As aminotransferases são as enzimas que em condições normais residem dentro dos hepatócitos. Porém, quando há lesão hepática, essas células liberam as enzimas na corrente

sanguínea, elevando os níveis das aminotransferases no sangue, as quais podem ser detectadas facilmente. (J.K. & J.W. 2011)

A esteatose hepática é frequentemente diagnosticada através do exame de ultrassonografia. Quando apresenta sintomas, os mais comuns são desconforto no quadrante superior direito e fadiga, apesar deste último também ser causado por apneia obstrutiva do sono, que é tipicamente observada na população obesa com DHGNA. Hepatomegalia é o achado clínico mais comum, e os sinais de doença hepática crônica raramente estão presentes na ausência de cirrose. (J.K. & J.W. 2011) Apesar da ultrassonografia ser um teste comumente usado em pacientes com suspeita da DHGNA, a presença de obesidade mórbida reduz consideravelmente a sensibilidade e a especificidade do resultado. Isto acontece porque o ultrassom não é capaz de determinar acuradamente a quantidade de gordura presente ou fornecer o estágio da doença. Além disso, é um exame que depende do operador, fato que aumenta a variabilidade dos resultados. (J.K. & J.W. 2011)

Após o diagnóstico de DHGNA, o próximo passo é determinar a gravidade da doença, pois isso é importante para o prognóstico. Apesar dos avanços promissores no surgimento de métodos não invasivos, a biópsia hepática ainda é considerada o “padrão-ouro” no diagnóstico, com determinação da atividade necroinflamatória, localização e grau da fibrose. (Nalbantoglu & Brunt 2014) Basicamente, há dois aspectos que devem ser considerados: (i) o nível de fibrose e (ii) o nível de inflamação. Como já foi dito anteriormente, esteatose é o acúmulo de triglicerídeos nos hepatócitos, enquanto esteatohepatite inclui lesão hepatocelular, caracterizada por hepatócitos balonizados, com inflamação e presença ou não de fibrose. Anormalidades mitocondriais podem estar presentes na esteatohepatite, mas raramente na esteatose. (J.K. & J.W. 2011) O escore de atividade baseado na diretriz *NASH Clinical Research Network* é bem estabelecido e foi o método utilizado neste estudo. Ele baseia-se no grau de esteatose (0 a 3), inflamação lobular (0 a 3), balonização (0 a 2), e fibrose (0 a 4). Uma soma  $\geq 5$  sugere ou define a presença de esteatohepatite, e  $<3$  indica que esteatohepatite não está presente. (Nishida et al. 2012). Assim, uma soma entre 3 e 4 constitui uma zona cinza que necessita ser melhor definida usando outras ferramentas diagnósticas. Além disso, apesar da biópsia hepática ser o “padrão ouro” para

o diagnóstico de esteatohepatite, é um método invasivo, de alto custo, sujeito a erros de amostragem e de variação do observador (Alkhoury & McCullough 2012).

Devido à alta incidência de DHGNA ao redor do mundo, muitos estudos vêm sendo realizados a fim de desenvolver métodos não invasivos (potenciais biomarcadores), confiáveis e que possam assegurar precisamente a presença de esteatohepatite sem a necessidade de biópsia hepática. (Alkhoury & McCullough 2012) Há diversas abordagens para a identificação de biomarcadores: (i) o uso de marcadores clínicos ou bioquímicos derivados de grandes estudos de associação, como índice de massa corpórea e resistência à insulina; (ii) o uso de algoritmos, incluindo marcadores de inflamação/morte celular gerados pelo conhecimento da fisiopatologia da doença; (iii) a terceira e última abordagem é baseada nas novas tecnologias “ômicas”, como genômica, proteômica e metabonômica, que são investigações imparciais das mudanças nas vias metabólicas em doenças complexas como DHGNA. (Fitzpatrick & Dhawan 2014; Alkhoury & McCullough 2012)

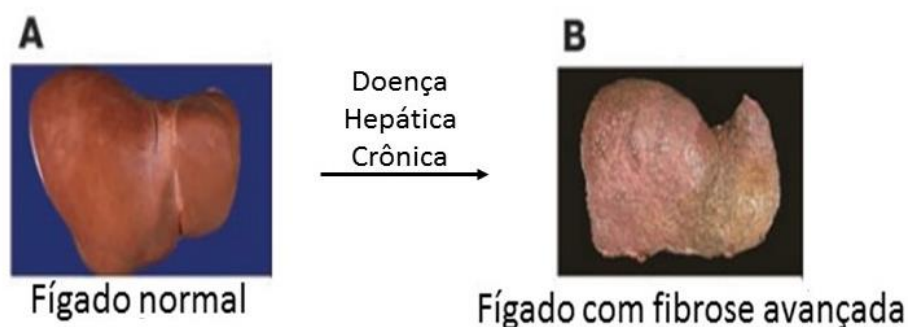
#### 3.4.5 Fibrose Hepática

A fibrose pode ser definida como o acúmulo excessivo ou anormal da matriz extracelular, particularmente de colágenos fibrilares, sendo um dos principais componentes de muitas doenças inflamatórias e metabólicas, incluindo doença hepática avançada. Após a lesão, os tecidos danificados induzem a produção excessiva da matriz extracelular ao invés dos processos reparadores homeostáticos que restauraram a integridade, a estrutura e a função do órgão lesionado. (Nanthakumar et al. 2015)

A fibrose é uma característica comum da maioria das doenças crônicas, sendo especialmente importante nas doenças do pulmão, fígado, coração, rins e pele (Nanthakumar et al. 2015).

No fígado, acredita-se que a fibrose é uma resposta à lesão hepática crônica (Figura 38). O fígado possui uma elevada capacidade de regeneração, porém, a fibrose hepática pode resultar em cirrose e consequente falha de regeneração do órgão, que pode requerer transplante. (Nanthakumar et al. 2015)

**Figura 38.** Mudanças no fígado pela fibrose após doença hepática crônica.



Fonte: (Bataller & Brenner 2005).

O conhecimento da presença e do estágio da fibrose hepática é de crucial importância para as decisões terapêuticas e para prever os resultados clínicos. Historicamente, a biópsia hepática é o exame de referência na avaliação do estágio de fibrose, sendo geralmente classificado pela escala METAVIR, que vai de F0 (sem fibrose) a F4 (cirrose). A histologia de um fragmento hepático permite obter informação diagnóstica não somente sobre fibrose, mas também sobre inflamação, necrose, esteatose, e depósitos de ferro ou cobre. Entretanto, a biópsia é um procedimento invasivo, podendo ocasionar dor e maiores complicações, como sangramento. Além disso, possui um pequeno, porém significativo risco de mortalidade: 0,009-0,12%. Erros de amostragem podem ocorrer, principalmente quando são analisados pequenos fragmentos de tecido hepático. Portanto, há uma necessidade de métodos não invasivos confiáveis e simples para a avaliação do grau de fibrose. (Bataller & Brenner 2005; Papastergiou et al. 2012)

Os métodos não invasivos para detectar e quantificar fibrose hepática podem ser divididos em dois grupos: marcadores sorológicos e técnicas de imagem. Os marcadores sorológicos estão em constante evolução e são classificados como diretos, onde representam os componentes da matriz extracelular (refletindo a fisiopatologia da fibrogênese); e indiretos, onde utilizam dados laboratoriais de rotina (mostrando as consequências dos danos no fígado). (Papastergiou et al. 2012)

Devido à má precisão dos marcadores individuais para avaliar fibrose hepática, foram desenvolvidos e amplamente validados algoritmos ou índices que combinam marcadores. Entre eles estão os índices APRI (do inglês, *ALT to*

*Platelet Ratio Index*) e FIB-4 (do inglês, *Fibrosis-4*), que são calculados a partir das Equações 32 e 33, respectivamente.

Equação 30 
$$APRI = \frac{AST}{Plaquetas} \times 100$$

Equação 31 
$$FIB - 4 = \frac{idade \times AST}{Plaquetas \times \sqrt{ALT}}$$

onde AST é o nível sérico de aspartato aminotransferase em unidades normalizadas por litro, dividido pela contagem de plaquetas em  $10^9$  unidades por litro, e ALT é o nível sérico de alanina aminotransferase em unidades normalizadas por litro. O APRI e o FIB-4 se relacionam com a escala METAVIR através dos seguintes pontos de corte: APRI acima de 1,25 indica fibrose significativa (F2-F4) e o FIB-4 acima de 3,25 indica fibrose avançada (F3-F4). (Papastergiou et al. 2012)

A fibrose hepática também pode ser determinada por técnicas de imagem, como ultrassonografia, tomografia computadorizada, e MRI (do inglês, *Magnetic Resonance Imaging*), que podem detectar mudanças no parênquima hepático causadas por fibrose moderada a avançada. Devido ao seu baixo custo, a ultrassonografia é uma técnica muito utilizada. Ela é capaz de detectar cirrose hepática com base nas mudanças na ecogenicidade e na nodularidade do fígado, bem como sinais de hipertensão portal. Entretanto, a ultrassonografia é totalmente dependente do operador, e a presença de um aumento na ecogenicidade hepática não diferencia de forma confiável a esteatose hepática da fibrose, por exemplo. (Bataller & Brenner 2005; Papastergiou et al. 2012)

## **4 DISCRIMINAÇÃO ENTRE ESTEATOSE E ESTEATOHEPATITE**

### **4.1 Objetivos Específicos**

Construir modelos metabonômicos a partir da análise de RMN de  $^1\text{H}$  de amostras de soro sanguíneo com a finalidade de diferenciar entre pacientes portadores de esteatose e pacientes portadores de esteatohepatite;

### **4.2 Metodologia**

#### **4.2.1 Amostras**

Foram estudados pacientes obesos com DHGNA submetidos à cirurgia bariátrica no Hospital das Clínicas da UFPE e em três hospitais particulares do Recife, no período de novembro de 2015 a maio de 2016. Todos os pacientes concordaram em participar e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Humanos do Centro de Ciências da Saúde da UFPE (número do parecer: 815.390).

Para participarem do estudo, os voluntários preencheram os seguintes critérios:

1. Idade maior que 18 anos;
2. Consumo de álcool  $\leq 20$  g/dia para mulheres e  $\leq 30$  g/dia para homens;
3. Não possuir outras formas de doença hepática;
4. Não usar qualquer medicação que cause esteatose.

A amostra de sangue foi coletada em jejum, antes da indução anestésica, no dia em que o paciente se submeteu ao procedimento cirúrgico. O material coletado foi centrifugado e estocado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  no Hospital das Clínicas até a análise de RMN de  $^1\text{H}$  na Central Analítica do Departamento de Química Fundamental da UFPE. Dessa forma, evitou-se ciclos desnecessários de congelamento e descongelamento, reduzindo assim a possibilidade de degradação de metabólitos e a introdução de erros sistemáticos no perfil metabólico. Na biópsia, por sua vez, o material coletado foi fixado em formol e encaminhado para análise histopatológica para determinar a gravidade da



doença segundo Escore de Atividade da Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica.

#### 4.2.2 Aquisição dos espectros de RMN de $^1\text{H}$

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  foram obtidos na Central Analítica do DQF-UFPE, utilizando um espectrômetro Varian Unity Plus operando a 300 MHz e tubos com 5 mm de diâmetro. As amostras continham 400  $\mu\text{l}$  de soro e 200  $\mu\text{l}$  de clorofórmio deuterado ( $\text{D}_2\text{O}$ ). O sinal atribuído à metila do lactato ( $\delta$  1,33 ppm) foi utilizado como referência de deslocamento químico.

Após a homogeneização, foi utilizada a sequência de pulsos PRESAT/CPMG para a supressão do sinal da água e como filtro de relaxação transversal ( $T_2$ ) para eliminar os sinais de alta massa molar. Os seguintes parâmetros foram empregados: janela espectral de 4,8 kHz, tempo de espera (*delay*) de 2 segundos, tempo de aquisição de 1,704 s, pulso de RF de  $90^\circ$ , temperatura de  $25^\circ\text{C}$ , 88 ciclos, *tau* igual a 0,0004 s, *bigtau* igual a 0,07 s e 128 repetições. Os espectros foram processados usando *line broadening* igual a 0,3 Hz. A linha de base e a fase foram corrigidas manualmente.

Com o software MestreNova 9.0, foi realizada a divisão da região espectral entre  $\delta$  8,00 e 0,04 ppm em 185 bins com largura de 0,04 ppm (a região entre  $\delta$  5,20 e 4,56 ppm foi excluída).

Foi construída uma matriz linha para cada amostra. As matrizes linhas das amostras foram todas agrupadas em uma única matriz com 39 linhas (casos) e 186 variáveis (185 bins mais a variável de classe), e esta matriz foi submetida à análise multivariada (Figura 39).

**Figura 39.** Matriz de bins para construção dos modelos metabonômicos, onde E é esteatose e EH é esteatohepatite.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	
	Amostra	Grupo	0,04	0,08	0,12	0,16	0,2	0,24	0,28	0,32	0,36	0,4	0,44	0,48	0,52	0,56	0,6	0,64	0,68	0,72	0,76	
1	A03	E	-0,07932	-0,07852	-0,07954	-0,07903	-0,07908	-0,07928	-0,07955	-0,07833	-0,07834	-0,07836	-0,07741	-0,07718	-0,07694	-0,07587	-0,07484	-0,07288	-0,07131	-0,06897	-0,06689	
2	A4	E	-0,07135	-0,07129	-0,07131	-0,0714	-0,07138	-0,07136	-0,07134	-0,07123	-0,07123	-0,0712	-0,07113	-0,07109	-0,07102	-0,071	-0,07094	-0,07079	-0,07048	-0,07009	-0,069	
3	A5	E	0,085935	0,08912	0,084795	0,085496	0,086323	0,086278	0,087745	0,089176	0,08982	0,090461	0,092603	0,093977	0,09533	0,098349	0,10144	0,105929	0,110435	0,11534	0,125	
4	A09	E	-0,1432	-0,1417	-0,14387	-0,14398	-0,14293	-0,14276	-0,1428	-0,14263	-0,14312	-0,14213	-0,14099	-0,14032	-0,13969	-0,13819	-0,13703	-0,13436	-0,131	-0,12743	-0,1	
5	A10	E	-0,11726	-0,1156	-0,11699	-0,11556	-0,11562	-0,11517	-0,11469	-0,11306	-0,1126	-0,11231	-0,11039	-0,10926	-0,10808	-0,1053	-0,10282	-0,09803	-0,09269	-0,08771	-0,07	
6	A11	E	-0,07248	-0,07204	-0,07247	-0,07254	-0,0726	-0,07251	-0,07248	-0,07248	-0,07246	-0,07242	-0,07244	-0,07236	-0,0722	-0,07219	-0,07209	-0,07189	-0,07137	-0,07116	-0,0	
7	A12	E	-0,11827	-0,11432	-0,11641	-0,11771	-0,11682	-0,11614	-0,11598	-0,11571	-0,11454	-0,11437	-0,11299	-0,11155	-0,1105	-0,10975	-0,10747	-0,10493	-0,09981	-0,09479	-0,0	
8	A14	E	-0,05112	-0,04925	-0,05208	-0,05149	-0,0508	-0,05038	-0,05017	-0,04896	-0,0486	-0,04746	-0,04559	-0,04518	-0,04363	-0,04154	-0,0385	-0,03438	-0,03038	-0,02602	-0,01	
9	A19	E	-0,15242	-0,14981	-0,14872	-0,15198	-0,15183	-0,15228	-0,15207	-0,15264	-0,15337	-0,15312	-0,15312	-0,15483	-0,15457	-0,15472	-0,15575	-0,15656	-0,15596	-0,15451	-0,15	
10	A20	E	-0,07432	-0,07423	-0,07425	-0,07425	-0,07425	-0,07416	-0,07418	-0,07404	-0,07405	-0,07396	-0,07385	-0,07374	-0,07361	-0,07342	-0,0733	-0,07293	-0,0724	-0,07186	-0,07	
11	A23	E	-0,43881	-0,42333	-0,4271	-0,42537	-0,42258	-0,40977	-0,40429	-0,3938	-0,38605	-0,36144	-0,35733	-0,3325	-0,31377	-0,28427	-0,25528	-0,19291	-0,12961	-0,07515	0,055	
12	A27	E	-0,11042	-0,10951	-0,69328	-0,10917	-0,11057	-0,11029	-0,11067	-0,1094	-0,10853	-0,10872	-0,1077	-0,10771	-0,10618	-0,10387	-0,10366	-0,1005	-0,09428	-0,09132	-0,08	
13	A28	E	-0,05479	-0,05061	-0,0535	-0,05557	-0,05603	-0,05592	-0,05651	-0,05627	-0,05548	-0,05556	-0,05511	-1,24113	-0,05481	-0,05492	-0,0531	-0,05045	-0,04732	-0,04575	-0,04	
14	A29	E	-0,10682	-0,08639	-0,09913	-0,11037	-0,11062	-0,1099	-0,1101	-0,10841	-0,10797	-0,10772	-0,10628	-0,10569	-0,10497	-0,10327	-0,10066	-0,09747	-0,09416	-0,08986	-0,08	
15	A30	E	-0,07937	-0,07802	-0,07877	-0,07937	-0,07948	-0,0794	-0,07931	-0,0793	-0,07927	-0,07914	-0,07908	-0,07909	-0,07892	-0,07875	-0,07852	-0,07825	-0,0778	-0,07728	-0,07	
16	A31_2	E	-0,39203	-0,2014	-0,33794	-0,42555	-0,42982	-0,42436	-0,41563	-0,41234	-0,39309	-0,39395	-0,38212	-0,37059	-0,35056	-0,33826	-0,31443	-0,2784	-0,23965	-0,19656	-0,12	
17	A33	EH	-0,47868	-0,37172	-0,45281	-0,49292	-0,49872	-0,49577	-0,48612	-0,48579	-0,47835	-0,46127	-0,45522	-0,4438	-0,43611	-0,41947	-0,39737	-0,36438	-0,32531	-0,2855	-0,22	
18	A34_2	EH	-12,6324	0,064156	0,053986	0,049362	0,049057	0,048043	0,0472	0,047923	0,047854	0,046839	0,046753	0,045133	0,044663	0,046037	0,046177	0,047195	0,048252	0,047918	0,04	
19	A35	E	-0,15273	-0,14204	-0,14732	-0,15415	-0,15407	-0,15415	-0,15372	-0,15328	-0,15263	-0,153	-0,15255	-0,15159	-0,15051	-0,14938	-0,14831	-0,14676	-0,14398	-0,14164	-0,13	
20	A36	E	-0,04255	-0,02027	-0,03354	-0,04209	-0,04362	-0,04368	9,465587	-0,04347	-7,10337	-0,04313	-0,04364	-0,04308	-0,0433	-0,04325	-0,04285	-0,0424	-0,04068	-0,03918	-0,03739	-0,03
21	A37	E	-0,43883	-0,39238	-0,44274	-0,44592	-0,43413	-0,4306	-0,42724	-0,41471	-0,41337	-0,39722	-0,38462	-0,37691	-0,35929	-0,33451	-0,30742	-0,26814	-0,20769	-0,15768	-0,06	

### 4.2.3 Análise estatística multivariada

Na etapa de pré-processamento, foi utilizado SNV nas amostras e autoescalamiento nas variáveis, ambos realizados pelo programa *MATLAB R2015b* através da *PLS-Toolbox* versão 8.2.1. Os formalismos PCA, PLS-DA e OPLS-DA foram realizados também através da *PLS-Toolbox*, sendo utilizada a validação cruzada LOOCV para validar os modelos.

## 4.3 Resultados e Discussão

A Tabela 2 mostra as características clínicas e laboratoriais dos dois grupos (esteatose e esteatohepatite). Não foram observadas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos.

**Tabela 2.** Níveis séricos das enzimas hepáticas, ferritina, glicose e insulina dos pacientes com esteatose (n=31) e esteatohepatite (n=8).

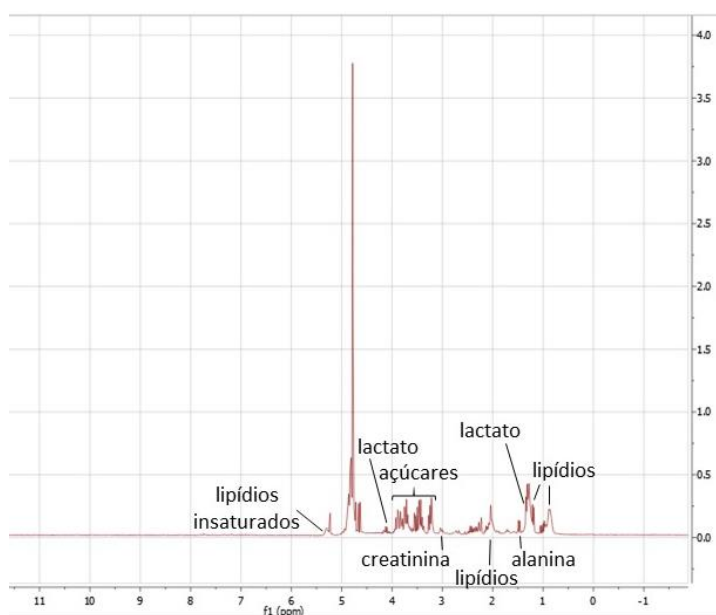
Características	Esteatose (n = 31)		Esteatohepatite (n = 8)		Valor de p
<b>ALT (UI/L)</b>	32,21	(23,00-41,42)	22,11	(1,51-42,71)	0,102
<b>AST (UI/L)</b>	45,52	(27,41-63,62)	37,00	(15,29-58,71)	0,991
<b>Ferritina (ng/mL)</b>	287,40	(167,66-497,14)	160,60	(62,62-258,58)	0,552
<b>Glicose (mg/dL)</b>	113,39	(98,52-128,27)	108,67	(91,75-125,59)	0,827
<b>Insulina (UI/mL)</b>	15,69	(11,31-20,27)	20,48	(5,99-34,97)	0,881

Os dados foram apresentados como os valores medianos e os intervalos interquartílicos (entre parênteses). O valor de  $p$  foi obtido através do Teste de Mann-Whitney.

Serão apresentados os modelos construídos com amostras de soro sanguíneo para a discriminação entre esteatose e esteatohepatite. O mérito desta abordagem é devido ao fato de que a partir de uma única amostra de sangue do paciente com DHGNA é possível diferenciar quem possui apenas esteatose de quem tem esteatohepatite.

Na Figura 40, pode-se ver um exemplo de espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de soro sanguíneo de um paciente com esteatose. Visualmente, não é possível diferenciar entre as amostras de esteatose e de esteatohepatite, pois os espectros são bem similares.

**Figura 40.** Espectro de RMN (300 MHz) de  $^1\text{H}$  de soro sanguíneo após as sequências de pulsos PRESAT e CPMG.



A partir da análise exploratória PCA, não foi possível identificar uma distinção entre as classes, porém, foram identificadas duas amostras anômalas (uma de cada grupo) e elas foram excluídas da análise.

Foram construídos modelos PLS-DA e OPLS-DA, porém, os resultados da OPLS-DA foram mais satisfatórios.

A Tabela 3 apresenta a tabela de contingência fornecida pelo MATLAB após a validação cruzada.

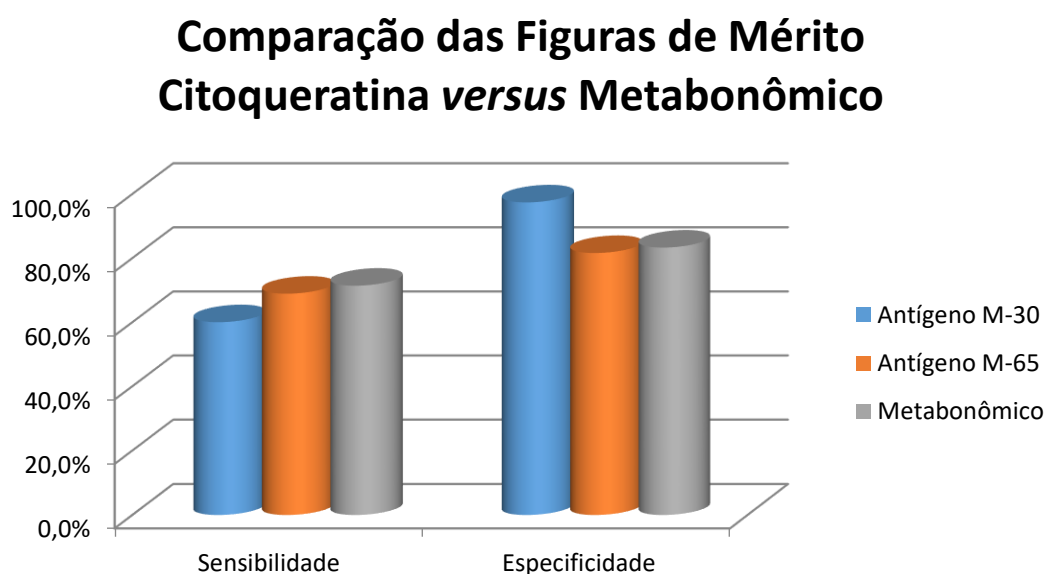
**Tabela 3.** Tabela de contingência para o modelo esteatose *versus* esteatohepatite.

		Classes verdadeiras	
		EH	E
Modelo Metabonômico	EH	5	5
	E	2	25
Total		7	30

Apesar dos dois grupos serem constituídos de pacientes com DHGNA, neste estudo optou-se por calcular os valores de sensibilidade e especificidade considerando o estágio mais avançado, a esteatohepatite. Sendo assim, a partir dessa tabela foi possível obter valores de exatidão, sensibilidade e especificidade iguais a 81,1%, 71,4% e 83,3%, respectivamente.

Atualmente, o marcador citoqueratina-18 é considerado como uma das estratégias minimamente invasivas mais eficientes na discriminação entre esteatose e esteatohepatite (Shen et al. 2012). Em um estudo com 83 pacientes, a primeira forma deste marcador (antígeno-M30) apresentou sensibilidade e especificidade iguais a 60,0% e 97,4%, respectivamente, enquanto os valores da segunda forma (antígeno-M65) foram 68,9% e 81,6%, respectivamente, para o diagnóstico de esteatohepatite (Yilmaz et al. 2007). Enquanto que os resultados obtidos pelo modelo metabonômico neste estudo foram: 71,4% de sensibilidade e 83,3% de especificidade para o diagnóstico de esteatohepatite. Na Figura 41, observa-se que, apesar de ser um estudo piloto, o modelo metabonômico aqui construído mostrou resultados próximos aos observados usando citoqueratina-18 (nos dois antígenos considerados pelos autores) e que possui, portanto, potencial para ser utilizado como ferramenta de diagnóstico diferencial para esteatohepatite.

**Figura 41.** Comparação das figuras de mérito do modelo proposto por Shen et al (2012) com o estudo piloto que estamos propondo.



Há, na literatura, outros relatos de investigações para identificar biomarcadores para esteatohepatite. Li *et al.* realizaram um estudo a fim de descobrirem biomarcadores para um diagnóstico precoce não invasivo da DHGNA envolvendo pacientes saudáveis (controle), com esteatose e com esteatohepatite, e encontraram quatro potenciais biomarcadores: glicose, lactato, glutamato/glutamina e taurina. (H. Li et al. 2011)

Klein *et al.*, em um estudo utilizando camundongos como modelo animal para discriminar entre esteatose e esteatohepatite, relataram que a quantidade de lipídios encontrada estava elevada nos dois grupos, não sendo o fator responsável pela discriminação entre eles. Os metabólitos identificados como discriminantes foram: betaína, glicose, taurina, isoleucina, lactato, leucina e valina. Segundo este estudo, a taurina é um metabólito interessante uma vez que provou ser eficaz no tratamento para gordura no fígado de camundongos e crianças. Os seus níveis foram encontrados elevados no grupo de esteatose. Os autores também relataram que as concentrações de lactato foram significativamente menores no grupo de esteatohepatite quando comparadas às observadas em camundongos com esteatose, indicando que a quantidade de glicose nas células estava acima do normal no último grupo. (Klein et al. 2011)

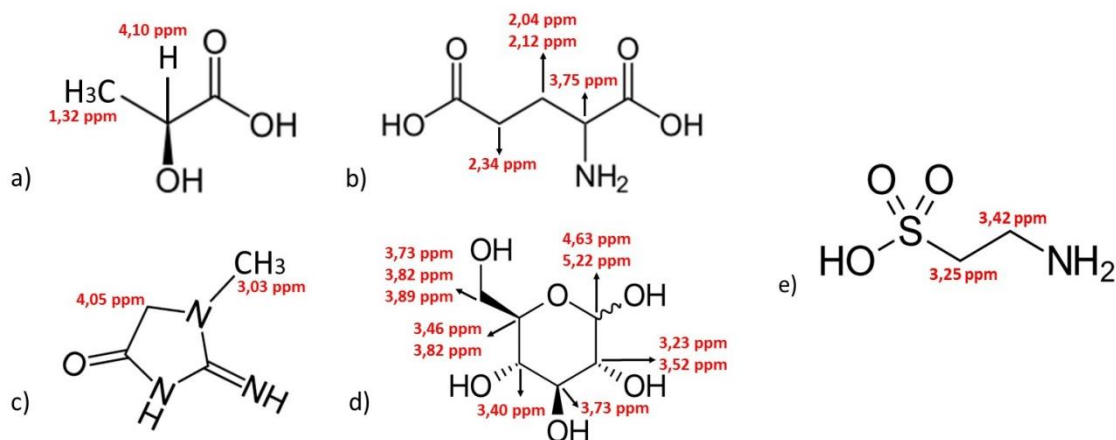
De acordo com a literatura, a regulação da glicose depende de uma variedade de fatores e pode ser modificada à medida que a doença progride. Há estudos indicando uma alta associação de DHGNA com resistência à insulina e, conseqüentemente, com um metabolismo anormal da glicose. (Gaggini et al. 2013)

O glutamato, por exemplo, está associado com a obesidade, pois ele danifica a regulação hipotalâmica do apetite. (Hermanussen et al. 2006) Sabe-se que a obesidade e o sobrepeso estão relacionados às doenças hepáticas gordurosas não alcoólicas. Como a esteatohepatite é a progressão da esteatose dentro da DHGNA, é esperado que os pacientes com esteatohepatite apresentem níveis mais elevados de glutamato que os com esteatose.

Estudos relatam que a presença de níveis elevados de creatinina no sangue configura diminuição da função renal ou até mesmo insuficiência renal. Sabe-se que a doença renal crônica é uma condição que frequentemente está associada com a insuficiência renal. Em um estudo realizado por Musso *et al.*, constatou-se que a presença de DHGNA está associada com um aumento do risco e da gravidade da doença renal crônica. (Musso et al. 2014)

A partir desses relatos, temos potenciais biomarcadores para diferenciar esteatose de esteatohepatite. As estruturas, com o deslocamento químico, são apresentadas na Figura 42. Os sinais foram atribuídos de acordo com a base de dados do HMDB (*Human Metabolome Database*). (Wishart et al. 2009)

**Figura 42.** Estrutura química dos principais candidatos a biomarcadores para o diagnóstico diferencial de esteatose e esteatohepatite. Em destaque, o deslocamento químico. a) lactato; b) glutamato; c) creatinina; d) glicose e e) taurina.

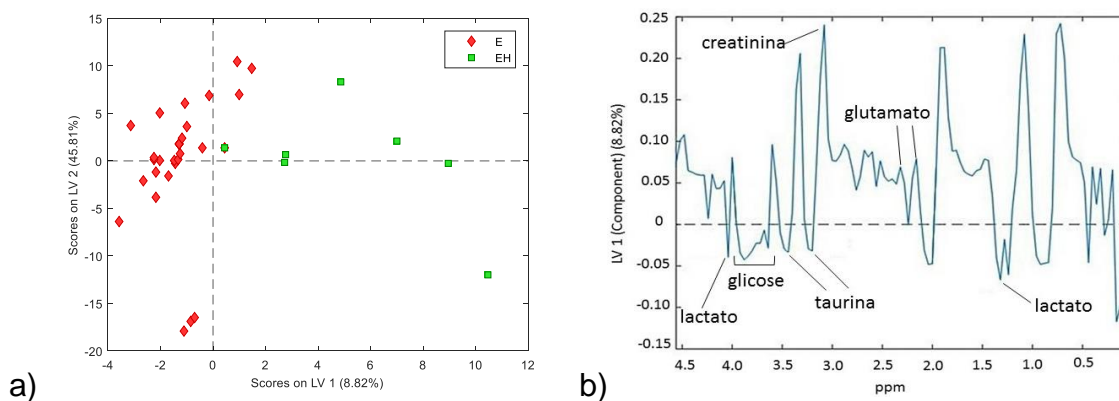


Autoria própria.

De acordo com os diferentes relatos apresentados, devem-se observar níveis mais elevados de glutamato e creatinina entre aqueles com quadro de esteatohepatite, enquanto os níveis séricos de lactato, glicose e taurina devem ser menores neste grupo.

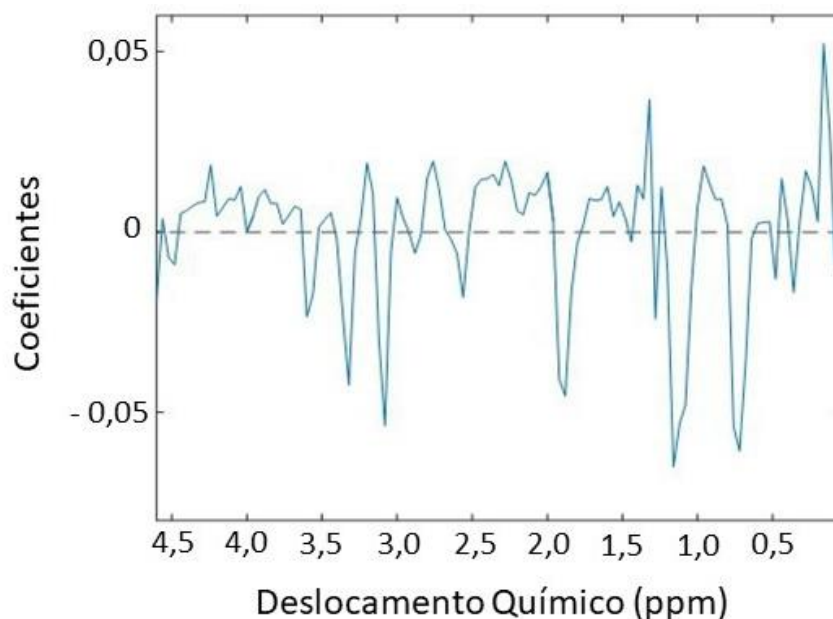
A Figura 43 apresenta os escores e os pesos obtidos a partir do formalismo OPLS-DA. Esse modelo foi validado por LOOCV, sendo indicado que o número ideal de variáveis latentes a ser utilizado é igual a 3 (variância acumulada de 63,16%), e foi obtido um valor de  $R^2$  igual a 0,75. Observa-se, na Figura 43a, que a componente 1 é a responsável pela separação entre os grupos.

**Figura 43.** Resultados da OPLS-DA. a) Escores discriminando entre os pacientes com esteatose e os com esteatohepatite; b) Gráfico de pesos (*loadings*) da primeira variável latente.



No gráfico de escores (Figura 43a), observa-se uma dispersão maior entre os portadores de esteatohepatite, enquanto os portadores de esteatose estão mais próximos e, em sua maioria, com escores negativos. No gráfico de pesos (Figura 43b), a região espectral que contém os sinais atribuídos ao grupo metila da creatinina ( $\delta$  3,03 ppm), metilenos e metinos dos candidatos a biomarcadores tem pesos positivos. Por outro lado, a região que contém os sinais atribuídos ao lactato (metila  $\delta$  1,33 ppm e metino  $\delta$  4,10 ppm) e à taurina ( $\delta$  3,25 e 3,42 ppm) tem peso negativo. Os escores negativos observados para os portadores de esteatose são devidos aos níveis séricos mais intensos de lactato e taurina para este grupo. Além disso, o vetor de regressão da OPLS-DA indica contribuição relevante para a discriminação vinda a partir dos bins centrados em  $\delta$  3,42; 3,03; 1,90; 1,25; e 0,70 ppm, de forma semelhante à descrita anteriormente. (Figura 44) Esses resultados são congruentes com os estudos relatados por Klein e colaboradores (2011) e Li e colaboradores (2011), e estão resumidos na Tabela 4.

**Figura 44.** Gráfico obtido a partir do vetor de regressão do modelo OPLS-DA.



**Tabela 4.** Possíveis metabólitos responsáveis pela discriminação entre os grupos.

	Lactato	Glutamato	Creatinina	Glicose	Taurina
Esteatose	↑	↓	↓	↑	↑
Esteatohepatite	↓	↑	↑	↓	↓

#### **4.4 Conclusão**

O objetivo desta etapa do trabalho foi construir um modelo metabonômico capaz de diferenciar pacientes com esteatose de pacientes com esteatohepatite.

Uma vez que o diagnóstico de esteatohepatite é feito a partir de biópsia hepática, uma estratégia invasiva, o modelo metabonômico construído nesse estudo se mostrou relevante, pois a partir de uma estratégia não invasiva obteve valores de sensibilidade e especificidade de 71,4% e 83,3%, respectivamente. Comparando com o marcador citoqueratina 18, que é considerado uma das estratégias não invasivas mais eficientes na discriminação entre esteatose e esteatohepatite, os resultados obtidos neste estudo são semelhantes. Isso mostra o potencial que a metabonômica possui de discriminar entre esteatose e esteatohepatite a partir de uma única amostra de sangue do paciente.

É importante ressaltar que este modelo fez parte de um estudo piloto realizado para avaliar a possibilidade de utilizar a estratégia metabonômica na diferenciação entre esteatose e esteatohepatite, uma vez que o tradicional método utilizado (biópsia) é bastante invasivo e há um interesse crescente em substituí-lo.

#### **4.5 Perspectivas**

- Ampliar o número de amostras, visando ter um grupo de calibração e outro de teste, para consolidar os resultados obtidos no estudo preliminar;
- Construir modelos metabonômicos capazes de diferenciar entre os diferentes graus de fibrose dos pacientes com DHGNA.



## **5 DIAGNÓSTICO DE ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA**

### **5.1 Objetivos Específicos**

Construir modelos metabonômicos a partir de dados espectrais de RMN de  $^1\text{H}$  de amostras de soro sanguíneo para discriminar pacientes com hepatite viral B ou C de pacientes coinfectados com esquistossomose.

### **5.2 Metodologia**

#### **5.2.1 Características dos Pacientes**

Este estudo incluiu 40 pacientes na faixa etária entre 21 e 82 anos atendidos no ambulatório de Hepatologia do Hospital das Clínicas da UFPE de Outubro/2012 a Maio/2016. Eles foram divididos em dois grupos: 18 pacientes coinfectados com esquistossomose hepática e hepatite B ou C e 22 pacientes monoinfectados com HBV ou HCV.

No grupo dos coinfectados, 7 pacientes apresentavam infecção crônica pelo HBV (38,9%) e 11 pelo HCV (61,1%); enquanto no grupo dos monoinfectados, 17 eram infectados crônicos pelo HBV (77,3%) e 5 pelo HCV (22,7%). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Humanos do Centro de Ciências da Saúde da UFPE (número do parecer: 1.782.771), e todos os pacientes concordaram em participar após leitura e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

O diagnóstico da esquistossomose foi baseado na história clínica de contato com fonte de água doce de áreas endêmicas e/ou relatos de tratamento prévio da esquistossomose e fibrose periportal, que, por sua vez, foi confirmada através de ultrassonografia. Os exames de ultrassonografia foram realizados pelo mesmo operador experiente, utilizando um equipamento *Siemens Acuson X150*<sup>®</sup> com um transdutor convexo de 3,5 MHz.

A infecção crônica por hepatite foi diagnosticada pela positividade do antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg), e anticorpo do core da hepatite B (anti-HBc), ou pela presença de anticorpos anti-HCV, por mais de 6 meses. A técnica de detecção utilizada foi quimioluminescência (CMIA – Architect/Abbott

Diagnostics, Wiesbaden, Alemanha), realizada no Laboratório Central do Hospital das Clínicas da UFPE.

Os pacientes com esteatose, esteatohepatite, síndrome de imunodeficiência adquirida, hepatite autoimune, hepatopatia metabólica, neoplasia, alcoolismo (consumo de etanol > 210 g/semana em homens e 140 g/semana em mulheres) e recebendo qualquer tratamento antiviral foram excluídos deste estudo.

#### 5.2.2 Coleta das amostras e análise laboratorial

O soro do sangue de todos os pacientes foi coletado e foram determinados os níveis séricos de alanina e aspartato aminotransferase (ALT e AST), gama-glutamil transferase (GGT), fosfatase alcalina (ALP), e o perfil lipídico (colesterol total, colesterol HDL e LDL, e triglicerídeos). Uma alíquota do soro foi armazenada a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a análise de RMN ser realizada.

#### 5.2.3 Análise estatística univariada

A fim de investigar a distribuição de dados laboratoriais, demográficos e clínicos entre os grupos, foram realizados testes de estatística univariada utilizando o software *GraphPad Prism 6* (*GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA*) como o teste *t* de Student não pareado, teste de *Mann-Whitney* e o teste exato de *Fisher*. Um valor de  $p < 0,05$  foi definido como o nível de significância estatística.

#### 5.2.4 Aquisição dos espectros de RMN de $^1\text{H}$

As amostras de soro foram preparadas com 400  $\mu\text{l}$  de soro e 200  $\mu\text{l}$  de  $\text{D}_2\text{O}$ , utilizando o sinal atribuído à metila do lactato ( $\delta$  1,33 ppm) como sinal de referência. Todos os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  foram obtidos em um espectrômetro Varian Unity Plus operando a 300 MHz, utilizando tubos de RMN com 5 mm. Após a homogeneização, o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  foi obtido utilizando a sequência de pulsos PRESAT-CPMG, para a supressão do sinal

da água e uso de filtro de relaxação transversal ( $T_2$ ) para eliminar os sinais das espécies de alta massa molar.

Os seguintes parâmetros foram empregados: janela espectral de 4,8 kHz, tempo de espera (*delay*) de 2 segundos, tempo de aquisição de 1,704 s, pulso de RF de 90°, temperatura de 25°C, 88 ciclos, tau igual a 0,0004 s, bigtau igual a 0,07 s e 128 repetições. Os espectros foram processados usando *line broadening* (lb) igual a 0,3 Hz. A linha de base e a fase foram corrigidas manualmente.

Com o software MestreNova 9.0, foi realizada a divisão da região espectral entre  $\delta$  4,20 e 0,04 ppm em 104 bins com largura de 0,04 ppm. Desta forma, foi construída uma matriz linha para cada amostra. As matrizes linhas das amostras foram todas agrupadas em uma única matriz com 40 linhas (casos) e 105 variáveis (104 bins mais a variável de classe), e esta matriz foi submetida à análise multivariada. A Figura 45 ilustra uma parte dessa matriz.

**Figura 45.** Matriz de bins para construção dos modelos metabonômicos, onde V é o grupo mono-infectado e VE é o grupo coinfectado.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U
1	Amostra	Grupo	0,041	0,081	0,121	0,161	0,201	0,241	0,281	0,321	0,361	0,401	0,441	0,481	0,521	0,561	0,601	0,641	0,681	0,721	0
2	DST	VE	0,000592	0,00104	-0,00029	0,000284	0,000188	-8,32E-05	-0,00013	-6,27E-05	0,000417	0,000729	0,00116	0,001269	0,001277	0,001638	0,002219	0,003723	0,0067	0,009693	0,010
3	FFX	VE	0,001585	0,00173	0,0013	0,001492	0,001478	0,001873	0,002565	0,003223	0,00397	0,003459	0,004591	0,005643	0,006191	0,007511	0,009269	0,011717	0,014643	0,017378	0,023
4	JTS	VE	-6,03E-06	0,001354	-1,48E-05	0,00018	-0,00048	0,00018	0,000288	-1,07E-05	0,000233	0,000737	0,000367	0,000781	0,001729	0,001675	0,002414	0,004515	0,00684	0,008364	0,010
5	MCS	VE	0,008361	0,009227	0,005301	0,005863	0,007582	0,009187	0,010282	0,01124	0,012632	0,013414	0,014868	0,016532	0,020822	0,024442	0,026197	0,032898	0,042922	0,04962	0,067
6	SMS	VE	-0,00294	-0,00247	-0,00273	-0,00342	-0,00401	-0,00431	-0,00517	-0,00544	-0,0055	-0,0063	-0,00638	-0,00692	-0,00775	-0,00786	-0,0088	-0,00844	-0,0089	-0,0091	-0,00
7	MAL	V	0,004113	0,003796	0,004061	0,004434	0,005455	0,00598	0,006356	0,007167	0,008371	0,009256	0,010201	0,011468	0,013687	0,015888	0,01904	0,023257	0,034375	0,077441	0,1
8	JSS	V	0,000446	0,000406	-0,00042	-9,35E-05	-0,00052	-0,00035	-0,0001	0,000163	0,000254	4,90E-05	0,000207	0,000407	0,00161	0,002314	0,003315	0,004546	0,009772	0,037143	0,115
9	PM	V	0,00056	0,000751	0,000773	0,001222	0,001033	0,001322	0,001275	0,002096	0,001987	0,001989	0,002925	0,003965	0,004671	0,006297	0,008272	0,010163	0,015955	0,040893	0,125
10	NMAS	V	0,000324	0,000463	0,000618	0,000373	0,00065	-5,33E-05	0,000582	0,000446	0,000859	0,001221	0,001868	0,001673	0,003136	0,003989	0,005209	0,006755	0,013013	0,042289	0,130
11	ARSN	V	0,003231	0,003132	0,003563	0,004405	0,004838	0,006078	0,007162	0,007827	0,009165	0,01018	0,011645	0,01343	0,016181	0,020592	0,025835	0,030759	0,042683	0,091035	0,253
12	AER	VE	-0,00036	0,000531	0,000196	0,000773	-1,52E-06	0,000921	0,000928	0,000619	0,001354	0,001643	0,00287	0,002568	0,003352	0,003925	0,004657	0,006205	0,008266	0,010005	0,013
13	JGO	VE	0,001374	0,002049	0,001308	0,001044	0,00162	0,002153	0,002505	0,002391	0,002562	0,002966	0,003549	0,003961	0,005352	0,004855	0,006137	0,007901	0,010671	0,012621	0,016
14	MCRB	VE	-0,00016	0,001538	0,000188	0,000214	-0,00016	0,000333	-6,33E-05	0,001154	0,001198	0,001176	0,001529	0,002579	0,002325	0,003415	0,004524	0,005954	0,008407	0,010129	0,013
15	MJMF	VE	0,001142	0,001808	0,00124	0,001533	0,001688	0,002106	0,002673	0,002997	0,003278	0,00345	0,004245	0,005111	0,006392	0,007327	0,008904	0,011828	0,015142	0,016803	0,022
16	JSSS	V	0,001597	0,001879	0,00221	0,002668	0,00359	0,00304	0,003874	0,004432	0,005235	0,006234	0,007903	0,009487	0,011102	0,014905	0,017848	0,022938	0,035872	0,083122	0,210
17	ICMS	V	-0,00358	-0,00371	-0,00458	-0,0044	-0,00501	-0,00512	-0,00583	-0,00623	-0,00694	-0,00793	-0,00791	-0,00874	-0,00918	-0,00941	-0,01085	-0,01305	-0,01348	0,001514	0,069
18	EMM	V	0,003363	0,003679	0,003772	0,004403	0,005013	0,005622	0,006753	0,007423	0,008855	0,01026	0,011325	0,013957	0,017329	0,022456	0,028393	0,033041	0,048133	0,118363	0,355
19	LBA	V	0,003413	0,004336	0,00479	0,005019	0,005144	0,005594	0,006893	0,007491	0,008251	0,009246	0,010029	0,012449	0,01474	0,01748	0,021879	0,025769	0,035933	0,073118	0,186
20	ABS	VE	0,00117	0,002063	0,001155	0,001407	0,001348	0,001411	0,001289	0,001112	0,000914	0,001608	0,001502	0,00112	0,001923	0,002484	0,002647	0,0035	0,00474	0,00573	0,007
21	AC	VE	0,001471	0,002853	0,001842	0,00234	0,002505	0,002684	0,002833	0,003444	0,003809	0,003916	0,004032	0,00462	0,005358	0,00691	0,007638	0,009478	0,012232	0,013524	0,017
22	ASSJ	VE	0,001427	0,002425	0,001356	0,001292	0,001304	0,001936	0,001642	0,002323	0,002259	0,002911	0,003639	0,003918	0,005717	0,006237	0,007544	0,009478	0,01159	0,01401	0,015

### 5.2.5 Análise estatística multivariada

O pré-processamento utilizado antes de submeter os dados à análise estatística foi a normalização pela soma e a centragem dos dados na média, ambos realizados pela plataforma para estudos metabonômicos *MetaboAnalyst* 3.0. (Xia et al. 2015) Os modelos PCA e PLS-DA também foram construídos através dessa plataforma.

A validação do modelo PLS-DA foi realizada por dois métodos: (i) LOOCV, onde foi determinado o número ideal de variáveis latentes, e os

valores de  $Q^2$  (capacidade preditiva),  $R^2$  (coeficiente de determinação) e acurácia do modelo foram calculados; (ii) teste de permutação, com 2000 permutações da variável de classe para verificar a acurácia do modelo PLS-DA.

O modelo PLS-DA forneceu uma medida quantitativa do poder de discriminação de cada bin. Foi utilizado o escore VIP para identificar as variáveis mais importantes na discriminação entre os grupos.

### 5.3 Resultados e Discussão

A Tabela 4 mostra as características clínicas e laboratoriais dos dois grupos (pacientes coinfectados e mono-infectados). Não houve diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos, exceto pelos níveis de colesterol, que foram um pouco mais altos no grupo de monoinfectados ( $p = 0,0421$ ), e de fosfatase alcalina, que foram um pouco mais altos no grupo dos coinfectados.

**Tabela 5.** Características clínicas e laboratoriais dos grupos de coinfectados (n=18) e monoinfectados (n=22).

Características	Pacientes Coinfectados (n=18)		Pacientes Monoinfectados (n=22)		Valor de p
Idade (anos)	53,7	± 13,7	45,6	± 15,2	0,0856 <sup>a</sup>
Sexo (n, %)					
Masculino	13	(72,2%)	10	(45,5%)	0,1159 <sup>b</sup>
Feminino	5	(27,8%)	12	(54,5%)	
ALT (/ULN)*	1,13	(0,70-1,70)	0,82	(0,61-0,82)	0,2595 <sup>c</sup>
AST (/ULN)*	0,96	(0,63-1,60)	0,72	(0,52-1,39)	0,3348 <sup>c</sup>
GGT(/ULN)*	1,87	(0,61-4,23)	1,01	(0,66-1,41)	0,2162 <sup>c</sup>
ALP (/ULN)*	1,57	(1,09-2,20)	1,22	(0,95-1,35)	<b>0,0464<sup>c</sup></b>
Colesterol total (mg/dL)	155	± 30,29	179,2	± 35,66	<b>0,0421<sup>a</sup></b>
HDL (mg/dL)	47,67	± 9,67	55,79	± 14,85	0,0718 <sup>a</sup>
LDL (mg/dL)	86,44	± 33,17	100,7	± 31,74	0,2094 <sup>a</sup>
Triglicerídeos (mg/dL)*	93,35	(71,9-134,9)	84,45	(62,1-152,1)	0,7655 <sup>c</sup>
APRI*	0,68	(0,63-2,59)	0,42	(0,27-0,56)	0,0536 <sup>c</sup>

<sup>a</sup>Teste *t* de Student não pareado; <sup>b</sup>Teste exato de Fisher; <sup>c</sup>Teste de Mann-Whitney. ULN: do inglês, *upper limits of normal*. Os dados foram apresentados como a média ± desvio padrão, exceto aqueles marcados com um asterisco (\*), que são apresentados como os valores medianos (intervalo interquartilico entre parênteses).

O processo inflamatório da esquistossomose não invade o lóbulo hepático e, portanto, preserva funcionalmente os hepatócitos; porém, a inflamação envolve os espaços portais, dando origem ao espessamento fibroso

periportal. (Machado et al. 2002) A esquistossomose é a principal causa de fibrose periportal em todo o mundo. (Raiza et al. 2007)

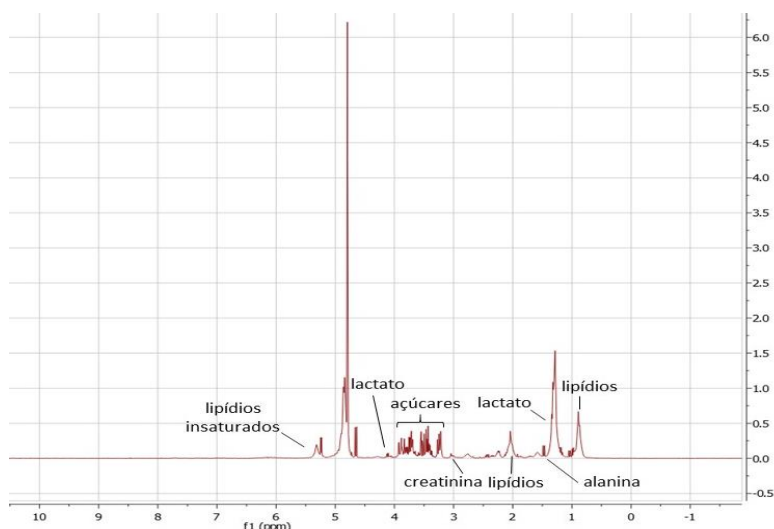
A respeito dos padrões de ultrassonografia da fibrose periportal no parênquima hepático devido à esquistossomose, 9 pacientes apresentaram padrões leves (50%) e 4 moderados (22,2%), enquanto 5 apresentaram fibrose avançada (27,8%).

Após uma lesão hepática como a hepatite viral, as células parenquimatosas se regeneram e substituem as células necróticas. Porém, se a lesão persiste e esse processo falha, os hepatócitos são substituídos por um excesso de matriz extracelular, caracterizando a fibrose parenquimatosa. (Bataller & Brenner 2005). Nos dois grupos houve uma predominância de fibrose parenquimatosa não significativa causada por hepatite viral crônica (METAVIR < F2).

Nos pacientes coinfectados e que possuem fibrose periportal leve ou moderada, o diagnóstico do dano no fígado devido à esquistossomose apresenta mais desafios. Isto acontece porque, comparando com os pacientes coinfectados cujo estágio da fibrose periportal é avançado, a avaliação pelos exames de US é mais difícil devido à presença de fibrose parenquimatosa induzida pelos vírus das hepatites. No presente estudo, apenas um terço dos pacientes coinfectados apresentaram fibrose periportal avançada, tornando esse diagnóstico muito necessário. Na prática clínica, estes dados mostram a importância dos modelos metabonômicos desenvolvidos neste estudo.

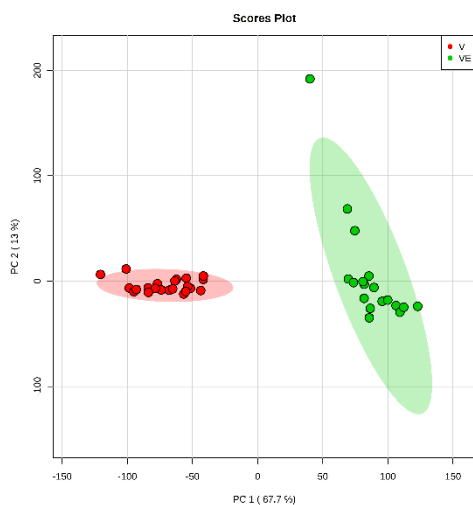
A Figura 46 ilustra um espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de soro de uma das amostras com a atribuição de alguns sinais. As amostras dos dois grupos apresentam o mesmo padrão nos espectros, sendo assim, com apenas a inspeção visual não é possível diferenciar entre elas.

**Figura 46.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz) de uma amostra de soro sanguíneo após aplicação das sequências de pulsos PRESAT e CPMG.

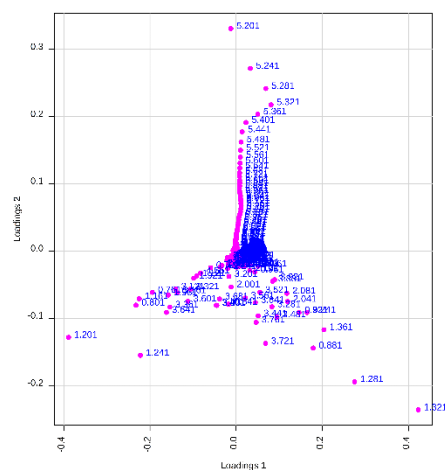


Os resultados obtidos pela PCA estão apresentados na Figura 47. As duas primeiras componentes principais (PC1 e PC2) explicam 80,7% da variância dos dados, e com elas foi possível obter claramente um agrupamento das amostras nas classes de interesse. Na Figura 47a, observa-se que a componente responsável pela separação entre os grupos é a PC1, que inclusive é a que explica a maior parte da variância dos dados. Através da análise do gráfico dos pesos (Figura 47b), constata-se que provavelmente os bins mais importantes na discriminação entre os grupos são  $\delta$  1,20 e 1,32 ppm. O primeiro está relacionado ao grupo dos mono infectados e o segundo ao grupo dos co infectados.

**Figura 47.** Resultados da PCA. a) Escores das 2 primeiras componentes (PC1 e PC2) da PCA dos pacientes co infectados e dos pacientes mono infectados; (b) Gráfico dos pesos (loadings) das 2 primeiras componentes da PCA.



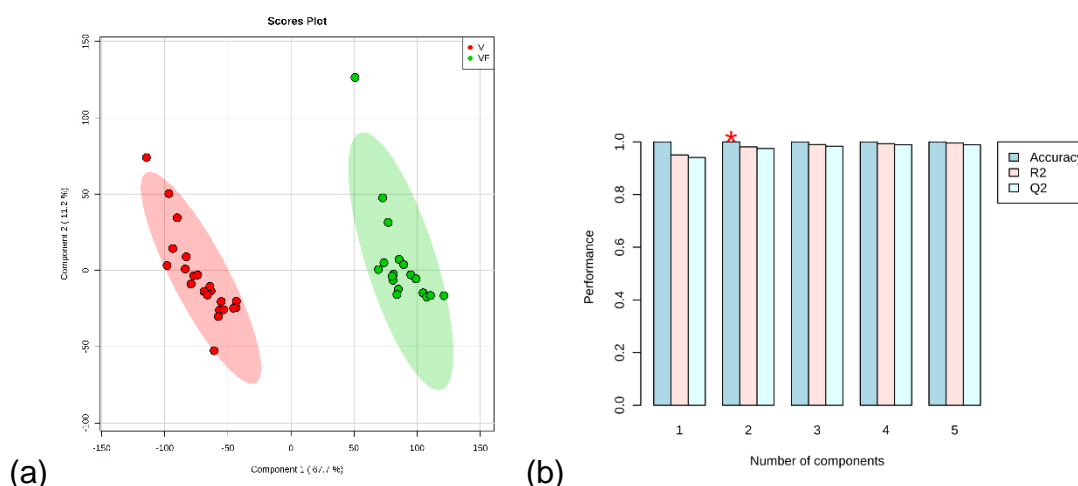
(a)



(b)

A fase de modelagem para os dois grupos foi baseada no formalismo PLS-DA (Figura 48). A Figura 48a mostra uma clara separação entre os grupos, um resultado já esperado após a discriminação obtida na análise exploratória. Esse modelo foi validado por LOOCV, resultando em valores de exatidão,  $R^2$  e  $Q^2$  iguais a 100%, 98,1% e 97,5%, respectivamente (Figura 48b). O asterisco vermelho na Figura 48b indica o melhor número de componentes com base na acurácia, que neste caso foi igual a dois. Além da LOOCV, outro método de validação também foi realizado: teste de permutação. Este teste envolveu 2000 permutações da variável de classe a fim de verificar se o modelo seria preciso, e o resultado foi satisfatório, com  $p < 0,0005$  (Figura 49b).

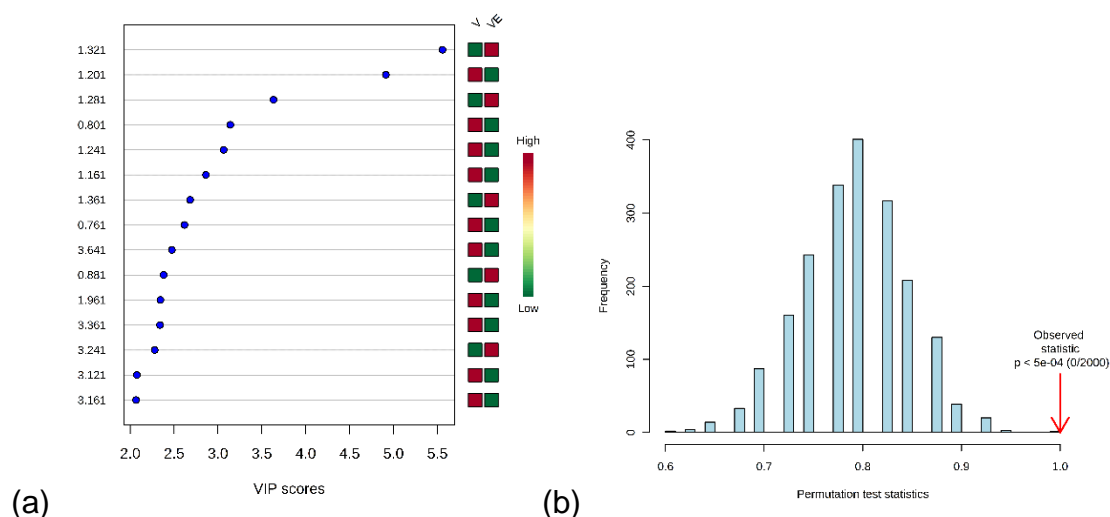
**Figura 48.** Resultados da PLS-DA. a) Escores discriminando entre os pacientes mono infectados e os co infectados; b) O número ideal de componentes da PLS-DA de acordo com o  $R^2$ , o  $Q^2$  e a acurácia do modelo.



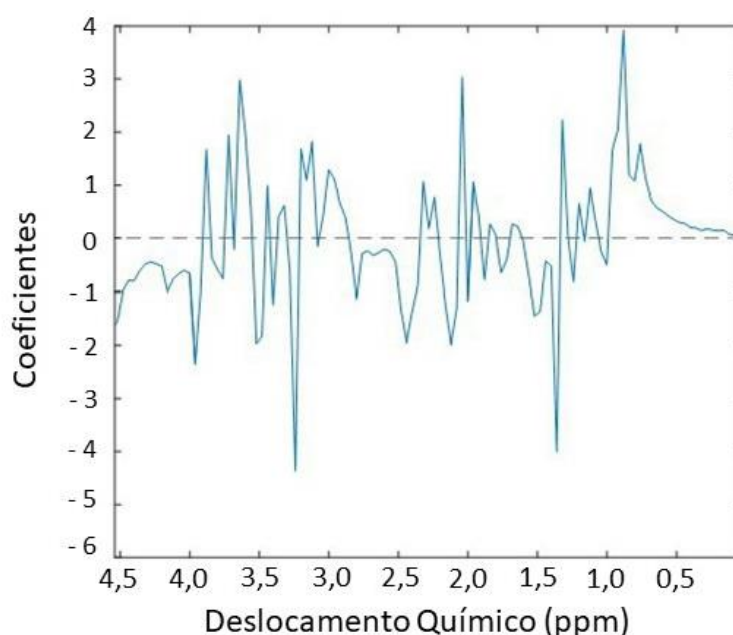
No gráfico VIP (Figura 49a), os dois bins que melhor discriminaram as amostras foram  $\delta$  1,20 e 1,32 ppm. Estes deslocamentos químicos foram previamente identificados pela inspeção visual dos pesos da PCA (Figura 47b). Considerando apenas os valores do escore VIP maiores que 2,5, identificam-se três regiões espectrais responsáveis pela discriminação: (1)  $\delta$  1,28 – 1,36 ppm; (2)  $\delta$  1,16 – 1,24 ppm, atribuído aos grupos metileno do colesterol HDL; (3)  $\delta$  0,76 – 0,80 ppm, atribuído aos grupos metil do colesterol HDL (Pinto et al. 2015). De acordo com o gráfico VIP, os níveis de lactato no soro foram maiores no grupo co infectado, enquanto os sinais atribuídos ao colesterol HDL foram mais intensos no grupo mono infectado. Além disto, o gráfico obtido a partir do

vetor de regressão (Figura 50) também apresentou os sinais relacionados com o lactato e o colesterol, além de apresentar sinais nas regiões  $\delta$  2,5 – 2,0 ppm e  $\delta$  4,0 – 3,0 ppm. Provavelmente, estes sinais estão relacionados a aminoácidos e carboidratos.

**Figura 49.** Resultados da PLS-DA. a) Escores VIP utilizando duas componentes. Os quadrados posicionados à direita representam a importância dos bins em cada grupo (monoinfectados e coinfectados); b) Teste de permutação envolvendo 2000 permutações com  $p < 0,0005$ .



**Figura 50.** Gráfico obtido a partir do vetor de regressão do modelo PLS-DA.

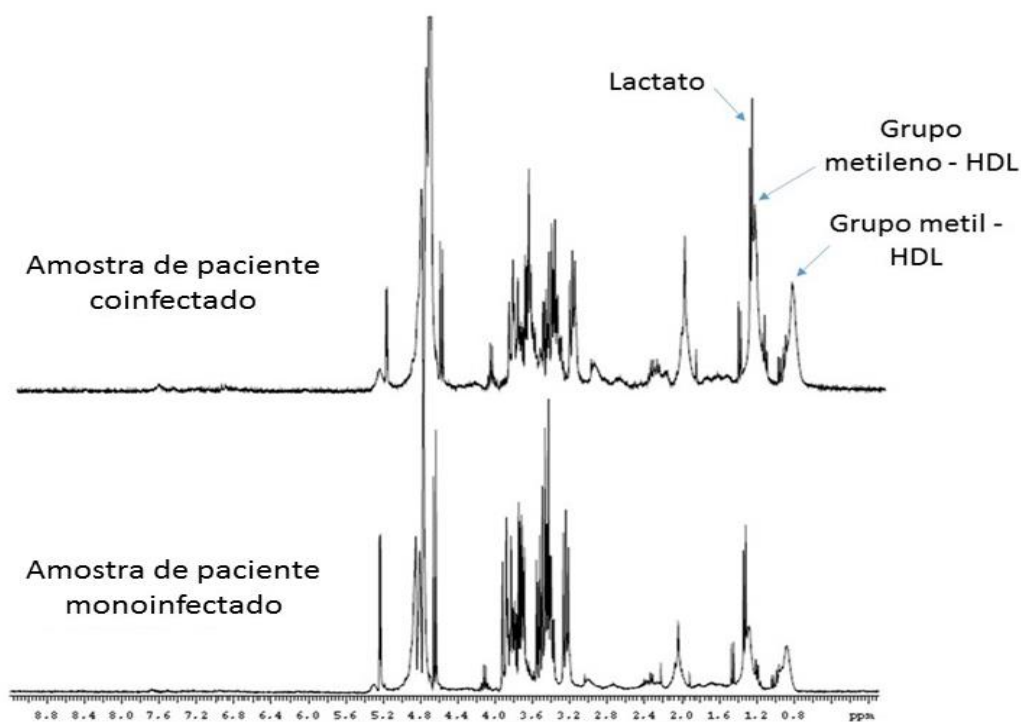


A Figura 51 apresenta o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  das amostras de soro dos dois grupos após os pulsos PRESAT-CPMG, indicando as regiões



espectrais correspondentes ao lactato e aos grupos metileno e metil do colesterol HDL, os sinais responsáveis pela separação entre os grupos.

**Figura 51.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (PRESAT-CPMG, 300 MHz) do soro, com atribuição dos sinais responsáveis pela separação entre os grupos.



As alterações observadas nas concentrações relativas dos metabólitos identificados podem ser consideradas assinaturas metabólicas da infecção por *S. mansoni*, a qual é caracterizada por níveis reduzidos dos intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico, incluindo citrato, succinato e 2-oxoglutarato, e níveis elevados de piruvato, sugerindo estímulo da glicólise (Githui et al., 2006), ainda que as consequências da redução de glicose e a elevação dos níveis de lactato na corrente sanguínea dependem da gravidade da infecção e do estado nutricional do hospedeiro. (Balog et al. 2011) Estudos indicam que o acúmulo de lactato na corrente sanguínea eventualmente reduz o pH intracelular. (Githui et al. 2006) Sendo assim, apesar do parasita não estar mais presente, esses pacientes possuem uma marca da infecção que um dia sofreram. Isso alterou o funcionamento normal do fígado, apresentando uma elevada importância no quadro clínico atual.

Neste estudo, por exemplo, os níveis de lactato no sangue foram significantes o suficiente para discriminar entre os pacientes coinfectados e os monoinfectados. Em um estudo realizado por Wang *et al.*, onde utilizaram

camundongos infectados pelo *Schistosoma mansoni* para construir um modelo baseado em espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$ , a concentração de lactato variou entre os animais mas não foi significativa na discriminação entre os dois grupos (controle e infectados). De acordo com Wang *et al.*, o *Schistosoma mansoni* também é responsável por uma perturbação no metabolismo dos aminoácidos e por distúrbios na microbiota intestinal. (Wang *et al.* 2004; Githui *et al.* 2006).

Li *et al.* realizaram um estudo quimiométrico para diferenciar entre camundongos infectados pelo *Schistosoma mansoni* e não infectados, e identificaram o lactato como um dos principais metabólitos responsáveis pela separação entre os dois grupos. Além disso, relataram mudanças na energia da homeostase metabólica, como os níveis relativamente mais elevados de lipídeos e uma diminuição dos níveis de glicose. (J. V Li *et al.* 2011)

Há relatos na literatura que associam fibrose avançada (Sands *et al.* 2015) e cirrose (Embade *et al.* 2016) com os níveis baixos de LDL e HDL. Da Fonseca *et al.* relataram que os pacientes com esquistossomose apresentam redução do colesterol total, LDL e triglicerídeos quando comparados com os indivíduos saudáveis. Eles indicaram que isto acontece porque a infecção pelo *Schistosoma mansoni* causa mudanças nos níveis plasmáticos de lipídeos e lipoproteínas devido às diferentes formas do gene *APOE*. (Da Fonseca *et al.* 2014).

Por outro lado, há estudos relatando que as infecções crônicas pelas hepatites B e C causam uma redução significativa nos níveis de HDL, LDL e de colesterol total nos pacientes, e que isto indica a gravidade da lesão hepática. Os autores sugerem que a enzima envolvida na biotransformação dessas moléculas se encontra em menores quantidades nos pacientes com doença hepática crônica avançada ou cirrose, provavelmente devido ao enfraquecimento da síntese hepática. (Su *et al.* 2004; Nashaat 2010)

Como discutido acima, encontra-se na literatura que a dislipidemia é uma característica presente na esquistossomose e na hepatite, porém, neste estudo foi observado que os níveis do colesterol total no soro foram menores nos pacientes coinfectados (esquistossomose e hepatite B ou C) quando comparados com o grupo monoinfectado (hepatite B ou C). Apesar de não ser estatisticamente significativa, houve uma tendência para menores valores de HDL e LDL e maiores valores de triglicerídeos no grupo coinfectado, o que

pode explicar a importância dos sinais atribuídos a HDL na discriminação entre as amostras.

É interessante notar que os modelos metabonômicos indicaram diferenças entre os grupos a respeito dos níveis de triglicerídeos e HDL apesar dessas diferenças serem mínimas e não ser possível observá-las nos níveis séricos medidos por ensaios convencionais.

## **5.4 Conclusão**

O objetivo desta etapa do trabalho foi construir modelos metabonômicos capazes de discriminar as amostras dos pacientes portadores de HBV/HCV das amostras dos pacientes portadores de coinfecção de esquistossomose mansônica com HBV/HCV. Analisando os resultados obtidos, pode-se considerar que o objetivo foi alcançado com sucesso. Pois, a partir de 40 amostras de soro sanguíneo (18 pacientes coinfectados com esquistossomose e hepatite B ou C e 22 pacientes monoinfectados com HBV ou HCV), obteve-se na análise exploratória PCA uma clara separação entre os grupos (Figura 45) e na análise supervisionada PLS-DA obteve-se uma exatidão de 100% na validação cruzada (Figura 46). Além disso, através do gráfico VIP (Figura 47a) foi possível observar as variáveis responsáveis pela discriminação entre os grupos, sugerindo que os níveis de lactato foram maiores no grupo coinfectado, enquanto que os sinais atribuídos ao colesterol HDL foram mais intensos no grupo de monoinfectados.

## **5.5 Perspectivas**

- Obter um número maior de amostras a fim de ser possível dividi-las em dois grupos: calibração e validação;
- Construir um modelo metabonômico com três grupos: pacientes apenas com esquistossomose mansônica, pacientes com coinfecção de esquistossomose mansônica e hepatite viral, e pacientes apenas com hepatite viral;

- Construir um modelo metabonômico que diferencie entre pacientes coinfectados e pacientes com esquistossomose mansônica ativa.

## **6 CONCLUSÕES GERAIS**

Neste estudo, a estratégia metabonômica se apresentou como uma ferramenta com potencial para discriminar algumas doenças hepáticas: esteatose de esteatohepatite e monoinfecção por HBV/HCV de coinfecção por HBV/HCV e esquistossomose mansônica. Ambos os modelos metabonômicos foram desenvolvidos a partir de amostras de sangue dos pacientes, uma estratégia minimamente invasiva.

No caso da esteatohepatite, a biópsia é bastante invasiva, enquanto o estudo piloto, aqui apresentado, demonstrou o potencial que a estratégia metabonômica possui como método alternativo. Além disso, o modelo metabonômico construído para diferenciar entre pacientes coinfectados com esquistossomose mansônica e HBV/HCV e pacientes monoinfectados com HBV/HCV apresentou 100% de exatidão na validação cruzada.

## **7 PERSPECTIVAS GERAIS**

- Ampliar o número de amostras a fim de ser possível dividi-las em dois grupos: conjunto de treinamento e de teste, com amostras representativas em cada classe;
- Identificar, através de RMN bidimensional, os metabólitos responsáveis pelas discriminações entre os grupos e associar às respectivas rotas metabólicas; e
- Avaliar o potencial da estratégia metabonômica para o diagnóstico e estadiamento de diferentes agressões hepáticas, usando amostra única e diferentes modelos metabonômicos.

## REFERÊNCIAS

- Alkhoury, N. & McCullough, A.J., 2012. Noninvasive diagnosis of NASH and liver fibrosis within the spectrum of NAFLD. *Gastroenterology and Hepatology*, 8(10), pp.661–668.
- Araújo, L. et al., 2017. Diagnosis of Urological Cancer by <sup>1</sup>H NMR Based Metabonomics Urinalysis: A Pilot Study. *British Journal of Medicine and Medical Research*, 19(3), pp.1–8.
- Ballabio, D. & Consonni, V., 2013. Classification tools in chemistry. Part 1: linear models. PLS-DA. *Analytical Methods*, 5(16), p.3790.
- Balog, C.I. et al., 2011. Metabonomic investigation of human *Schistosoma mansoni* infection. *Molecular BioSystems*, 7(5), pp.1473–1480.
- Barker, M. & Rayens, W., 2003. Partial least squares for discrimination. *Journal of Chemometrics*, 17, pp.166–173.
- Barsoum, R.S., Esmat, G. & El-Baz, T., 2013. Human Schistosomiasis: Clinical Perspective: Review. *Journal of Advanced Research*, 4(5), pp.433–444.
- Bataller, R. & Brenner, D., 2005. Liver fibrosis. *The journal of clinical investigation*, 115(2), pp.209–218.
- Berrueta, L. a, Alonso-Salces, R.M. & Héberger, K., 2007. Supervised pattern recognition in food analysis. *Journal of chromatography. A*, 1158(1–2), pp.196–214.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde., 2015. Manual Técnico para o Diagnóstico das Hepatites Virais. *Ministério da Saúde Secretaria de Vigilância em Saúde Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais*, p.68.

Brereton, R.G. & Lloyd, G.R., 2014. Partial least squares discriminant analysis : taking the magic away. *Journal of Chemometrics*, Special Issue - Tutorial, pp.213–225.

Bylesjö, M. et al., 2007. OPLS discriminant analysis: combining the strengths of PLS-DA and SIMCA classification. *Journal of Chemometrics*, 20, pp.341–351.

Conry-Cantilena, C., 1997. Hepatitis C virus diagnostics: technology, clinical applications and impacts. *Trends in biotechnology*, 15(2), pp.71–6.

Costa, T., 2016. Metabonômica Aplicada ao Diagnóstico e Estadiamento de Doenças Hepáticas. *Dissertação*.

Cotrim, H.P. et al., 2011. Nonalcoholic fatty liver disease in Brazil. Clinical and histological profile. *Annals of Hepatology*, 10(1), pp.33–37.

Coura, J.R. & Amaral, R.S., 2004. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazilian endemic areas. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99(5), pp.13–19.

Dény, P. & Zoulim, F., 2010. Hepatitis B virus: from diagnosis to treatment. *Pathologie-biologie*, 58(4), pp.245–53.

Dona, A.C. et al., 2016. A guide to the identification of metabolites in NMR-based metabonomics/metabolomics experiments. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 14, pp.135–153.

Elbaz, T. & Esmat, G., 2013. Hepatic and Intestinal Schistosomiasis: Review. *Journal of Advanced Research*, 4(5), pp.445–452.

Embade, N. et al., 2016. Metabolic characterization of advanced liver fibrosis in HCV patients as studied by serum <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy. *PLoS ONE*, 11(5), pp.1–19.

Farrés, M. et al., 2015. Comparison of the variable importance in projection (VIP) and of the selectivity ratio (SR) methods for variable selection and interpretation. *Journal of Chemometrics*, 29(10), pp.528–536.

Fathi, F. et al., 2013. Metabonomics based NMR in Crohn's disease applying PLS-DA. *Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench*, 6(SUPPL.), pp.82–86.

Ferreira, M.M.C. et al., 1999. Chemometrics I: multivariate calibration, a tutorial. *Química Nova*, 22, pp.724–731.

Ferreira, M.S., 2000. Diagnóstico e tratamento da hepatite B Diagnosis and treatment of hepatitis B. , 33(4), pp.389–400.

Fiehn, O., 2001. Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks. *Comparative and Functional Genomics*, 2(3), pp.155–168.

Fitzpatrick, E. & Dhawan, A., 2014. Noninvasive biomarkers in non-alcoholic fatty liver disease: Current status and a glimpse of the future. *World Journal of Gastroenterology*, 20(31), pp.10851–10863.

Da Fonseca, C.S.M. et al., 2014. Human plasma lipid modulation in schistosomiasis mansoni depends on apolipoprotein E polymorphism. *PLoS ONE*, 9(7).

Frickenschmidt, A. et al., 2008. Metabonomics in cancer diagnosis: mass spectrometry-based profiling of urinary nucleosides from breast cancer patients. *Biomarkers*, 13(4), pp.435–449.

Gaggini, M. et al., 2013. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and its connection with insulin resistance, dyslipidemia, atherosclerosis and coronary heart disease. *Nutrients*, 5(5), pp.1544–1560.



Garcia-Perez, I. et al., 2010. Chemometric analysis of urine fingerprints acquired by liquid chromatography-mass spectrometry and capillary electrophoresis: Application to the schistosomiasis mouse model. *Electrophoresis*, 31(14), pp.2349–2355.

Garcia, E. et al., 2012. Diagnosis of early stage ovarian cancer by NMR metabonomics of serum explored by use of a micro-flow NMR probe. *J. Proteome Res.*, 10(4), pp.1765–1771.

Gasim, G.I., Bella, A. & Adam, I., 2015. Schistosomiasis, hepatitis B and hepatitis C co-infection. *Virology Journal*, 12(19), pp.1–6.

Geladi, P., 2003. Chemometrics in spectroscopy. Part 1. Classical chemometrics. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 58(5), pp.767–782.

Githui, E.K., Damian, R.T. & Aman, R.A., 2006. *Schistosoma mansoni*: Biochemical characterization of lactate transporters or similar proteins. *Experimental Parasitology*, 114(3), pp.180–188.

Godoy, M.M.G. et al., 2010. Hepatitis C virus infection diagnosis using metabonomics. *Journal of viral hepatitis*, 17(12), pp.854–8.

Goldsmith, P. et al., 2010. Metabonomics: a useful tool for the future surgeon. *The Journal of surgical research*, 160(1), pp.122–32.

Guimarães Cavalcanti, M., Marcello de Araujo-Neto, J. & Mauro Peralta, J., 2015. Schistosomiasis: Clinical management of liver disease. *Clinical Liver Disease*, 6(3), pp.59–62.

Hassan, K. et al., 2014. Nonalcoholic fatty liver disease: A comprehensive review of a growing epidemic. *World Journal of Gastroenterology*, 20(34), pp.12082–12101.

Hermanussen, M. et al., 2006. Obesity, voracity, and short stature: the impact of glutamate on the regulation of appetite. *European Journal of Clinical Nutrition*, 60(1), pp.25–31.

Hopke, P.K., 2003. The evolution of chemometrics. *Analytica Chimica Acta*, 500(1–2), pp.365–377.

Hou, L.-J. et al., 2015. Urinary Metabonomics for Diagnosis of Depression in Hepatitis B Virus-Infected Patients. *Iranian Red Crescent Medical Journal*, 17(4), p.e27359.

Hou, Q. & Duan, Z.J., 2016. Metabonomic window into hepatitis B virus-related hepatic diseases. *World Journal of Hepatology*, 8(1), pp.1–8.

J.K., D. & J.W., T., 2011. Systematic review: The diagnosis and staging of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 33(5), pp.525–540.

Jia, H. et al., 2013. Metabonomics combined with UPLC-MS chemical profile for discovery of antidepressant ingredients of a traditional Chinese medicines formula, Chaihu-Shu-Gan-San. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2013.

Jian-fei, X.I.A. et al., 2009. Recent Trends in Strategies and Methodologies for Metabonomics. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 37(1), pp.136–143.

Jolliffe, I.T. & Cadima, J., 2016. Principal component analysis: a review and recent developments. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 374(2065), p.20150202.

Kamal, S.M. et al., 2004. Kinetics of intrahepatic hepatitis C virus (HCV)-specific CD4+ T cell responses in HCV and *Schistosoma mansoni* coinfection: relation to progression of liver fibrosis. *The Journal of infectious diseases*, 189(7), pp.1140–1150.

Kawamura, T., 2002. Interpretação de um teste sob a visão epidemiológica: eficiência de um teste. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 79(4), pp.437–441.

Keeler, J., 2002. *Understanding NMR Spectroscopy*. Wiley.

Keun, H.C., 2006. Metabonomic modeling of drug toxicity. *Pharmacology & therapeutics*, 109(1–2), pp.92–106.

Klein, M.S. et al., 2011. Discrimination of steatosis and NASH in mice using nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Metabolomics*, 7(2), pp.237–246.

Kowalski, B.R., 1975. Chemometrics: Views and Propositions? *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, 15(4), pp.201–203.

Kumar, V. et al., 2010. *Bases Patológicas das Doenças*. 8. ed. Els.

Laghi, L. et al., 2014. Metabonomic Investigation by <sup>1</sup>H-NMR to Discriminate between Red Wines from Organic and Biodynamic Grapes. *Food & Nutrition Sciences*, 5(January), pp.52–59.

Lambertucci, J.R., 2014. Revisiting the concept of hepatosplenic schistosomiasis and its challenges using traditional and new tools. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 47(2), pp.130–136.

Lampman, P. et al., 2009. *Introduction to Spectroscopy*. 4. ed. C. Learning.

Lavanchy, D., 2011. Evolving epidemiology of hepatitis C virus. *Clinical Microbiology and Infection*, 17(2), pp.107–115.

Li, H. et al., 2011. A Proton Nuclear Magnetic Resonance Metabonomics Approach for Biomarker Discovery in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Journal of Proteome Research*, 10(6), pp.2797–2806.

Li, J. V et al., 2011. Chemometric analysis of biofluids from mice experimentally infected with *Schistosoma mansoni*. *Parasites & vectors*, 4(1), p.179.

Machado, M.M. et al., 2002. Aspectos Ultra-Sonográficos Da Esquistossomose Hepatoesplênica. *Radiologia Brasileira*, 35(1), pp.41–45.

Da Martins, D.S. et al., 2015. Schistosomiasis in Southern Brazil 17 years after the confirmation of the first autochthonous case. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 48(3), pp.354–357.

Meiboom, S. & Gill, D., 1958. Modified spin-echo method for measuring nuclear relaxation times. *Review of Scientific Instruments*, 29(8), pp.688–691.

Mlynarik, V., 2016. Introduction to nuclear magnetic resonance. *Analytical Biochemistry*, in press, pp.1–6.

Musso, G. et al., 2014. Association of Non-alcoholic Fatty Liver Disease with Chronic Kidney Disease: A Systematic Review and Meta-analysis. *PLoS Medicine*, 11(7).

Nalbantoglu, I.L.K. & Brunt, E.M., 2014. Role of liver biopsy in nonalcoholic fatty liver disease. *World journal of gastroenterology*, 20(27), pp.9026–37.

Nanthakumar, C.B. et al., 2015. Dissecting fibrosis: therapeutic insights from the small-molecule toolbox. *Nature Reviews Drug Discovery*, 14(10), pp.693–720.

Nashaat, E.H., 2010. Comparative study of serum lipid profile between chronic hepatitis C Egyptian patients and normal controls and the effect of viral eradication on lipids profile. , 2(5), pp.14–20.

Neto, B., Scarminio, I. & Bruns, R., 2002. 25 Anos de Quimiometria no Brasil. *Química Nova*, 25(4), pp.689–695.

Ni, Y., Xie, G. & Jia, W., 2014. Metabonomics of human colorectal cancer: New approaches for early diagnosis and biomarker discovery. *Journal of Proteome Research*, 13(9), pp.3857–3870.

Nicholson, J.K., Lindon, J.C. & Holmes, E., 1999. “Metabonomics”: understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica*, 29(11), pp.1181–1189.

Nishida, T. et al., 2012. Spontaneous onset of nonalcoholic steatohepatitis and hepatocellular carcinoma in a mouse model of metabolic syndrome. *Laboratory Investigation*, 93(2), pp.230–241.

Öhman, A. & Forsgren, L., 2015. NMR metabonomics of cerebrospinal fluid distinguishes between Parkinson's disease and controls. *Neuroscience Letters*, 594, pp.36–39.

Panobianco, M.S. et al., 2012. Mulheres com Diagnóstico Avançado do Câncer do Colo do Útero: Enfrentando a Doença e o Tratamento. *Revista Brasileira de Cancerologia*, 58(3), pp.517–523.

Papastergiou, V., Tsochatzis, E. & Burroughs, A.K., 2012. Non-invasive assessment of liver fibrosis. *Ann Gastroenterol*, 25(3), pp.218–231.

Pinto, J. et al., 2015. Prediction of gestational diabetes through NMR metabolomics of maternal blood. *Journal of Proteome Research*, 14(6), pp.2696–2706.

Raiza, R.-G. et al., 2007. Clinical and ultrasound findings before and after praziquantel treatment among Venezuelan schistosomiasis patients / Achados clínicos e no ultra-som pré e pós tratamento com praziquantel em pacientes venezuelanos com esquistossomose. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical VO - 40*, 40(5), p.505.

Rajbhandari, R. & Chung, R.T., 2016. Treatment of Hepatitis B: A Concise Review. *Clinical and Translational Gastroenterology*, 7(9), p.e190.

Ribeiro, A.S. et al., 2014. Discriminating gamma-irradiated soybean seeds by <sup>1</sup>H NMR-based metabonomics. *Food Control*, 36(1), pp.266–272.

Robert M. Silverstein, Francis X. Webster, D.J.K., 2005. Spectrometric identification of organic compounds. *Journal of Molecular Structure*, p.512.

Robertson, D.G., 2005. Metabonomics in toxicology: A review. *Toxicological Sciences*, 85(2), pp.809–822.

Ross, A. et al., 2007. NMR Spectroscopy Techniques for Application to Metabonomics. *The Handbook of Metabonomics and Metabolomics*.

Saeed, U., Waheed, Y. & Ashraf, M., 2014. Hepatitis B and hepatitis C viruses: A review of viral genomes, viral induced host immune responses, genotypic distributions and worldwide epidemiology. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4(2), pp.88–96.

Sah, V.K. et al., 2015. Human schistosomiasis: A diagnostic imaging focused review of a neglected disease. *Radiology of Infectious Diseases*, 2(3), pp.150–157.

Sands, C.J. et al., 2015. Metabolic phenotyping for enhanced mechanistic stratification of chronic hepatitis C-induced liver fibrosis. *The American journal of gastroenterology*, 110(1), pp.159–69.

Sass, D.A., Chang, P. & Chopra, K.B., 2005. Nonalcoholic fatty liver disease: A clinical review. *Digestive Diseases and Sciences*, 50(1), pp.171–180.

Sharma, S. et al., 2015. Point-of-Care diagnostics in low resource settings: Present status and future role of microfluidics. *Biosensors*, 5(3), pp.577–601.

Shen, J. et al., 2012. Non-invasive diagnosis of non-alcoholic steatohepatitis by combined serum biomarkers. *Journal of Hepatology*, 56(6), pp.1363–1370.

Silva, J.L.D.A. et al., 2011. HBV and HCV serological markers in patients with the hepatosplenic form of mansonic schistosomiasis. *Arquivos de gastroenterologia*, 48(2), pp.124–130.

Slutsky, B., 1998. Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A By D. L. Massart, B. G. M. Vandeginste, L. M. C. Buydens, S. De Jong, P. J. Lewi, and J. Smeyers-Verbeke. Data Handling in Science and Technology Volume 20A. Elsevier: Amsterdam. 1997. Xvii + 867 pp. ISB. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, 38(6), pp.1254–1254.

Su, T.C. et al., 2004. Chronic hepatitis B virus infection and dyslipidemia. *J Formos Med Assoc*, 103(4), pp.286–291.

Tian, Y. et al., 2015. Integrative metabonomics as potential method for diagnosis of thyroid malignancy. *Sci. Rep.*, 5, p.14869.

Van-Lume, D.S. et al., 2013. Association between Schistosomiasis mansoni and hepatitis C: systematic review. *Rev Saude Publica*, 47(2), pp.414–424.

Veeman, W.S., 1997. Nuclear magnetic resonance, a simple introduction to the principles and applications. *Geoderma*, 80(3–4), pp.225–242.

Walt, G., 2004. WHO's World Health Report 2003. *BMJ (Clinical research ed.)*, 328(7430), p.6.

Wang, L. et al., 2013. Metabonomic Profiling of Serum and Urine by <sup>1</sup>H NMR-Based Spectroscopy Discriminates Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Healthy Individuals. *PLoS ONE*, 8(6), pp.1–9.

Wang, Y. et al., 2004. Metabonomic investigations in mice infected with *Schistosoma mansoni*: an approach for biomarker identification. *Proc Natl Acad*

*Sci U S A*, 101(34), pp.12676–12681.

Westad, F. & Marini, F., 2015. Validation of chemometric models - A tutorial. *Analytica Chimica Acta*, 893, pp.14–24.

Wishart, D.S. et al., 2009. HMDB: A knowledgebase for the human metabolome. *Nucleic Acids Research*, 37(SUPPL. 1), pp.603–610.

Wold, S. & Sjöström, M., 1998. Chemometrics, present and future success. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 44(1–2), pp.3–14.

Worley, B. & Powers, R., 2015. Multivariate Analysis in Metabolomics. *HHS Public Access*, 1(1), pp.92–107.

Xia, J. et al., 2015. MetaboAnalyst 3.0-making metabolomics more meaningful. *Nucleic Acids Research*, 43(W1), pp.W251–W257.

Yang, J. et al., 2004. Discrimination of Type 2 diabetic patients from healthy controls by using metabonomics method based on their serum fatty acid profiles. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 813(1–2), pp.53–58.

Yang, Q. et al., 2010. Urinary metabonomic study of lung cancer by a fully automatic hyphenated hydrophilic interaction/RPLC-MS system. *Journal of Separation Science*, 33(10), pp.1495–1503.

Yilmaz, Y. et al., 2007. Soluble forms of extracellular cytokeratin 18 may differentiate simple steatosis from nonalcoholic steatohepatitis. *World Journal of Gastroenterology*, 13(6), pp.837–844.

Yu, M. et al., 2017. Metabonomics Research Progress on Liver Diseases. *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2017, pp.1–10.



## ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA PARA PROJETO DE DISCRIMINAÇÃO ENTRE ESTEATOSE E ESTEATOHEPATITE



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Doença Hepática Gordurosa Não-alcoólica em Cirurgia Bariátrica: Análise da Adiponectina, TNF- $\gamma$ , Interleucina-6 e Fragmento CK-18 como marcadores de fibrose hepática

**Pesquisador:** Lucia Helena de Oliveira Cordeiro **Área Temática:** <sup>[1]</sup><sub>[SEP]</sub> **Versão:** 1 <sup>[1]</sup><sub>[SEP]</sub> **CAAE:** 34692714.8.0000.5208

**Instituição Proponente:** CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE **Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER Número do Parecer:** 815.390

**Data da Relatoria:** 01/10/2014

### Apresentação do Projeto:

Projeto de pesquisa apresentado na seleção para ingresso ao Programa- Ano Letivo 2013-Doutorado, pós graduação em cirurgia-CCS-UFPE. <sup>[1]</sup><sub>[SEP]</sub> A doença hepática gordurosa não alcoólica do fígado (DHGNA) corresponde a um espectro de desordens que pode variar desde simples acúmulo de triglicerídeos até esteato-hepatite não alcoólica (EHNA), fibrose, cirrose e hepatocarcinoma, sem relação com álcool e doença hepática viral, sendo uma condição clínica emergente no mundo.

O projeto visa avaliar a possibilidade de diagnóstico através de dosagens bioquímicas, sem necessidade de biópsia hepática. Os pacientes terão coleta de sangue para o processamento dos exames laboratoriais previstos na pesquisa e serão submetidos à biópsia hepática no intra-operatório da cirurgia bariátrica. O estudo vai ser desenvolvido no Hospital das Clínicas (HC) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Os pacientes serão selecionados nos ambulatórios de endocrinologia e de cirurgia geral do referido hospital, preenchendo os critérios de seleção para a cirurgia proposta. Serão estudados 50 pacientes.

### Objetivo da Pesquisa:

Correlacionar a quantidade das substâncias adiponectina, TNF-, interleucina-6 e fragmento CK-18

**Endereço:** Av. da Engenharia s/no - 1o andar, sala 4, Prédio do CCS <sup>[1]</sup><sub>[SEP]</sub> **Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600 <sup>[1]</sup><sub>[SEP]</sub> **UF:** PE **Município:** RECIFE <sup>[1]</sup><sub>[SEP]</sub> **Telefone:** (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE /  
UFPE-Continuação do Parecer: 815.390

através da técnica de extração de RNA do fragmento hepático com os diferentes graus de esteatose hepática e de fibrose hepática em pacientes submetidos à DGYR (Derivação gástrica em Y de Roux). Determinar a ocorrência de DHGNA e EHNA através da histologia hepática em pacientes com diferentes categorias de peso (sobrepeso, obesidade graus I, II e III), submetidos à DGYR.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Adequados

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Pesquisa relevante, inovadora que visa oferecer possibilidade de diagnóstico não invasivo para uma condição na qual a biópsia hepática tem sido o padrão ouro.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

adequados

**Recomendações:**

Nenhuma

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Nenhuma

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O Colegiado aprova o parecer do protocolo em questão e o pesquisador está autorizado para iniciar a coleta de dados. O Projeto foi avaliado e sua APROVAÇÃO definitiva será dada, após a entrega do relatório final, na PLATAFORMA BRASIL, através de "Notificação" e, após apreciação, será emitido Parecer Consubstanciado.

**Endereço:** Av. da Engenharia s/no - 1o andar, sala 4, Prédio do CCS **Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600 **UF:** PE **Município:** RECIFE **Telefone:** (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



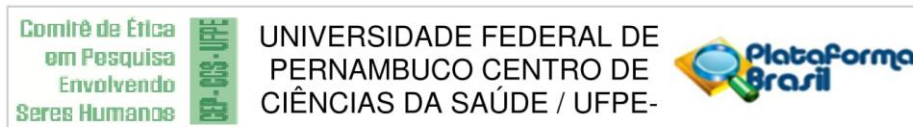
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE /  
UFPE-Continuação do Parecer: 815.390

RECIFE, 01 de Outubro de 2014

**Assinado por:**

**GERALDO BOSCO LINDOSO COUTO (Coordenador)**

## ANEXO B – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA PARA PROJETO DE DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE COINFECÇÃO DE HBV/HCV COM ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** A utilização da metabonômica no diagnóstico das hepatites B, C e esquistossomose mansônica em pacientes com e sem alterações das enzimas hepáticas

**Pesquisador:** Joelma Carvalho Santos

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 60316616.4.0000.5208

**Instituição Proponente:** Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.782.771

#### Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de doutorado intitulado "A utilização da metabonômica no diagnóstico das hepatites B, C e esquistossomose mansônica em pacientes com e sem alterações das enzimas hepáticas", do Programa de Pós Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde. Será desenvolvido por Joelma Carvalho Santos com orientação do Prof. Dr. Edmundo Pessoa de Almeida Lopes, co-orientação do Prof. Dr. Ricardo Oliveira da Silva e Colaboração da médica hepatologista do Hospital das Clínicas/UFPE. No estudo, os pesquisadores almejam a construção de modelos metabonômicos baseador em ressonância magnética nuclear de próton para diferenciar pacientes com infecção crônica pelo HBV ou HCV, com e sem alterações na atividade das enzimas hepáticas (ALT, AST e GGT), pacientes com esquistossomose mansônica, hepatite crônica de etiologia mista (DHM), e indivíduos imunes ao HBV, além de diferenciar os diferentes graus de fibrose hepática nos pacientes com esquistossomose.

#### Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Diferenciar pacientes com infecção crônica pelos vírus da hepatite B ou da hepatite C, com e sem alterações na atividade das enzimas hepáticas

(ALT, AST e GGT), pacientes com EM, DHM e indivíduos imunes ao HBV, além de diferenciar os

**Endereço:** Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600  
**UF:** PE **Município:** RECIFE  
**Telefone:** (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
PERNAMBUCO CENTRO DE  
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-



Continuação do Parecer: 1.782.771

diferentes graus de fibrose hepática nos pacientes

com esquistossomose, através de modelos metabonômicos baseados em RMN de 1H, obtidos de amostras de soro.

Objetivo Secundário:

- Obter espectros de RMN de 1H das amostras de soro de pacientes com infecção crônica pelo HBV ou HCV, com e sem alterações na atividade das enzimas hepáticas, associados ou não à EM, e de indivíduos imunes ao HBV (controles);
- Desenvolver modelos metabonômicos, a partir dos espectros de RMN de 1H obtidos, que permitam diferenciar:
  - Pacientes com e sem alterações na atividade das enzimas hepáticas (ALT, AST e GGT), independentemente da etiologia da infecção viral (HBV ou HCV);
  - Pacientes com infecção crônica pelo HBV ou HCV, EM, DHM e controles, independente dos níveis das enzimas hepáticas;
  - Pacientes com e sem alterações na atividade da ALT, de acordo com a etiologia da infecção (HBV ou HCV);
  - Graus de fibrose hepática em pacientes com esquistossomose.
- Investigar se há efeito sinérgico entre os dados de RMN de 1H e níveis de atividade das enzimas hepáticas para a classificação do tipo de hepatite (B ou C).
- Comparar o MM obtido para fibrose hepática em pacientes com esquistossomose com método ultrassonográfico padrão e elastografia hepática.

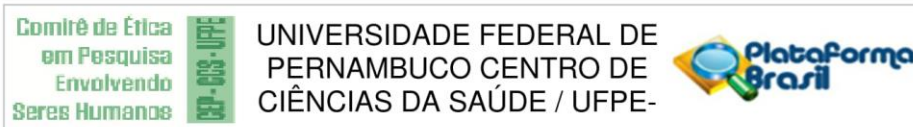
#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

A participação no estudo poderá trazer aos participantes envolvidos riscos físicos relacionados à coleta sanguínea na veia cubital, acarretando em uma leve dor e pequenos hematomas, contudo, não comprometerá a homeostasia do paciente. Para minimização dos riscos a coleta será realizada por profissionais experientes que tomarão os cuidados necessários para diminuir o risco de edema, e obedecerá às normas de biossegurança vigentes com a utilização de materiais estéreis e descartáveis.

Benefícios:

**Endereço:** Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600  
**UF:** PE **Município:** RECIFE  
**Telefone:** (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 1.782.771

Os benefícios que os participantes terão será a realização de um exame de espectroscopia por ressonância magnética de soro sem nenhum custo, e a contribuição para o desenvolvimento de um método diagnóstico, minimamente invasivo, que visa associar o perfil metabólico desses indivíduos à presença de hepatite B ou C, e esquistossomose poderão contribuir para o desenvolvimento de um método diagnóstico de fibrose hepática, minimamente invasivo.

#### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

O Projeto de relevância, o qual trata de um estudo observacional analítico constituído de duas etapas, uma realizada através de um caso-controle e a outra, um estudo de validação fase I/fase II adequado para a análise do modelo metabonômico. Na etapa de caso controle serão incluídos os pacientes com diagnóstico prévio de infecção crônica pelo HBV (Grupo I), ou pelo HCV (Grupo II), com esquistossomose pura (Grupo III), com doença hepática mista-DHM (Grupo IV), e indivíduos imunes ao HBV (Grupo V). Na etapa de validação de fase I serão construídos modelos metabonômicos para diferenciar os indivíduos com infecção crônica pelo HBV ou HCV, com e sem alterações das enzimas hepáticas, pacientes com esquistossomose mansônica-EM, DHM e controles. Na fase II será realizada validação dos modelos para discriminar os pacientes com e sem alteração da atividade enzimática e para diferenciar os graus de fibrose hepática em pacientes com esquistossomose. Assim, serão incluídos amostras de soro coletadas no ambulatório de Gastroenterologia do HC-UFPE, de pacientes dos referidos grupos. Os espectros de RNM de 1H serão obtidos utilizando-se o equipamento VARIAN Unity Plus 300. Os MM serão processados utilizando a Análise de Componentes Principais (PCA), a Análise de Discriminante Linear (LDA) e a Análise Discriminante Ortogonal por Mínimos Quadrados Parciais (OPLS-DA), a partir da matriz de escores da PCA, utilizando a plataforma online do MetaboAnalyst, versão 3.0. Os valores de sensibilidade, especificidade, acurácia serão obtidos através do resultado da LDA, e a significância estatística será determinada por Validação Cruzada e pela aplicação do Teste F, usando o software Statistica 10.

#### **Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Todos os termos de apresentação obrigatória foram apresentados.

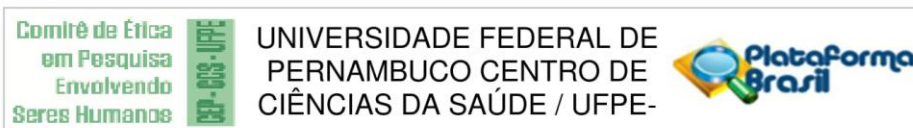
#### **Recomendações:**

Incluir o nome do Co-orientador no TCLE, Incluir o nome da colaboradora no Projeto e

Incluir a assinatura do orientador, co-orientador e colaborador no Termo de Compromisso.

**Endereço:** Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600  
**UF:** PE **Município:** RECIFE  
**Telefone:** (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br





Continuação do Parecer: 1.782.771

#### Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O Projeto atende as exigências em pesquisa com seres humanos. Dessa forma, não há pendências, mas há sugestões que estão contidas no item recomendações

#### Considerações Finais a critério do CEP:

O Protocolo foi avaliado na reunião do CEP e está APROVADO para iniciar a coleta de dados. Informamos que a APROVAÇÃO DEFINITIVA do projeto só será dada após o envio da Notificação com o Relatório Final da pesquisa. O pesquisador deverá fazer o download do modelo de Relatório Final para enviá-lo via "Notificação", pela Plataforma Brasil. Siga as instruções do link "Para enviar Relatório Final", disponível no site do CEP/UFPE. Após apreciação desse relatório, o CEP emitirá novo Parecer Consubstanciado definitivo pelo sistema Plataforma Brasil.

Informamos, ainda, que o (a) pesquisador (a) deve desenvolver a pesquisa conforme delineada neste protocolo aprovado, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao voluntário participante (item V.3., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

Eventuais modificações nesta pesquisa devem ser solicitadas através de EMENDA ao projeto, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

Para projetos com mais de um ano de execução, é obrigatório que o pesquisador responsável pelo Protocolo de Pesquisa apresente a este Comitê de Ética, relatórios parciais das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação (item X.1.3.b., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

O CEP/UFPE deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (item V.5., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). É papel do/a pesquisador/a assegurar todas as medidas imediatas e adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e ainda, enviar notificação à ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, junto com seu posicionamento.

#### Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_791495.pdf	26/09/2016 10:09:59		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_CEP_26_09_16.pdf	26/09/2016 10:07:47	Joelma Carvalho Santos	Aceito

**Endereço:** Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS

**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600

**UF:** PE **Município:** RECIFE

**Telefone:** (81)2126-8588

**E-mail:** cepccs@ufpe.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
PERNAMBUCO CENTRO DE  
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-



Continuação do Parecer: 1.782.771

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	23/09/2016 11:12:59	Joelma Carvalho Santos	Aceito
Outros	Carta_anuencia_SAME.pdf	23/09/2016 11:11:02	Joelma Carvalho Santos	Aceito
Outros	Autorizacao_uso_de_dados.pdf	23/09/2016 11:10:20	Joelma Carvalho Santos	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_CEP.pdf	23/09/2016 11:09:03	Joelma Carvalho Santos	Aceito
Outros	Carta_anuencia_DQF_UFPE.jpg	16/09/2016 13:15:24	Joelma Carvalho Santos	Aceito
Outros	Termo_compromisso_confidencialidade.pdf	12/09/2016 11:47:52	Joelma Carvalho Santos	Aceito
Outros	Autorizacao_amstras.pdf	12/09/2016 11:46:38	Joelma Carvalho Santos	Aceito
Outros	Carta_anuencia_amb_gastro.pdf	12/09/2016 11:45:37	Joelma Carvalho Santos	Aceito
Outros	Lattes_prof_Edmundo.pdf	12/09/2016 11:44:39	Joelma Carvalho Santos	Aceito
Outros	Lattes_prof_Ricardo.pdf	12/09/2016 11:44:18	Joelma Carvalho Santos	Aceito
Outros	Lattes_Andrea.pdf	12/09/2016 11:44:00	Joelma Carvalho Santos	Aceito
Outros	Lattes_Joelma.pdf	12/09/2016 11:43:39	Joelma Carvalho Santos	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

RECIFE, 19 de Outubro de 2016

Assinado por:  
**LUCIANO TAVARES MONTENEGRO**  
(Coordenador)

**Endereço:** Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS

**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600

**UF:** PE **Município:** RECIFE

**Telefone:** (81)2126-8588

**E-mail:** cepccs@ufpe.br



## ANEXO C – ARTIGO PUBLICADO



## RESEARCH ARTICLE

# Diagnosis of coinfection by schistosomiasis and viral hepatitis B or C using $^1\text{H}$ NMR-based metabolomics

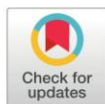
Liana Ribeiro Gouveia<sup>1\*</sup>, Joelma Carvalho Santos<sup>2</sup>, Ronaldo Dionísio Silva<sup>1</sup>, Andrea Dória Batista<sup>2,3</sup>, Ana Lúcia Coutinho Domingues<sup>2</sup>, Edmundo Pessoa de Almeida Lopes<sup>2,3†</sup>, Ricardo Oliveira Silva<sup>1‡</sup>

**1** Postgraduate Program in Chemistry, Fundamental Chemistry Department, Center for Exact and Natural Sciences, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco, Brazil, **2** Postgraduate Program in Tropical Medicine, Center for Health Sciences, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco, Brazil, **3** Department of Internal Medicine, Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco, Brazil

\* These authors contributed equally to this work.

† These authors also contributed equally to this work.

\* lianargouveia@gmail.com



## Abstract

### OPEN ACCESS

**Citation:** Gouveia LR, Santos JC, Silva RD, Batista AD, Domingues ALC, Lopes EPdA, et al. (2017) Diagnosis of coinfection by schistosomiasis and viral hepatitis B or C using  $^1\text{H}$  NMR-based metabolomics. PLoS ONE 12(8): e0182196. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182196>

**Editor:** Michael H. Hsieh, George Washington University, UNITED STATES

**Received:** May 3, 2017

**Accepted:** July 13, 2017

**Published:** August 1, 2017

**Copyright:** © 2017 Gouveia et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper.

**Funding:** The authors received no specific funding for this work.

**Competing interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

## Background

Diagnosis of liver involvement due to schistosomiasis in asymptomatic patients from endemic areas previously diagnosed with chronic hepatitis B (HBV) or C (HCV) and periportal fibrosis is challenging. H-1 Nuclear Magnetic Resonance (NMR)-based metabolomics strategy is a powerful tool for providing a profile of endogenous metabolites of low molecular weight in biofluids in a non-invasive way. The aim of this study was to diagnose periportal fibrosis due to schistosomiasis mansoni in patients with chronic HBV or HCV infection through NMR-based metabolomics models.

## Methodology/Principal findings

The study included 40 patients divided into two groups: (i) 18 coinfecting patients with schistosomiasis mansoni and HBV or HCV; and (ii) 22 HBV or HCV monoinfected patients. The serum samples were analyzed through H-1 NMR spectroscopy and the models were based on Principal Component Analysis (PCA) and Partial Least Squares—Discriminant Analysis (PLS-DA). Ultrasonography examination was used to ascertain the diagnosis of periportal fibrosis. Exploratory analysis showed a clear separation between coinfecting and monoinfected samples. The supervised model built from PLS-DA showed accuracy,  $R^2$  and  $Q^2$  values equal to 100%, 98.1% and 97.5%, respectively. According to the variable importance in the projection plot, lactate serum levels were higher in the coinfecting group, while the signals attributed to HDL serum cholesterol were more intense in the monoinfected group.

## Conclusions/Significance

The metabolomics models constructed in this study are promising as an alternative tool for diagnosis of periportal fibrosis by schistosomiasis in patients with chronic HBV or HCV infection from endemic areas for *Schistosoma mansoni*.

## Introduction

Schistosomiasis is a widespread disease in the developing world and the most important water-based disease of tropical zone [1]. This neglected disease affects 200 million people in 78 countries, mainly across Africa, Asia and South America, and remains a major public health problem [2]. In Brazil, *Schistosoma mansoni* has infected approximately 12 million persons, mostly in the Northeastern region [3].

Schistosomiasis mansoni (SM) affects the mesenteric portal venous system with a range of clinical manifestations, from asymptomatic to extremely severe disease. Although, about 40% of infected patients are asymptomatic and only 10% have a more severe disease [4]. In the liver, the pathogenesis of SM is related to the granuloma formation around the eggs, leading to periportal fibrosis (Symmers' fibrosis) and subsequent portal hypertension, splenomegaly and esophageal varices [5]. The rupture of esophageal varices may promote digestive hemorrhage requiring blood transfusion that would spread hepatic virus.

Data on schistosomiasis, hepatitis B virus (HBV) or hepatitis C virus (HCV) coinfection are inconsistent [6]. It is known that the coinfection can aggravate or accelerate the evolution of fibrosis, and a high prevalence of the coinfection is often observed in countries where SM is endemic [5,7].

Schistosomiasis infections are diagnosed by a clinical history of contact with a fresh water source, such as rivers or streams from endemic areas, followed by the detection of eggs in the stool [8]. Moreover, the presence of periportal fibrosis is mainly established by imaging methods such as ultrasonography (US), CT scan and MR scan [2]. US is considered as the primary modality of choice and plays an integral role in the diagnosis of liver involvement in schistosomiasis, since it can show fibrosis around the periportal spaces, splenomegaly, enhanced portal vein dimensions, and the presence of collateral vessels [5,9]. However, US is a subjective procedure, examiner-dependent and the liver parenchymal heterogeneity caused by viral infection might hamper visualization of periportal fibrosis in some patients [10].

Since the coinfection of schistosomiasis with HBV or HCV can aggravate the evolution of fibrosis, the diagnosis of coinfection is crucial to evaluate the severity of the disease process and its complications [2]. Hence, there is a need for more accurate and sensitive diagnostic techniques for periportal fibrosis, mainly for asymptomatic chronic schistosomiasis coinfecting patients.

As an alternative, the Nuclear Magnetic Resonance (NMR)-based metabolomics strategy has proved its value in disease diagnosis. This strategy is often used when there is interest in classifying samples by their biochemical status in response to diseases [11,12], since NMR spectroscopy is a powerful tool for identifying changes in metabolite profiling as a result of changes in the biochemical status. A disadvantage is the fact that an NMR spectrometer is expensive. However, comparing to US, NMR is not a subjective technique. Moreover, NMR offers a non-invasive analysis and with only one serum sample it would be possible to find out with high accuracy if the patient has coinfection or not. The use of specific statistical tools for an efficient interpretation of NMR spectra is necessary, due to complexity of the process [13].

Many encouraging results have been obtained using NMR-based metabolomics to investigate diseases, including studies on hepatitis C [14], urological cancer [15] and schistosomiasis [16,17].

Therefore, the aim of this study was to diagnose periportal fibrosis due to schistosomiasis mansoni in patients with chronic HBV or HCV infection through  $^1\text{H}$  NMR-based metabolomics models.

## Patients and methods

### Patient characteristics

The study included 40 patients aged between 21 and 82 years attending the Hepatology outpatient clinic at the Hospital das Clínicas of Universidade Federal de Pernambuco (HC-UFPE) from October 2012 to May 2016. They were stratified into two groups: 18 coinfecting patients with SM and HBV or HCV chronic infection and 22 HBV or HCV chronic mono-infected patients. Among the coinfecting group, 7 had HBV infection (38.9%) and 11 HCV (61.1%). Among the mono-infected group, 17 had HBV infection (77.3%) and 5 HCV (22.7%).

The diagnosis of schistosomiasis mansoni was based on the clinical history of contact with fresh water sources from endemic areas and reports of prior treatment for schistosomiasis. The diagnosis of periportal fibrosis was confirmed by US findings, along with hypertrophy of the left liver lobe and splenomegaly. US exams were performed by a single experienced operator using a Siemens Acuson X 150<sup>®</sup> device with a 3.5 MHz convex transducer.

Hepatitis chronic infection was diagnosed by hepatitis B surface antigen (HBsAg) and total hepatitis B core antibody (anti-HBc) positive results or anti-HCV antibodies positive, for more than 6 months, detected by microparticle immunoassay (CMIA) by Architect (Abbott Diagnostics, USA) at the Central Laboratory of (HC-UFPE).

Patients receiving any antiviral treatment, ethanol consumption, HIV coinfection or undergoing immunosuppressive therapy were excluded from the study.

### Ethics statement

This study was approved by the Ethics Committee on Research Involving Human Subjects of the Health Sciences Center—Universidade Federal de Pernambuco (CCS-UFPE), Recife, Brazil (Approval no. 1.782.771/2016) and all patients were adults and signed terms of informed consent.

### Sample collection and laboratory analysis

Sera from all patients were collected and liver function tests including alanine and aspartate aminotransferase (ALT and AST), gamma-glutamyl transferase (GGT), alkaline phosphatase (ALP), and lipid profile (total cholesterol, HDL cholesterol, LDL cholesterol and triglycerides) were carried out using Wiener Lab<sup>®</sup> kits in a Wiener Lab<sup>®</sup> autoanalyzer (Wiener Lab Group, Argentina), according to the manufacturer's instructions. Part of the sera was stored at minus 20°C for a short period of time until the NMR analysis could be performed.

Fibrosis stage for both groups was based on AST to Platelet Ratio Index (APRI) with a cut-off score of 1.5 for detection of significant fibrosis (F2 to F4 by METAVIR) [18]. In addition, periportal fibrosis on the coinfecting group was based on US patterns in mild, moderate or advanced fibrosis, according to the World Health Organization's Niamery protocol [19], using a Siemens Acuson X 150<sup>®</sup> with a 3.5 MHz convex transducer for all patients by the same researcher.

### Univariate statistical analysis

To investigate the distribution of demographic and clinical laboratory data between groups, univariate tests were performed using GraphPad Prism 6 software (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA) with unpaired Student's *t*-test, Mann-Whitney, Fisher's exact or  $\chi^2$  tests, as appropriate. A *p* value  $<0.05$  was set as the level of statistical significance.

### NMR analysis

Serum samples were prepared by mixing 400  $\mu$ l of serum and 200  $\mu$ l of D<sub>2</sub>O, using the signal attribute to lactate ( $\delta$  1.33 ppm) as a chemical shift reference. All <sup>1</sup>H NMR spectra were recorded in a Varian Unity Plus spectrometer operating at 300 MHz, using NMR tubes of 5 mm. After homogenization, the <sup>1</sup>H NMR spectrum was acquired using a sequence of pulses with presaturation (PRESAT) of the water signal hyphenated to the Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) pulse sequence, which was employed as a T2 filter. The following parameters were used: spectral window of 4.8 kHz, saturation delay of 2.0 s, acquisition time of 1.704 s, 90° RF pulse, temperature of 25°C, 88 cycles, tau equal to 0.0004 s, bigtau equal to 0.07 s and 128 scans. The line broadening used was 0.3 Hz. Baseline and phase distortions were corrected manually. Using the MestreNova 9.0 software, the region between  $\delta$  4.20 and 0.04 ppm was binned into 104 bins with 0.04 ppm-wide bins. One matrix was built with 40 rows (cases) and 105 variables (bins of the <sup>1</sup>H NMR spectrum plus class variable), and then was submitted to multivariate analysis.

### Framework for chemometric analysis

Multivariate statistical treatment of spectra data allows a simple, fast and reliable analysis, using tools such as Principal Components Analysis (PCA), Partial Least Squares—Discriminant Analysis (PLS-DA) and Simple Classification Analysis (SIMCA) [20].

The models based on PCA and PLS-DA were constructed via the web-based platform for metabolomics studies, namely MetaboAnalyst 3.0 [21]. In the pre-processing step, each sample was normalized by sum (cumulative intensity of the spectrum). This was performed to compare the spectral data, avoiding problems with sample dilutions, for example [22]. The validation of the PLS-DA model was based on two methods: (i) the leave-one-out cross-validation method (LOOCV), where the optimal number of latent variables for the PLS-DA model was determined, thus providing the basis for the computation of the predictive ability ( $Q^2$ ), determination coefficient ( $R^2$ ), and the classification accuracy of the model; and (ii) the permutation test, which made 2000 permutations of the class label to verify the accuracy of the PLS-DA model.

The PLS-DA model also provided a quantitative measure of the discriminating power of each spectral bin. For this purpose, we made use of the variable importance in the projection (VIP) score. VIP is a weighted sum of squares of the PLS loadings. These weights are based on the amount of explained variance of the dependent variable in each PLS dimension. For deciding between discriminatory and non-discriminatory bins, a VIP score cut-off of 1 was used. Discriminatory signals were attribute to metabolites using HMDB platform and also based on the literature [23–26].

### Results

Table 1 displays the clinical and laboratory characteristics of the coinfectd and monoinfectd groups. There were no significant differences ( $p < 0.05$ ) between the two groups of patients,



Table 1. Clinical and laboratory characteristics of the coinfectd (n = 18) and monoinfected groups (n = 22).

Characteristics	Coinfectd group (n = 18)	Monoinfected group (n = 22)	p value
Age (years)	53.7± 13.7	45.6± 15.2	0.0856 <sup>a</sup>
Gender (n, %)			
Male	13(72.2%)	10(45.5%)	0.1159 <sup>b</sup>
Female	5(27.8%)	12(54.5%)	
ALT (/ULN)*	1.13(0.70–1.70)	0.82(0.61–0.82)	0.2595 <sup>c</sup>
AST (/ULN)*	0.96(0.63–1.60)	0.72(0.52–1.39)	0.3348 <sup>c</sup>
GGT(/ULN)*	1.87(0.61–4.23)	1.01(0.66–1.41)	0.2162 <sup>c</sup>
ALP (/ULN)*	1.57(1.09–2.20)	1.22(0.95–1.35)	0.0464 <sup>c</sup>
Total cholesterol (mg/dL)	155± 30.29	179.2± 35.66	0.0421 <sup>a</sup>
HDL (mg/dL)	47.67± 9.67	55.79± 14.85	0.0718 <sup>a</sup>
LDL (mg/dL)	86.44± 33.17	100.7± 31.74	0.2094 <sup>a</sup>
Triglycerides (mg/dL)*	93.35(71.9–134.9)	84.45(62.1–152.1)	0.7655 <sup>c</sup>
APRI	0.68(0.63–2.59)	0.42(0.27–0.56)	0.0536 <sup>c</sup>

<sup>a</sup>Unpaired t test;<sup>b</sup>Fisher's exact test;<sup>c</sup>Mann-Whitney test.

ALT: Alanine aminotransferase; ALP: Alkaline phosphatase; APRI: Aspartate-to-platelet ratio; AST: Aspartate aminotransferase; GGT: Gamma-glutamyl transferase; HBV: Hepatitis B virus; HCV: Hepatitis C virus; HS: Hepatic schistosomiasis; HDL: high density lipoprotein; LDL: low density lipoprotein. ULN: upper limits of normal. Data presented as mean ± standard deviation except those marked with an asterisk (\*), which are presented as median values (interquartile range in brackets).

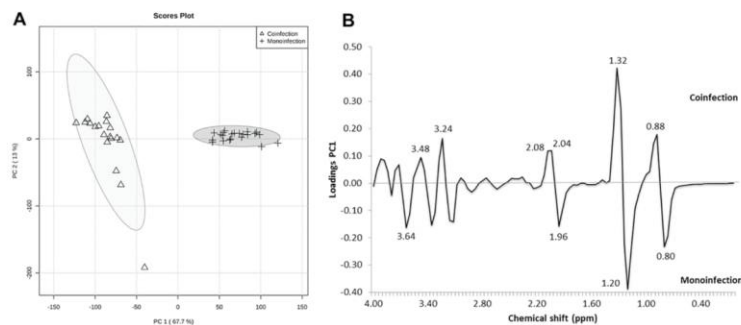
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182196.t001>

except for total serum cholesterol levels, which were slightly higher in the monoinfected group ( $p = 0.0421$ ).

Regarding the US patterns of periportal fibrosis in liver parenchyma due to SM infection, 9 patients showed mild (50%) and 4 moderate (22.2%) patterns, while 5 had advanced fibrosis (27.8%). Whereas, using APRI score to measure liver fibrosis, 8 patients (20%, 2 from the monoinfected group and 6 from the coinfectd group) had significant fibrosis stage (F2 to F4), while 32 patients (80%) had METAVIR stage below F2. The median APRI score for the mono-infected group was 0.42, and 0.68 for the coinfectd group.

Fig 1 exhibits the results obtained from PCA. PC1 and PC2 explain 80.7% of the variation in the data. The modeling phase for the two groups (coinfectd and monoinfected groups) was based on the PLS-DA formalism (Fig 2). This model was cross-validated, resulting in accuracy,  $R^2$  and  $Q^2$  values equal to 100%, 98.1% and 97.5%, respectively (Fig 2B). As well, we undertook an alternative way of model validation, using permutation analysis involving 2000 permutations of the class label and computation of the accuracy of the PLS-DA model with two components (as indicated in the LOOCV-based analysis), and the result was  $p < 0.0005$  (Fig 3A).

In the VIP score plot (Fig 3B), the two bins that best distinguished the samples were  $\delta$  1.32 and 1.20 ppm. These chemical shifts had been previously identified by visual inspection of the PCA loadings plot (Fig 1B). Considering a VIP value greater than 2.5, we identified three spectral regions responsible for the discrimination: (1)  $\delta$  1.28–1.36 ppm, attributed to methyl group from lactate; (2)  $\delta$  1.16–1.24 ppm, attributed to methylene groups from HDL cholesterol; and (3)  $\delta$  0.76–0.80 ppm, attributed to methyl groups of HDL cholesterol [27]. According to the VIP plot, the lactate serum levels were higher in the coinfectd group, while the signals attributed to HDL cholesterol were more intense in the monoinfected group. Fig 4 shows  $^1\text{H}$



**Fig 1. Results from PCA modeling.** (A) PCA scores of coinfecting patients and mono-infected patients. (B) Loading scatter plot of PC1 versus PC2, explaining 80.7% of variance.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182196.g001>

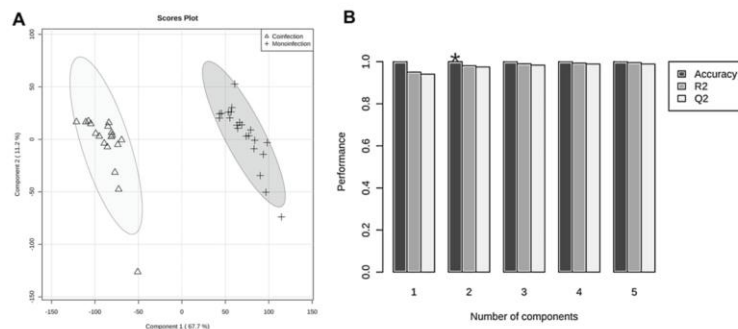
PRESAT-CPMG NMR spectra of serum samples, with indication of spectral regions used in the metabolomics modeling.

## Discussion

No statistically significant differences were found in the clinical and laboratory characteristics between the two groups of patients, except for total serum cholesterol levels.

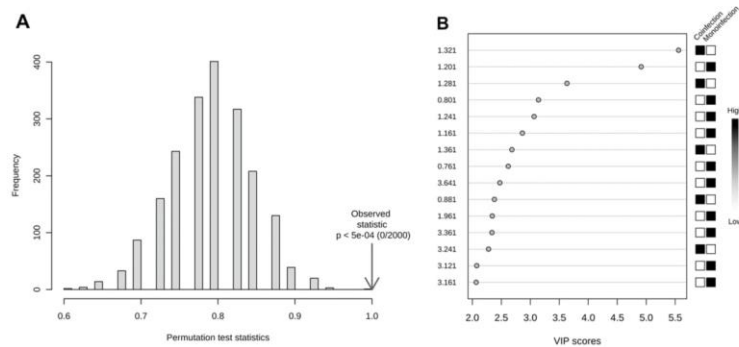
In this primary study, most patients in the coinfecting group (72.2%) showed mild/moderate periportal fibrosis in their US, making it difficult to differentiate between normal liver and other diseases [28]. In addition, in both groups there was a predominance of non-significant parenchymal fibrosis due to chronic viral hepatitis (METAVIR <F2).

In fact, diagnosis of liver involvement due to chronic SM in coinfecting patients with mild/moderate periportal fibrosis poses more challenges, since the US evaluation is more difficult



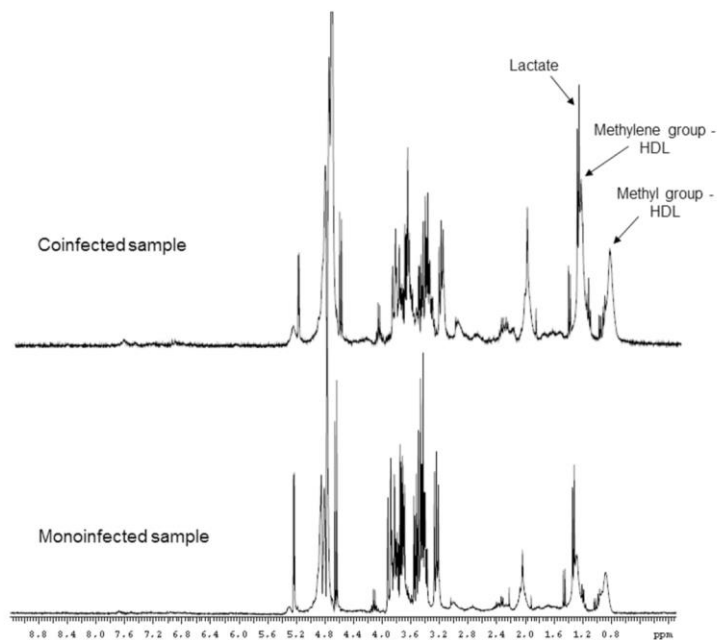
**Fig 2. Results from PLS-DA modeling.** (A) Scores scatter plot discriminating among coinfecting and mono-infected patients. (B) The optimal number of PLS-DA components, according to the squared correlation coefficient ( $R^2$ ), the predictive ability ( $Q^2$ ), and the accuracy of the model; the asterisk indicates the best number of components based on accuracy of the model.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182196.g002>



**Fig 3. Results from PLS-DA modeling.** (A) Permutation test statistic at 2000 permutations with observed statistic of the model prediction accuracy with  $p < 0.0005$ . (B) VIP scores from the metabolomics model using two components. The boxes on the right represent the relative integral of the corresponding bin in each group (monoinfection and coinfection).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182196.g003>



**Fig 4.  $^1\text{H}$  NMR spectra (PRESAT-CPMG, 300 MHz) of serum, with attribution of signals responsible for discrimination.**

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182196.g004>

due to the presence of parenchymal fibrosis induced by the virus, when compared to patients with advanced periportal fibrosis. Moreover, in this study only one third of coinfecting patients presented advanced periportal fibrosis, making the diagnosis more demanding. In clinical practice, these data show the meaning of the metabolomics models developed in our study.

As shown in Fig 1, the PCA results indicate that there is a natural grouping among the samples, discriminating between monoinfected patients and those coinfecting with SM. Fig 1A exhibits the relationship between the scores in PC1 and PC2, showing that the samples were only discriminated by PC1. The main discriminatory bins are ranged from  $\delta$  1.16 ppm to 1.36 ppm, being the signal centered at  $\delta$  1.20 ppm ( $\delta$  1.16–1.24 ppm), associated with the monoinfected group, while the signal centered at  $\delta$  1.32 ppm ( $\delta$  1.28–1.36 ppm) is associated with the coinfecting group. In fact, this assumption was also supported by the VIP score study as can be seen later in this section.

Similar to the exploratory PCA, PLS-DA makes it possible to see the significant difference between the groups of coinfecting patients and those monoinfected. The results of the PLS-DA model and its cross-validation show that the model is accurate and has a promising predictive performance for discriminating between coinfecting and monoinfected patients. In the permutation analysis involving 2000 permutations of the class label, the  $p < 0.0005$  indicates that the accuracy of a permuted PLS-DA model would rarely be better than the one of the model adjusted to the original data.

In fact, Wang et al., using a *S. mansoni*-mouse model based on  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy, reported that the lactate concentration varied between animals but was not found to be significant in discriminating between infected and control mice. Moreover, the metabolic signature of an *S. mansoni* infection consisted of reduced levels of the tricarboxylic acid cycle intermediates, including citrate, succinate, and 2-oxoglutarate, and increased levels of pyruvate, suggesting stimulated glycolysis [16,29]. Although, the consequences of glucose losses and the local elevation of lactate levels in the bloodstream depend on the severity of the infection and nutritional status of the host [17]. In addition, it is reported that in liver diseases, the aerobic metabolism is blocked, resulting in glycolysis and pentose phosphate pathway becoming the main glucose metabolic pathways. Glycolysis could produce large amounts of lactic acid, leading to a high lactic acid level [30].

There are reports in the literature that associate advanced fibrosis [31] and cirrhosis [30] with lower levels of LDL and HDL. In addition, schistosomiasis patients are reported to have dyslipidemia resulting in reduced total cholesterol, LDL and triglycerides when compared to healthy individuals, which depend on apolipoprotein E gene polymorphism [32].

In this study, we found that total cholesterol serum levels were lower in coinfecting patients when compared to the monoinfected group. Although not statistically significant, there was a tendency for lower values of HDL and LDL and higher values of triglycerides in the coinfecting group, which may explain the importance of signals attributed to HDL in the discrimination among the samples. Perhaps, the number of patients in our study was not sufficient to reveal differences that would be more significant.

It is interesting to note that the metabolomics models indicated differences between the groups regarding the serum levels of triglycerides and HDL. However, these differences were minimal and not observed in the serum levels measurement by conventional assays.

Furthermore,  $^1\text{H}$  NMR-based metabolomics has been used successfully to discriminate patients with HCV infection with high sensitivity and specificity [14]; to distinguish *S. mansoni*-infected from uninfected individuals before and after chemotherapy with praziquantel [17]; and to characterize metabolic profiles of liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma [33]. These results suggest that NMR spectra combined with pattern recognition analysis techniques offer a great benefit to early diagnosis of human diseases.



In summary, this paper has been an attempt to provide a framework for the discrimination between coinfecting patients with chronic SM and viral hepatitis. The proposed approach was based on exploratory PCA and subsequent PLS-DA of pre-processed binned  $^1\text{H}$  NMR spectra of serum samples. Exploratory PCA for  $^1\text{H}$  NMR data showed a clear separation between coinfecting and monoinfecting samples. The supervised model built using PLS-DA showed a predictive ability of 100% accuracy, indicating that the model can be useful for classification of serum samples of patients without prior knowledge of the condition (coinfection with SM or only HBV or HCV). The spectral regions responsible for discrimination were attributed to lactate ( $\delta$  1.32 ppm) and HDL (broad signals at  $\delta$  0.76–0.80 ppm and  $\delta$  1.16–1.24 ppm).

Therefore, this pilot study shows the potential for these metabolomics models to be used as an alternative to conventional methods to confirm the diagnosis of periportal fibrosis by schistosomiasis in patients with chronic HBV or HCV infection from endemic areas for *S. mansoni*.

## Acknowledgments

The authors thank the Central Analytical laboratory of Universidade Federal de Pernambuco and Central laboratory of Hospital das Clínicas, where the assays were performed.

## Author Contributions

**Conceptualization:** Edmundo Pessoa de Almeida Lopes, Ricardo Oliveira Silva.

**Data curation:** Liana Ribeiro Gouveia, Joelma Carvalho Santos, Ronaldo Dionísio Silva.

**Formal analysis:** Liana Ribeiro Gouveia, Joelma Carvalho Santos, Ronaldo Dionísio Silva.

**Investigation:** Joelma Carvalho Santos, Andrea Dória Batista, Ana Lúcia Coutinho Domingues.

**Methodology:** Liana Ribeiro Gouveia, Joelma Carvalho Santos.

**Project administration:** Edmundo Pessoa de Almeida Lopes, Ricardo Oliveira Silva.

**Software:** Liana Ribeiro Gouveia, Joelma Carvalho Santos, Ronaldo Dionísio Silva.

**Supervision:** Ana Lúcia Coutinho Domingues, Edmundo Pessoa de Almeida Lopes, Ricardo Oliveira Silva.

**Validation:** Liana Ribeiro Gouveia, Ronaldo Dionísio Silva, Ricardo Oliveira Silva.

**Visualization:** Joelma Carvalho Santos, Andrea Dória Batista, Ricardo Oliveira Silva.

**Writing – original draft:** Liana Ribeiro Gouveia, Joelma Carvalho Santos.

**Writing – review & editing:** Andrea Dória Batista, Ana Lúcia Coutinho Domingues, Edmundo Pessoa de Almeida Lopes, Ricardo Oliveira Silva.

## References

1. Li J V, Saric J, Wang Y, Keiser J, Utzinger J, Holmes E. Chemometric analysis of biofluids from mice experimentally infected with *Schistosoma mansoni*. *Parasit Vectors*. 2011; 4: 179. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-179> PMID: 21929782
2. Sah VK, Wang L, Min X, Rizal R, Feng Z, Ke Z, et al. Human schistosomiasis: A diagnostic imaging focused review of a neglected disease. *Radiol Infect Dis*. Elsevier Ltd; 2015; 2: 150–157. <https://doi.org/10.1016/j.jrid.2015.11.007>
3. Manzella A, Borba-Filho P, Brandt CT, Oliveira K. Brain magnetic resonance imaging findings in young patients with hepatosplenic schistosomiasis mansoni without overt symptoms. *Am J Trop Med Hyg*. 2012; 86: 982–987. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11-0419> PMID: 22665605

4. Barsoum RS, Esmat G, El-Baz T. Human Schistosomiasis: Clinical Perspective: review. *J Adv Res. Cairo University*; 2013; 4: 433–444. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2013.01.005> PMID: 25685450
5. Elbaz T, Esmat G. Hepatic and Intestinal Schistosomiasis: Review. *J Adv Res. Cairo University*; 2013; 4: 445–452. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2012.12.001> PMID: 25685451
6. Van-Lume DS, Albuquerque Mde F, Souza a I, Domingues a L, Lopes EP, Morais CN, et al. Association between Schistosomiasis mansoni and hepatitis C: systematic review. *Rev Saude Publica*. 2013; 47: 414–424. <https://doi.org/10.1590/S0034-910.2013047004247> PMID: 24037369
7. Gasim GI, Bella A, Adam I. Schistosomiasis, hepatitis B and hepatitis C co-infection. *Virol J*. 2015; 12: 1–6.
8. Gray DJ, Ross AG. Diagnosis and management of schistosomiasis Early manifestations. 2011; 1–12. <https://doi.org/10.1136/bmj.d2651> PMID: 21586478
9. Guimarães Cavalcanti M, Marcello de Araujo-Neto J, Mauro Peralta J. Schistosomiasis: Clinical management of liver disease. *Clin Liver Dis*. 2015; 6: 59–62. <https://doi.org/10.1002/cld.495>
10. Lambertucci JR. Revisiting the concept of hepatosplenic schistosomiasis and its challenges using traditional and new tools. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2014; 47: 130–136. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0186-2013> PMID: 24861284
11. Holmes E, Wijeyesekera A, Taylor-Robinson SD, Nicholson JK. The promise of metabolic phenotyping in gastroenterology and hepatology. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. Nature Publishing Group; 2015; 12: 458–471. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2015.114> PMID: 26194948
12. Yu M, Zhu Y, Cong Q, Wu C. Metabolomics Research Progress on Liver Diseases. *Can J Gastroenterol Hepatol*. Hindawi Publishing Corporation; 2017; 2017: 1–10. <https://doi.org/10.1155/2017/8467192> PMID: 28321390
13. Hewer R, Vorster J, Steffens FE, Meyer D. Applying biofluid 1H NMR-based metabolomic techniques to distinguish between HIV-1 positive/AIDS patients on antiretroviral treatment and HIV-1 negative individuals. *J Pharm Biomed Anal*. 2006; 41: 1442–1446. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.03.006> PMID: 16621406
14. Godoy MMG, Lopes EPA, Silva RO, Hallwass F, Koury LCA, Moura IM, et al. Hepatitis C virus infection diagnosis using metabolomics. *J Viral Hepat*. 2010; 17: 854–858. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2893.2009.01252.x> PMID: 20070502
15. Araújo L, Pinto F, Costa T, Silva R, Lima S, Silva R. Diagnosis of Urological Cancer by 1H NMR Based Metabolomics Urinalysis: A Pilot Study. *Br J Med Med Res*. 2017; 19: 1–8. <https://doi.org/10.9734/BJMMR/2017/30340>
16. Wang Y, Holmes E, Nicholson JK, Cloarec O, Chollet J, Tanner M, et al. Metabolomic investigations in mice infected with *Schistosoma mansoni*: an approach for biomarker identification. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101: 12676–12681. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404878101> PMID: 15314235
17. Balog CI, Meissner A, Göraler S, Bladergroen MR, Vennervald BJ, Mayboroda OA, et al. Metabolomic investigation of human *Schistosoma mansoni* infection. *Mol Biosyst*. 2011; 7: 1473–1480. <https://doi.org/10.1039/c0mb000262c> PMID: 21336380
18. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST Aids e Hepatites Virais. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite C e Coinfecções. Guia de vigilância em saúde. Brasília: Ministério da Saúde; 2015.
19. WHO. Ultrasound in schistosomiasis: a practical guide to the standardized use of ultrasonography for the assessment of schistosomiasis-related morbidity. In: Richter J, Hatz C, Campagne G, Bergquist NR, Jenkins JM, editors. Second international workshop, Niamey, Nigéria 1996. Geneva: World Health Organization; 2000. p. 49. [http://apps.who.int/schistosomiasis/resources/trd\\_str\\_sch\\_00.1/en/index.html](http://apps.who.int/schistosomiasis/resources/trd_str_sch_00.1/en/index.html)
20. Worley B, Powers R. Multivariate Analysis in Metabolomic. *Curr Metabolomics*. 2015; 1: 92–107. <https://doi.org/10.2174/2213235X11301010092> PMID: 26078916
21. Xia J, Sinelnikov I V., Han B, Wishart DS. MetaboAnalyst 3.0-making metabolomics more meaningful. *Nucleic Acids Res*. 2015; 43: W251–W257. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv380> PMID: 25897128
22. Sumner LW, Amberg A, Barrett D, Beale MH, Beger R, Daykin CA, et al. Proposed minimum reporting standards for chemical analysis Chemical Analysis Working Group (CAWG) Metabolomics Standards Initiative (MSI). *Metabolomics*. 2007; 3: 211–221. <https://doi.org/10.1007/s11306-007-0082-2> PMID: 24039616
23. Wishart DS, Jewison T, Guo AC, Wilson M, Knox C, Liu Y, et al. HMDB 3.0-The Human Metabolome Database in 2013. *Nucleic Acids Res*. 2013; 41: 801–807. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1065> PMID: 23161693
24. Wishart DS, Knox C, Guo AC, Eisner R, Young N, Gautam B, et al. HMDB: A knowledgebase for the human metabolome. *Nucleic Acids Res*. 2009; 37: 603–610. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn810> PMID: 18953024

25. Guleria A, Misra DP, Rawat A, Dubey D, Khetrapal CL, Bacon P, et al. Article NMR based serum metabolomics discriminates Takayasu Arteritis from Healthy Individuals : A proof of principle study NMR based serum metabolomics discriminates Takayasu Arteritis from Healthy Individuals : A proof of principle study Authors for Cor. 2015;
26. Li J, Zhao X, Liu Y, Peng X, Zhu S, Guo H, et al. 1HNMR-based metabolomic profile of rats with experimental acute pancreatitis. *BMC Gastroenterol*. 2014; 14: 115. <https://doi.org/10.1186/1471-230X-14-115> PMID: 24975214
27. Pinto J, Almeida LM, Martins AS, Duarte D, Barros AS, Galhano E, et al. Prediction of gestational diabetes through NMR metabolomics of maternal blood. *J Proteome Res*. 2015; 14: 2696–2706. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.5b00260> PMID: 25925942
28. Ruiz-Guevara R, de Noya BA, Valero SK, Lecuna P, Garassini M, Noya O. Clinical and ultrasound findings before and after praziquantel treatment among Venezuelan schistosomiasis patients. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2007; 40: 505–511. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822007000500003> PMID: 17992403
29. Githui EK, Damian RT, Aman RA. Schistosoma mansoni: Biochemical characterization of lactate transporters or similar proteins. *Exp Parasitol*. 2006; 114: 180–188. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2006.03.007> PMID: 16682030
30. Embade N, Mariño Z, Diercks T, Cano A, Lens S, Cabrera D, et al. Metabolic characterization of advanced liver fibrosis in HCV patients as studied by serum 1H-NMR spectroscopy. *PLoS One*. 2016; 11: 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155094> PMID: 27158896
31. Sands CJ, Guha IN, Kyriakides M, Wright M, Beckonert O, Holmes E, et al. Metabolic phenotyping for enhanced mechanistic stratification of chronic hepatitis C-induced liver fibrosis. *Am J Gastroenterol*. Nature Publishing Group; 2015; 110: 159–69. <https://doi.org/10.1038/ajg.2014.370> PMID: 25533003
32. Da Fonseca CSM, Pimenta Filho AA, Dos Santos BS, Da Silva CA, Domingues ALC, Owen JS, et al. Human plasma lipid modulation in schistosomiasis mansoni depends on apolipoprotein E polymorphism. *PLoS One*. 2014; 9: e101964. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101964> PMID: 25051269
33. Gao H, Lu Q, Liu X, Cong H, Zhao L, Wang H, et al. Application of 1H NMR-based metabolomics in the study of metabolic profiling of human hepatocellular carcinoma and liver cirrhosis. *Cancer Sci*. 2009; 100: 782–785. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2009.01086.x> PMID: 19469021