



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

JOELMA CARVALHO SANTOS

**A UTILIZAÇÃO DA METABONÔMICA NO DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO
CRÔNICA PELOS VÍRUS DAS HEPATITES B E C, E NA AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE DAS ENZIMAS HEPÁTICAS**

RECIFE/PE

2018

JOELMA CARVALHO SANTOS

**A UTILIZAÇÃO DA METABONÔMICA NO DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO
CRÔNICA PELOS VÍRUS DAS HEPATITES B E C, E NA AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE DAS ENZIMAS HEPÁTICAS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Medicina Tropical. Área de concentração: Doenças infecciosas e parasitárias.

Orientador:

Prof. Dr. Edmundo Pessoa de Almeida Lopes
Professor Associado do Departamento de
Medicina Clínica do CCS/UFPE

Coorientador:

Prof. Dr. Ricardo Oliveira da Silva
Prof. Adjunto do Departamento de Química
Fundamental do CCEN/UFPE

RECIFE/PE

2018

Catálogo na fonte:
bibliotecário: Aécio Oberdam, CRB4:1895

S231d Santos, Joelma Carvalho.
Diagnóstico das hepatites B e C, determinação do tipo de infecção e investigação da atividade das enzimas hepáticas por metabonômica / Joelma Carvalho Santos. – Recife: o autor, 2018.
145 f.; il; 30 cm.

Orientador: Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Saúde. Programa de pós-graduação em medicina tropical.
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. HBV. 2. HCV. 3. Metabolômica. 4. Aminotransferases. I. Lopes Neto, Edmundo Pessoa de Almeida (orientador). II. Título.

616 CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2018 - 040)



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

JOELMA CARVALHO SANTOS

**DIAGNÓSTICO DAS HEPATITES B E C, DETERMINAÇÃO DO TIPO DE
INFECÇÃO E INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS HEPÁTICAS POR
METABONÔMICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Medicina Tropical.

Aprovada em: 23/02/2018.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Edmundo Pessoa de Almeida Lopes (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia Coutinho Domingues (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof^a. Dr^a. Andrea Doria Batista (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof^a. Dr^a. Michele Maria Gonçalves de Godoy (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof. Dr. Jorge Luiz Neves (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)



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

REITOR

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITORA

Profa. Florisbela de Arruda Câmara e Siqueira Campos

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Ernani Rodrigues de Carvalho Neto

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Nicodemos Teles Pontes Filho

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

Maria Amélia Vieira Maciel

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

Valdênia Maria Oliveira de Souza

CORPO DOCENTE PERMANENTE

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

CORPO DOCENTE COLABORADOR

Líbia Cristina Rocha Vilela Moura
Virgínia Maria Barros de Lorena

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela força e coragem ao longo desta caminhada.

Aos meus pais, irmão, namorado e familiares que foram fundamentais neste processo e sempre me incentivaram e me apoiaram incondicionalmente.

Ao meus orientadores Prof. Dr. Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto e Prof. Dr. Ricardo Oliveira da Silva, por toda paciência, acolhimento, incentivo e apoio na orientação.

Aos amigos da pós-graduação Izolda Fernandes de Moura, Jussyêgles Pereira e Valdemir Júnior por toda amizade e companheirismo.

À Andrea Dória Batista e Michele Godoy por me acolherem no grupo de pesquisa e por toda a ajuda, paciência e aprendizado.

Aos amigos do Departamento de Química Fundamental (DQF/UFPE) Liana Gouveia, Tássia Costa e Ronaldo Silva por toda a paciência, acolhimento e parceria.

A todos os meus professores desde o ensino fundamental até a pós-graduação por me ajudarem a construir o conhecimento que adquiri e a descobrir a ciência e a pesquisa.

Aos médicos, funcionários e pacientes do ambulatório de Hepatologia do Hospital das Clínicas da UFPE, e à Caroline Pereira, Isabella Patrícia, Audrey Pimentel e Oneide, que me ajudaram muito durante a pesquisa.

A todos da Pós-Graduação em Medicina Tropical, do laboratório da Central Analítica do DQF/UFPE e do Laboratório Central do HC/UFPE.

Aos meus amigos: Tatiana Magalhães, Regina Oliveira, Maciel Marques, Tássio Martins, Deivysson Pontes, Kívia Queiroz e Vanessa Almeida pelo companheirismo e carinho.

RESUMO

A crescente utilização das ferramentas ômicas tem mostrado uma visão mais complexa das enzimas hepáticas na regulação do metabolismo e monitoramento da infecção crônica pelos vírus da hepatite B (HBV) e C (HCV). Assim, este estudo de validação fase I/II teve como objetivo construir modelos metabonômicos (MM), baseados em espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H , para diagnosticar a infecção crônica pelo HBV e pelo HCV, distinguir a infecção de acordo com o vírus relacionado, e avaliar a atividade das enzimas hepáticas (ALT, AST e GGT), em uma única amostra de soro. Foram incluídos no estudo 245 pacientes adultos com diagnóstico prévio de infecção crônica pelo HBV (n=117), HCV (n=86) e controles imunes ao HBV (n=42). Os espectros de RMN de ^1H foram obtidos utilizando o espectrômetro *VARIAN Unity Plus 300*, e os níveis de atividade enzimática por método cinético automatizado. Os MM foram obtidos através da Análise Discriminante Ortogonal por Mínimos Quadrados Parciais (OPLS-DA), utilizando a plataforma *MetaboAnalyst 3.6*. Na primeira etapa do trabalho, foram construídos quatro MM usando o formalismo OPLS-DA: (1) HBV *versus* controle; (2) HCV *versus* controle; (3) Infecção viral *versus* controle; e (4) HBV *versus* HCV. Ao comparar cada infecção com o grupo controle, observou-se melhor especificidade (Sp) para o modelo HCV (97,6%) e melhor sensibilidade (Sn) para o modelo HBV (95,7%). Além disso, o MM infecção viral *versus* controle apresentou melhor especificidade (97,6%) com maiores níveis de carboidratos e aminoácidos no grupo de infectados, enquanto o modelo HBV *versus* HCV apresentou melhor sensibilidade (93,4%) com infecção pelo HBV associada a maiores níveis de aminoácidos, e infecção pelo HCV a sinais mais intensos de carboidratos. Na segunda etapa do estudo, foram construídos três MM com amostras de pacientes infectados pelo HBV ou HCV para avaliação da atividade enzimática: (1) ALT; (2) AST; e (3) GGT; e quatro MM de acordo com o tipo de vírus: (1) ALT em HBV; (2) AST em HBV; (3) ALT em HCV; (2) AST em HCV. No modelo ALT, observou-se Sn de 95,4%, Sp de 93,9% com altas concentrações de carboidratos e menores níveis de HDL, LDL, aminoácidos, espécies insaturadas e aromáticas no grupo com ALT aumentada. Acurácia semelhante foi encontrada para o modelo AST, com Sn de 95,5%, Sp de 96,5%, e atividade aumentada da AST associada a maiores concentrações de carboidratos e menores níveis de aminoácidos. Para o modelo GGT, os resultados foram menos satisfatórios. Em relação aos MM pelo tipo de vírus,

observou-se melhor desempenho para o modelo ALT em pacientes com HBV, com Sn de 96,1%, enquanto em pacientes com HCV, o MM AST apresentou melhores resultados com Sn de 95,2%, Sp de 100%. Desta forma, os MM construídos foram capazes de, com um único espectro de RMN de ^1H , diagnosticar a infecção crônica pelo HBV e HCV, distinguir a infecção de acordo com o vírus, avaliar a atividade sérica das enzimas hepáticas, e a classe de componentes associada com a discriminação, constituindo um método complementar promissor para investigação da doença hepática na prática clínica.

Palavras-chave: HBV. HCV. Metabolômica. Aminotransferases. Espectroscopia de Ressonância Magnética de Hidrogênio-1.

ABSTRACT

The increasing use of the omics strategy has shown a more complex view of liver enzymes in the metabolic regulation and assessment of chronic hepatitis B (HBV) and C (HCV) infection. Accordingly, the aim of this phase I/II validation study was to build metabonomic models (MM) based on ^1H - nuclear magnetic resonance (NMR) to diagnose chronic HBV and HCV infection, to distinguish the infection according to the type of virus related, and to evaluate liver enzymes (ALT, AST and GGT) activity alterations, in a single serum sample. The study included 245 adult patients previously diagnosed with HBV (n=117), HCV (n=86) and a control group immune to HBV infection (n=42). ^1H -NMR spectra were measured on a Varian Unity Plus 300 MHz spectrometer and liver enzymes activity were carried out using a kinetic enzymatic method. The MM were based on Orthogonal Partial Least Squares – Discriminant Analysis (OPLS-DA), using MetaboAnalyst 3.6 platform. In the first step of the work, four OPLS-DA MM were built: (1) HBV versus Control; (2) HCV versus Control (3) Viral infection versus Control; and (4) HBV versus HCV. When each viral infection was compared to the control group, it was observed a higher specificity for the HCV model (97.6%) and higher sensitivity (95.7%) for the HBV model. In addition, the viral infection versus control model showed higher specificity (97.6%) with higher levels of carbohydrates and amino acids in the viral infection group, whereas the HBV versus HCV model showed slightly higher sensitivity (93.4%) with HBV infection associated with higher levels of amino acids, and HCV infection related to more intense carbohydrates signals. In the second step of the study, three models were built with samples of HBV and HCV infected patients to evaluate liver enzymes activity: (1) ALT; (2) AST; and (3) GGT; and four MM according the type of virus: (1) ALT in HBV; (2) AST in HBV; (3) ALT in HCV; (2) AST in HCV. In the ALT model, we observed Sn of 95.4%, Sp of 93.9% with higher concentration carbohydrates and lower levels of HDL, LDL, amino acids and aromatic and unsaturated species in the higher ALT activity group. Similar accuracy was found for the AST model, with Sn of 95.5%, Sp of 96.5%, and higher AST activity were also associated with higher concentration of carbohydrates e lower levels of amino acids. For the GGT model the results were less satisfactory. Regarding the MM according to the type of virus, it was observed a higher performance for the ALT model in HBV patients, with Sn of 96.1%, Sp 91.2%, whereas for HCV patients, the AST model showed higher performance with Sn of 95.2%, Sp of

100%. Therefore, the MM built were able to diagnose chronic HBV or HCV infection, distinguish the type of infection according to the virus, evaluate liver enzymes activity and to identify the classes of compounds associated with discrimination, in a single serum sample, showing to be a promising complementary method to assess liver disease in clinical practice.

Keywords: HBV. HCV. Metabolomics. Aminotransferases. Proton Magnetic Resonance Spectroscopy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição da infecção crônica pelo HBV no mundo.	17
Figura 2 – Curso sorológico típico da hepatite B aguda (A) e crônica (B).	19
Figura 3 – Distribuição da infecção pelo HCV no mundo.	21
Figura 4 – Marcadores da infecção pelo HCV.	22
Figura 5 – Representação esquemática das diferentes localizações das proteínas ALT1 (A) e ALT2 (B) a nível celular.	24
Figura 6 – O processo de análise metabonômica.	29
Figura 7 – Estratégia para a análise metabonômica multivariada.	31
Figura 8 – Aquisição do espectro após a sequência de pulsos (A) PRESAT e (B) CPMG.	44
Figura 9 – Distribuição de 203 pacientes infectados pelo HBV ou HCV em conjuntos de acordo com a combinação de alterações nos níveis séricos enzimáticos.	47

Artigo 1

Figura 1 - Gráficos de escores bidimensional dos modelos OPLS-DA para o diagnóstico da infecção crônica pelo HBV e pelo HCV, em Recife/PE, no período de 2014 a 2016	53
Figura 2 - Resultado do modelo OPLS-DA comparando amostras de pacientes com infecção viral crônica B ou C e controles, em Recife/PE, no período de 2014 a 2016.	56
Figura 3 - Resultado do modelo OPLS-DA comparando amostras de pacientes com infecção viral crônica B ou C e controles, em Recife/PE, no período de 2014 a 2016.	57

Artigo 2

Figura 1 - Resultado do modelo OPLS-DA comparando amostras de pacientes com a atividade da enzima ALT aumentada e normal, em 203 infectados pelo HBV ou HCV, em Recife/PE, no período de 2014 a 2016.	72
Figura 2 - Resultado do modelo OPLS-DA comparando amostras de pacientes com a atividade da enzima AST aumentada e normal, em 203 infectados pelo HBV ou HCV, em Recife/PE, no período de 2014 a 2016.....	74
Figura 3 - Gráficos de escores bidimensional da OPLS-DA comparando a atividade das enzimas hepáticas aumentada e normal, estratificada pela infecção por HBV ou HCV, em Recife/PE, no período de 2014 a 2016.....	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estudos relevantes em metabonômica e metabolômica avaliando pacientes com infecção pelo HBV e pelo HCV e principais metabólitos identificados no soro	33
---	----

Artigo 1

Tabela 1 - Características demográficas e exames bioquímicos e de avaliação hepática de pacientes com infecção crônica pelo HBV (n=117), pelo HCV (n=86) e controles (n=42), em Recife/PE, no período de 2014 a 2016.....	53
Tabela 2 - Desempenho dos modelos metabonômicos OPLS-DA para identificar infecção crônica pelo HBV ou HCV, em Recife/PE, no período de 2014 a 2016.	55

Artigo 2

Tabela 1 - Características demográficas e exames bioquímicos e de avaliação hepática de 203 pacientes com infecção crônica pelo HBV ou HCV, de acordo com os níveis séricos aumentados ($>1\times$ LSN) versus normais ($\leq 1\times$ LSN) para as enzimas ALT de ALT, AST e GGT, em Recife/PE, no período de 2014 a 2016.	71
Tabela 2 - Desempenho dos modelos metabonômicos OPLS-DA para identificar níveis séricos elevados das enzimas ALT, AST e GGT em pacientes com infecção crônica pelo HBV ou HCV, em Recife/PE, no período de 2014 a 2016.	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	Alanina aminotransferase
Anti-HBc	Anticorpo contra o antígeno do núcleo do vírus da hepatite B
Anti-HBe	Anticorpo contra o antígeno “e” da hepatite B
Anti-HBs	Anticorpo contra o antígeno de superfície do vírus da hepatite B
Anti-HCV	Anticorpo contra o vírus da hepatite C
APRI	Índice da relação aspartato aminotransferase sobre plaquetas
AST	Aspartato aminotransferase
ASTc	Aspartato aminotransferase citoplasmática
ASTm	Aspartato aminotransferase mitocondrial
CPMG	Sequência de pulsos de radiofrequência Car-Purcell-Meiboom-Gill
D ₂ O	Água deuterada
ELISA	Ensaio imunoenzimático
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FIB-4	Índice de fibrose baseado em quatro fatores
GGT	Gama glutamil transferase
HBeAg	Antígeno “e” da hepatite B
HBsAg	Antígeno de superfície do vírus da hepatite B
HBV	Vírus da hepatite B
HBV-DNA	Ácido desoxirribonucleico do vírus da hepatite B
HCC	Carcinoma hepatocelular
HCV	Vírus da hepatite C
HCV-RNA	Ácido ribonucleico do vírus da hepatite C
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
INR	Razão normalizada internacional
LDA	Análise discriminante linear
LR	Razão de verossimilhança
LSN	Limite superior da normalidade
MS	Espectrometria de massas
NAT	Tecnologia de amplificação de ácidos nucleicos
OPLS-DA	Análise discriminante ortogonal por mínimos quadrados parciais
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PC	Componente principal
PCA	Análise de componentes principais
PLS-DA	Análise discriminantes por mínimos quadrados parciais
PRESAT	Sequência de pulsos de radiofrequência com pré-saturação
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
RMN	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear
RMN de ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	17
3 DEFINIÇÃO DOS OBJETIVOS	37
3.1 OBJETIVO GERAL	37
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
4 METODOLOGIA	38
4.1 DESENHO DO ESTUDO	38
4.2 LOCAL DO ESTUDO	38
4.3 POPULAÇÃO DO ESTUDO	39
4.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO	39
4.5 TIPO DE AMOSTRAGEM E DEFINIÇÃO DO TAMANHO DA AMOSTRA	39
4.6 DEFINIÇÃO E CATEGORIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS E COLETA DE DADOS	41
4.7 ANÁLISE DE DADOS	44
4.8 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	45
5 RESULTADOS	46
5.1 ARTIGO 1 - Diagnóstico da infecção crônica pelos vírus das hepatites B e C por metabonômica baseada em RMN de ¹ H (versão em inglês - Apêndice B)	48
5.2 ARTIGO 2 – A utilização da metabonômica na identificação de alterações na atividade das enzimas hepáticas em pacientes com infecção crônica pelos vírus das hepatites B ou C (versão em inglês - Apêndice C)	66
6 CONCLUSÕES	85
7 LIMITAÇÕES METODOLÓGICAS DO ESTUDO E PERSPECTIVAS	86
REFERÊNCIAS	87
APÊNDICES	94
APÊNDICE A – Termo de consentimento livre e esclarecido	95
APÊNDICE B – Artigo 1 em inglês	97
APÊNDICE C – Artigo 2 em inglês	116
APÊNDICE D – Figuras dos resultados suplementares do Artigo 1	136
APÊNDICE E – Figuras dos resultados suplementares do Artigo 2	137
ANEXOS	140
ANEXO A – Parecer consubstanciado do CEP	141

1 INTRODUÇÃO

A evolução subclínica da infecção aguda pelos vírus da hepatite B (HBV) e da hepatite C (HCV) resulta em infecções que geralmente só são diagnosticadas quando se tornam crônicas. Assim, o desenvolvimento de novos métodos diagnósticos e um melhor entendimento das infecções por estes vírus são importantes na identificação precoce destas doenças e na prevenção de complicações mais graves (IRSHAD; MANKOTIA; IRSHAD, 2013).

De fato, nestes pacientes, o monitoramento dos níveis de atividade das enzimas hepáticas alanina e aspartato aminotransferase (ALT e AST) e gama glutamil transferase (GGT) mostra-se importante na caracterização do estágio da doença hepática, decisões de terapias antivirais e necessidade de vigilância. Além disso, a capacidade de estimar com exatidão os níveis de AST e ALT é essencial para calcular índices não invasivos, como o índice da relação aspartato aminotransferase sobre plaquetas (APRI) e o índice de fibrose baseado em quatro fatores (FIB-4), para identificar fibrose avançada (WHO, 2015).

Como alternativa, a metabonômica mostra-se como uma estratégia que permite fornecer informações importantes sobre o prognóstico, diagnóstico e monitorização da progressão de doenças de forma objetiva (DONA et al., 2014). Através de padrões de metabólitos endógenos é possível caracterizar um perfil de identificação de forma minimamente invasiva e utilizando uma única amostra (BARTON et al., 2008; HOLMES et al., 2015), principalmente urina, soro ou plasma (BOLLARD et al., 2005).

A metabonômica tem sido empregada com sucesso na identificação e no estudo de várias doenças infecciosas como a hepatite B (HOU; DUAN, 2016), hepatite C (GODOY et al., 2010), a coinfeção por esquistossomose e hepatite B ou C (GOUVEIA et al., 2017), infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (SITOLE; WILLIAMS; MEYER, 2012), e complicações da doença hepática crônica viral como fibrose hepática (BATISTA et al., 2018; EMBADE et al., 2016; SANDS et al., 2015), e carcinoma hepatocelular (HCC) (LADEP et al., 2014). Esses estudos geralmente envolvem a utilização de uma técnica de espectroscopia de alta resolução, geralmente ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H) ou espectrometria de massa, em conjunto com ferramentas de análise estatística multivariada (BARTON et al., 2008).

Ainda que haja escassez de estudos avaliando a utilização da metabonômica baseada em RMN de ^1H no diagnóstico das hepatites B e C e identificação da atividade das enzimas hepáticas, em estudo publicado pelo nosso grupo de pesquisa, foi desenvolvido um modelo metabonômico capaz de diferenciar pacientes infectados pelo HCV de indivíduos não infectados (imunes ao HBV), em amostras de urina, com sensibilidade de 94% e especificidade de 97% (GODOY et al., 2010). No entanto, os níveis das enzimas hepáticas (AST, ALT e GGT) foram significativamente maiores no grupo de indivíduos infectados pelo HCV, o que poderia estar discriminando os grupos. E assim, o modelo metabonômico poderia não estar necessariamente identificando os pacientes com infecção pelo HCV, mas sim aqueles com alterações enzimáticas (GODOY et al., 2010).

Com efeito, embora alguns estudos em metabonômica tenham avaliado pacientes com hepatite B e C crônica sugerindo possíveis vias metabólicas alteradas nestas infecções e em suas complicações, ainda não existem biomarcadores uniformes, sensíveis e específicos descritos na literatura, sendo necessário um número maior de estudos clínicos para avaliá-los (SCHOEMAN et al., 2016; YU et al., 2017; ZHENG et al., 2017).

Além disso, as estratégias ômicas vêm substituindo o conceito clássico de que as concentrações séricas das aminotransferases são apenas indicadores de ruptura da membrana do hepatócito, dando lugar a uma visão mais complexa e interligada da importância das enzimas hepáticas na regulação da função metabólica sistêmica (SOOKOIAN et al., 2015).

Portanto, observa-se a necessidade de estudos em pacientes com infecção pelo HBV ou HCV que avaliem a utilização da metabonômica como uma alternativa no diagnóstico da infecção viral e avaliação da atividade das enzimas hepáticas, buscando um melhor acompanhamento e análise do prognóstico destes pacientes na prática clínica.

Desta forma, o objetivo deste estudo foi construir modelos metabonômicos baseados em RMN de ^1H , a partir de uma mesma amostra de soro, para realizar: (1) o diagnóstico da infecção crônica pelos vírus das hepatites B e C; (2) distinguir a infecção de acordo com o tipo de vírus relacionado (HBV ou HCV); e (3) avaliar a atividade sérica das enzimas hepáticas (ALT, AST e GGT) e sua relação com as infecções pelo HBV e pelo HCV.

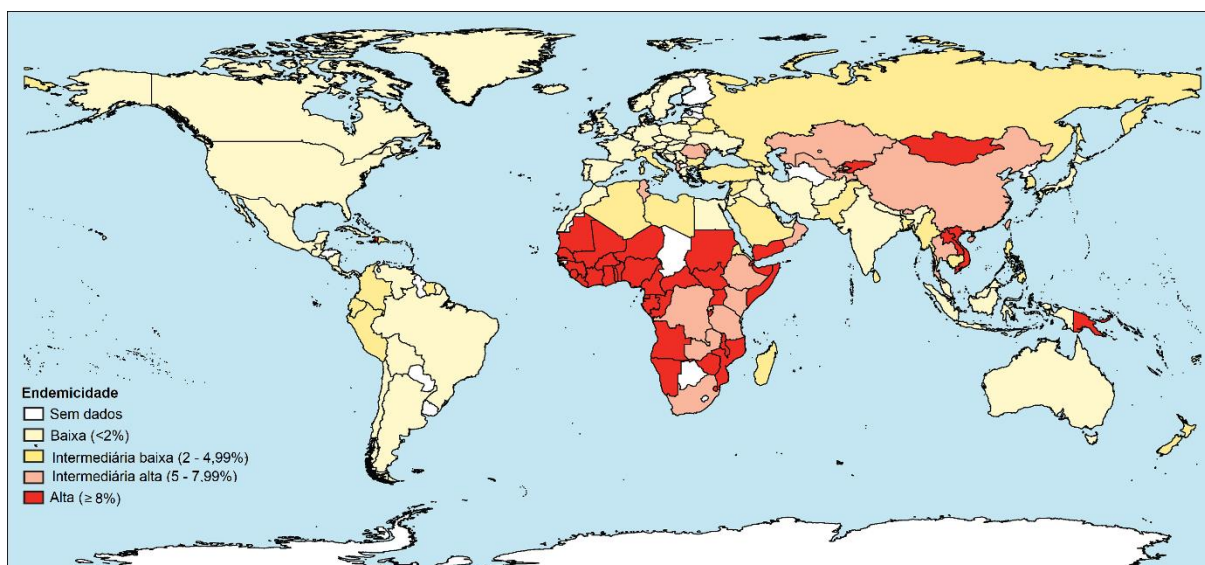
2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 INFECÇÃO CRÔNICA PELO VÍRUS DA HEPATITE B

A infecção pelo HBV é um importante problema de saúde pública e a principal causa de cirrose e HCC no mundo. Aproximadamente um terço da população mundial tem evidência sorológica de infecção presente ou passada pelo HBV e cerca de 240 milhões de pessoas estão cronicamente infectadas (EASL, 2017; WHO, 2015).

Segundo a Organização Mundial de Saúde, estima-se que entre 20 e 30% dos indivíduos que apresentam infecção crônica desenvolvem complicações e cerca de 650 mil pessoas morrem todos os anos em consequência da infecção crônica pelo HBV (WHO, 2015). No Brasil, a prevalência de positividade sorológica indicativa de exposição a essa infecção (anti-HBc), na faixa etária entre 10 a 69 anos, é de 7,4%, e a prevalência do marcador de infecção ativa (HBsAg) é de 0,37%, classificando o conjunto das capitais do Brasil como região de baixa endemicidade (PEREIRA et al., 2010), conforme a Figura 1.

Figura 1 – Distribuição da infecção crônica pelo HBV no mundo.



Fonte: SCHWEITZER et al. (2015), adaptado.

A história natural da infecção crônica pelo HBV é um processo dinâmico e pode ser dividida em cinco fases baseadas na presença do antígeno “e” da hepatite B (HBeAg), níveis de HBV-DNA, atividade da ALT e, eventualmente, a presença ou

ausência de inflamação hepática. As fases da infecção crônica pelo HBV não são necessariamente sequenciais: infecção crônica pelo HBV HBeAg positivo (anteriormente “imunotolerante”), hepatite B crônica HBeAg positivo (“imunorreativa”), infecção crônica pelo HBV HBeAg negativo (“portador inativo”), hepatite B crônica HBeAg negativo (“reativação”) e HBsAg negativo (EASL, 2017; WHO, 2015).

A fase de infecção crônica HBeAg positivo é caracterizada pela positividade do HBeAg, elevada replicação viral (HBV-DNA >200000 UI/mL), níveis de aminotransferase normais, necroinflamação hepática mínima e progressão para fibrose baixa ou ausente. A fase hepatite crônica HBeAg positivo é definida pelo HBeAg reagente, menor replicação viral em comparação à fase imunotolerante, níveis de aminotransferases altos ou flutuantes, atividade necroinflamatória hepática moderada a grave e progressão para fibrose mais rápida. Essa fase termina com a soroconversão para o anti-HBe (CROAGH; LUBEL, 2014; EASL, 2017; WHO, 2015).

A fase de infecção crônica HBeAg negativo é caracterizado por níveis muito baixos ou indetectáveis de HBV-DNA (<2000 UI/mL), normalização das aminotransferases, podendo ser acompanhado da soroconversão do HBeAg para o anti-HBe. A fase hepatite crônica HBeAg negativo pode ocorrer espontaneamente, após imunossupressão ou após anos do estado de portador inativo. É caracterizada por reativação periódica com um padrão de flutuação dos níveis de HBV-DNA, aminotransferases e risco de complicações. A fase HBsAg negativa é definida por níveis muito baixos ou indetectáveis de HBV-DNA, anti-HBc reagente, independentemente da reatividade para o anti-HBs (CROAGH; LUBEL, 2014; EASL, 2017; WHO, 2015).

2.2 DIAGNÓSTICO E MONITORAMENTO DA INFECÇÃO PELO HBV

O diagnóstico preciso e precoce da infecção pelo HBV permite o tratamento adequado da doença e tem impacto direto sobre a qualidade de vida do indivíduo, além de prevenir complicações como a cirrose e o HCC (BRASIL, 2017).

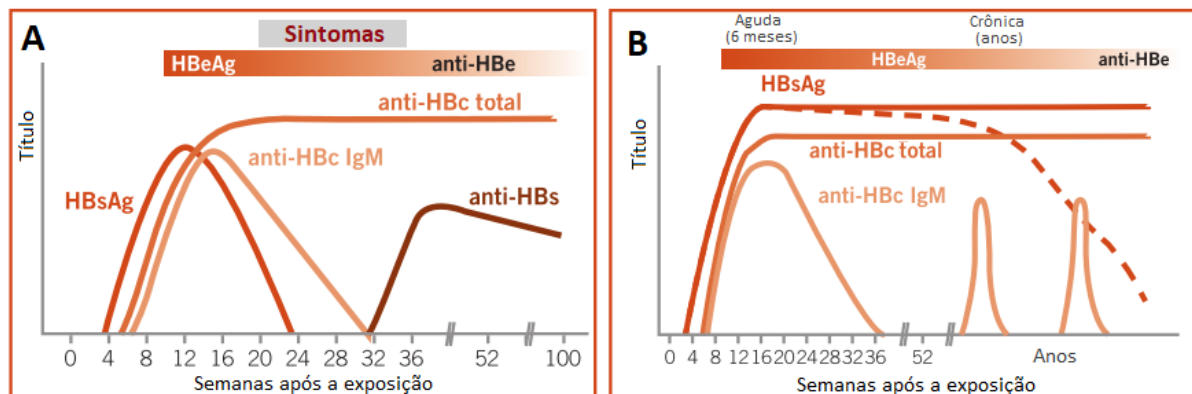
Os testes de avaliação hepática, principalmente os níveis séricos de atividade da ALT e AST, apesar de serem marcadores sensíveis de lesão do parênquima hepático, não são específicos para o diagnóstico da hepatite B. A elevação da ALT geralmente é maior que da AST e já é encontrada no período prodrômico. Níveis mais elevados de ALT, quando presentes, não significam correlação direta com a gravidade

da doença. Na fase aguda da doença, as aminotransferases podem elevar-se dez vezes acima do limite superior da normalidade (LSN) (BRASIL, 2015).

Para o diagnóstico das hepatites virais B e C devem ser utilizados métodos baseados na detecção de marcadores presentes no sangue ou fluido oral através das técnicas de imunoensaio, e/ou detecção do ácido nucleico viral (BRASIL, 2015), tanto para diagnosticar e monitorar indivíduos infectados pelo HBV, quanto para avaliar a indicação de tratamento (WHO, 2015).

Os métodos sorológicos utilizados para diagnóstico são o ensaio imunoenzimático (ELISA), os ensaios luminescentes (quimioluminescência e eletroquimioluminescência), e os testes rápidos (imunocromatográficos) (BRASIL, 2015). No diagnóstico sorológico específico, o HBsAg é o primeiro a surgir no curso da infecção (30 a 45 dias), e pode permanecer detectável por até 120 dias nos casos de hepatite aguda. Ao persistir por mais de seis meses caracteriza a infecção crônica (Figura 2). Deve-se considerar, no entanto, o período de janela diagnóstica da hepatite B, que varia entre 30 a 60 dias para os testes sorológicos disponíveis no Brasil (BRASIL, 2015).

Figura 2 – Curso sorológico típico da infecção pelo HBV (A) aguda com resolução e (B) crônica.



Fonte: WHO (2017), adaptado.

O anti-HBc IgG é o marcador que indica contato prévio com o vírus. Permanece detectável por toda a vida nos indivíduos que tiveram infecção. O anti-HBc total é utilizado na triagem para a hepatite B por determinar a presença de anticorpos tanto da classe IgM quando da classe IgG, e encontra-se presente nas fases aguda e crônica, respectivamente (BRASIL, 2015).

O HBeAg na infecção crônica indica presença de replicação viral, enquanto o anti-HBe sugere redução ou ausência de replicação viral, com exceção das cepas mutantes não produtoras de proteína “e” (BRASIL, 2015). Nestes casos, o emprego de técnicas para quantificação do DNA viral é extremamente útil, auxiliando na identificação de infectados crônicos pelo HBV HBeAg negativo e de pacientes com hepatite B crônica HBeAg negativo (MATTOS; DANTAS-CORREA, 2010).

A quantificação da carga viral (HBV-DNA) e a genotipagem do HBV por reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) são recomendadas para a pesquisa das possíveis mutações da DNA polimerase, para o acompanhamento do paciente em tratamento antiviral, facilitando a identificação precoce da resistência viral. O período de janela diagnóstica para a detecção do HBV-DNA é de 25 dias, através da técnica de qPCR, e 10 a 12 dias pela Tecnologia de Amplificação de Ácidos Nucleicos (kit NAT), disponível na Hemorrede nacional (BRASIL, 2013).

Outros exames auxiliam na avaliação da doença hepática dosagem de proteínas séricas, bilirrubinas, fosfatase alcalina, GGT, atividade de protrombina, alfa-fetoproteína e contagem de leucócitos e plaquetas (BRASIL, 2015).

Atualmente no Brasil, o tratamento da hepatite B crônica é indicado para pacientes adultos, maiores de 30 anos, com HBeAg reagente e ALT duas vezes acima do LSN, ou HBeAg não reagente, mas HBV-DNA maior que 2000 UI/mL e ALT duas vezes acima do LSN, e ainda para todos os pacientes com escore METAVIR igual ou superior a A2F2 na biópsia hepática, cirróticos, com história familiar de HCC, manifestações extra-hepáticas e coinfectados (HIV/HBV ou HBV/HCV). Métodos não invasivos de avaliação de fibrose como a elastografia hepática podem ser úteis para identificar o estágio de fibrose avançada (BRASIL, 2017a).

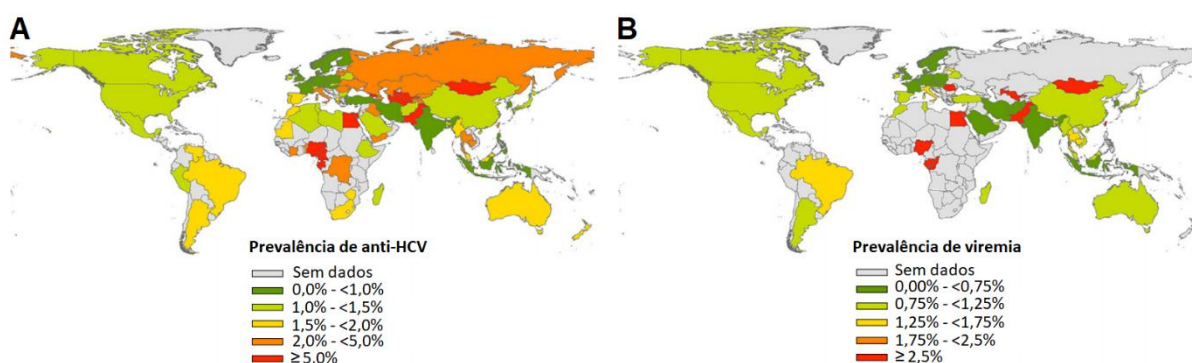
2.3 INFECÇÃO CRÔNICA PELO VÍRUS DA HEPATITE C

A infecção pelo HCV é uma das principais causas de doença crônica hepática no mundo. Estima-se que 115 milhões de indivíduos apresentem positividade sorológica indicativa de exposição a essa infecção (anti-HCV), e que cerca de 80 milhões estejam infectadas cronicamente e sob risco de desenvolver complicações da doença como cirrose e HCC (MOHD HANAFIAH et al., 2013; WHO, 2016).

Segundo a Organização Mundial de Saúde, aproximadamente 350 mil pessoas morrem por ano por doenças hepáticas associadas ao HCV. No Brasil, a prevalência

de anti-HCV, na faixa etária entre 10 e 69 anos, é de 1,38%, o que corresponde a uma endemicidade baixa para este agravo (PEREIRA et al., 2010). De acordo com Gower et al., a prevalência de anti-HCV, apenas em adultos, encontra-se entre 1,5 e 2% (Figura 3A), com prevalência de viremia entre 1,25 e 1,75% (Figura 3B) (GOWER et al., 2014).

Figura 3 – Distribuição da infecção pelo HCV no mundo.



Fonte: GOWER et al. (2014), adaptado.

Legenda: (A) Prevalência observada de anti-HCV em adultos; (B) Prevalência observada de viremia.

A história natural da infecção pelo HCV é difícil de ser avaliada devido ao início silencioso e à progressão lenta da doença (SEEFF, 2009). A hepatite C aguda refere-se aos 6 meses iniciais da infecção, e de modo geral, apresenta evolução subclínica com cerca de 80% dos casos assintomáticos e anictéricos, dificultando o diagnóstico (HAJARIZADEH; GREBELY; DORE, 2013; WESTBROOK; DUSHEIKO, 2014).

A fase aguda caracteriza-se pela elevação da atividade das aminotransferases, principalmente ALT, entre 2 e 8 semanas após a exposição, indicando necrose do hepatócito. Frequentemente, a ALT pode se elevar cerca de 10 vezes acima do LSN, com padrão flutuante (BRASIL, 2015). Em cerca de 15-45% dos indivíduos infectados ocorre o clareamento viral espontâneo após infecção aguda. No entanto, 55-85% das pessoas desenvolvem infecção crônica, caracterizada pela persistência do HCV-RNA no sangue após 6 meses e confirmação diagnóstica com HCV-RNA detectável (BRASIL, 2017b; WHO, 2016). Em média, 20% dos paciente podem evoluir para cirrose em 20-30 anos de infecção pelo HCV e 1 a 5% dos pacientes desenvolvem HCC (WESTBROOK; DUSHEIKO, 2014).

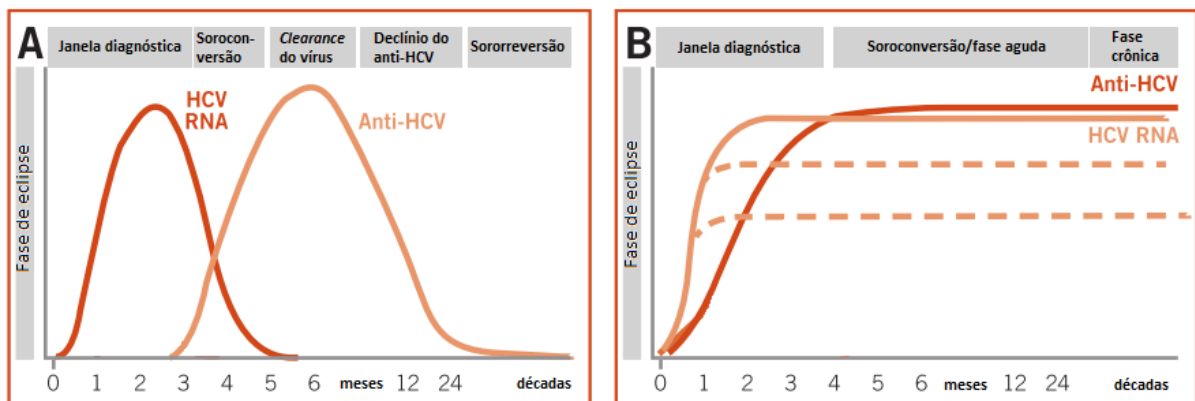
2.4 DIAGNÓSTICO E MONITORAMENTO DA INFECÇÃO PELO HCV

A hepatite C é geralmente diagnosticada na fase crônica devido a inespecificidade dos sintomas, podendo evoluir durante décadas sem diagnóstico. Devido à evolução subclínica da infecção aguda pelo HCV, esta geralmente só é diagnosticada quando se torna crônica. O diagnóstico da infecção pelo HCV evoluiu da sorodetecção de anticorpos não específicos e de baixa avidéz para a detecção do ácido nucleico viral utilizando a técnica de PCR (IRSHAD; MANKOTIA; IRSHAD, 2013).

Assim como para o HBV, o diagnóstico da infecção pelo HCV é realizado por meio de imunoensaio, ensaios luminescentes, testes rápidos para triagem, testes moleculares (detecção de ácidos nucleicos e genotipagem), e de exames complementares que auxiliam na avaliação da doença hepática (aminotransferases, GGT, bilirrubinas, proteínas séricas, fosfatase alcalina, atividade de protrombina, alfafetoproteína, contagem de leucócitos e plaquetas) (BRASIL, 2015).

Após a exposição ao vírus, o HCV-RNA poderá ser identificado no soro cerca de 2 semanas após a exposição, e antes da presença do marcador sorológico anti-HCV (Figura 4). O período de janela diagnóstica para a detecção do HCV-RNA é de 1 a 2 semanas através da técnica de qPCR e 11 dias pela tecnologia de amplificação de ácidos nucleicos (kit NAT), disponível na Hemorrede nacional (BRASIL, 2013).

Figura 4 – Curso de marcadores virológicos e imunológicos da infecção pelo HCV (A) autorresolutiva e (B) crônica.



Fonte: WHO (2017), adaptado.

Os testes rápidos por imunocromatografia são utilizados na determinação qualitativa do anticorpo contra antígenos sintéticos e recombinantes do HCV, imobilizados na membrana em amostra mínima de sangue (BRASIL, 2015). Os imunoensaios são baseados na detecção do anti-HCV por meio das técnicas de ELISA e quimioluminescência. Os kits anti-HCV sofreram alterações na constituição dos antígenos recombinantes e até o momento quatro diferentes gerações de ensaios foram utilizadas (KESLI, 2012).

Os kits de primeira geração detectavam anticorpos contra proteínas não estruturais (NS4) com antígeno recombinante c100-3. Com o desenvolvimento dos ensaios de segunda geração foram incluídos antígenos da região do core (c22-3), região NS3 (c33c) e uma parte do c100-3 da região NS4. Nos ensaios de terceira geração, além da inclusão de um antígeno adicional da região NS5, os antígenos do core e NS3 foram reconfigurados. No entanto, todos esses ensaios apresentavam altas taxas de resultados falso positivos e falta de sensibilidade para detectar anticorpos durante o período de janela diagnóstica e não eram capazes de distinguir entre infecção aguda e crônica (KESLI, 2012).

Recentemente, os ensaios de quarta geração incorporaram proteínas não estruturais adicionais e permitem a detecção de diferentes antígenos e mais de cinco anticorpos para garantir melhor especificidade e sensibilidade (IRSHAD; MANKOTIA; IRSHAD, 2013). Assim, o anti-HCV detectável por estes ensaios é utilizado como marcador de triagem e indicador de contato prévio com o vírus por ser detectável em 4 a 10 semanas após a infecção (BRASIL, 2015).

O resultado reagente no teste sorológico deverá ser confirmado por testes moleculares para detecção do HCV-RNA, os quais são utilizados também no monitoramento da infecção (BRASIL, 2015; WHO, 2017). A quantificação do HCV-RNA basal com ponto de corte de 400000 UI/mL tem sido proposta como o ponto de corte adequado para discriminar alta e baixa carga viral (LEVIN, 2007; WHO, 2016).

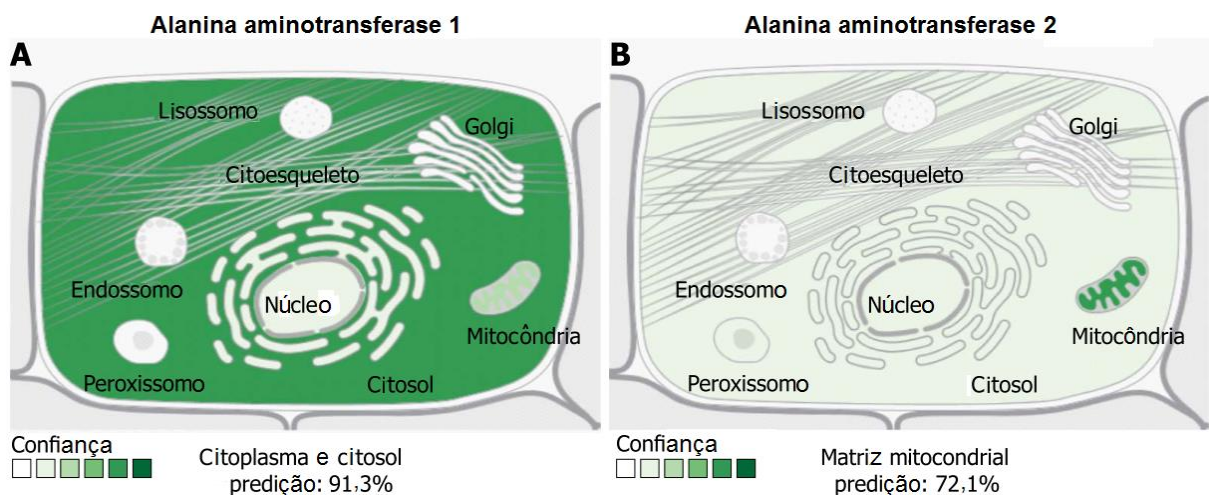
Atualmente, o tratamento é indicado para pacientes que apresentem fibrose hepática significativa (METAVIR $\geq$ F2), ou coinfectados com HIV, ou pacientes que apresentem cirrose ou insuficiência hepática, insuficiência renal crônica ou manifestações extra-hepáticas. Apesar da biópsia ser considerada o exame padrão-ouro para a avaliação da fibrose hepática, os escores APRI e FIB4 e a elastografia hepática podem ser utilizadas como alternativas para a identificação de fibrose significativa e avançada (BRASIL, 2017b).

2.5 IMPORTÂNCIA DAS ENZIMAS HEPÁTICAS NO MONITORAMENTO DAS HEPATITES B E C

A análise da atividade das enzimas hepáticas ALT, AST e GGT é frequentemente utilizada na avaliação e monitoramento de pacientes com doença hepática. Níveis alterados de atividade destas enzimas podem refletir lesão nos hepatócitos, esteatose e/ou estresse oxidativo (SOOKOIAN et al., 2015; VAN BEEK et al., 2013), mesmo em pacientes assintomáticos (VERSLYPE, 2004).

A ALT é considerada um marcador específico de lesão hepatocelular (HALL; CASH, 2012) e desempenha um papel importante no metabolismo intermediário da glicose e dos aminoácidos, catalisando de forma reversível a transferência de um grupo amino entre a alanina e o α -cetoglutarato para formar piruvato e glutamato (RAFTER et al., 2012). No entanto, existem duas isoformas da ALT humana com papel divergente no contexto da patogênese aguda ou crônica da doença hepática (Figura 5), a ALT1, localizada apenas no citoplasma e no retículo endoplasmático do hepatócito, e a ALT2 concentrada principalmente na matriz mitocondrial (GLINGHAMMAR et al., 2009).

Figura 5 – Representação esquemática das diferentes localizações das proteínas ALT1 (A) e ALT2 (B) a nível celular.



Fonte: SOOKOIAN et al. (2015), adaptado.

Ainda que os testes bioquímicos de rotina destinados a avaliar a atividade ALT não sejam capazes de identificar a fonte celular e discriminar as isoformas, é plausível

sugerir que a ALT1 e a ALT2 possam refletir rompimento da membrana dos hepatócitos e disfunção mitocondrial, respectivamente, com predomínio da atividade em circulação pela ALT1 (RAFTER et al., 2012).

Assim como a ALT, a AST apresenta duas isoformas, a AST citoplasmática (ASTc) e a mitocondrial (ASTm), ambas envolvidas na síntese de glicose hepática durante o desenvolvimento e na gliceroneogênese dos adipócitos. ASTm é uma importante reguladora dos níveis de glutamato, uma vez que está envolvida na biossíntese deste aminoácido a partir do aspartato ou da cisteína (SOOKOIAN et al., 2015). Nos hepatócitos, a ASTm é a isoenzima mais prevalente com aproximadamente 80% da atividade total da AST, enquanto a maior parte da atividade AST circulante, em pessoas normais, é derivada da isoenzima citosólica (THAPA; WALIA, 2007).

Embora não seja causa-específica, a GGT é uma glicoproteína ligadora de membrana que catalisa a transferência do grupo gama glutamil para outros peptídeos, aminoácidos e água (THAPA; WALIA, 2007). É encontrada no microssoma dos hepatócitos e nas células epiteliais biliares, sendo considerada um marcador sensível de doença hepatobiliar (PRATT; KAPLAN, 2000). Há uma variedade de isoformas da GGT (TARGHER, 2010), e quatro frações (b-, m-, s-, f-GGT) foram descritas no plasma com especificidade diferencial no diagnóstico de doenças hepáticas (FORNACIARI et al., 2014).

Assim, as aminotransferases têm sido consideradas biomarcadores substitutos de "funcionamento metabólico do fígado" além do conceito clássico de lesão celular hepática, uma vez que a atividade enzimática pode realmente refletir aspectos chave da fisiologia e fisiopatologia da função hepática, o que sugere que a regulação das aminotransferases é uma característica complexa e altamente regulada (SOOKOIAN et al., 2015).

Além disso, estas enzimas vêm sendo avaliadas como preditores de doença metabólica, diabetes mellitus tipo II e doença cardiovascular, sugerindo a utilização do aumento dos níveis destas enzimas e da relação AST/ALT como biomarcadores para doenças metabólicas e cardiovasculares (GOESSLING; MASSARO, 2008; TARGHER, 2010; ZOPPINI et al., 2016)

Variações dos níveis destas enzimas, mesmo dentro do limite superior da normalidade, podem indicar doença hepática, sendo importante investigar as fontes

de variação que expliquem as diferenças individuais nos níveis enzimáticos (GIANNINI; TESTA; SAVARINO, 2005).

Assim, é prática comum definir como nível alterado um valor que exceda o LSN (VERSLYPE, 2004) e, conseqüentemente, até 2,5% dos indivíduos normais apresentam níveis de aminotransferases "alterados" (GIANNINI; TESTA; SAVARINO, 2005). Além disso, pelo menos 16% dos pacientes com infecção crônica pelo HCV apresentam graus variados de dano histológico, apesar de apresentar níveis de aminotransferase persistentemente normais (GHOLSON et al., 1997). Essa aparente discrepância pode ser explicada primeiro pelo fato de que na população saudável, que foi recrutada para estabelecer o intervalo normal, poderia ter incluído um pequeno subconjunto de pacientes com doença hepática subclínica deixando o intervalo de normalidade acima do real (GIANNINI; TESTA; SAVARINO, 2005), e em segundo lugar, devido à variação dos valores de referência dos testes utilizados atualmente entre os laboratórios (PRATT; KAPLAN, 2000).

A magnitude da alteração da atividade das aminotransferases pode ser classificada, comparando-se com o LSN, como "leve" (<5 vezes), "moderada" (5-10 vezes) ou "alta" (>10 vezes). Esta classificação é arbitrária, uma vez que não existe uma definição uniforme e várias revisões do assunto utilizam pontos de corte diferentes (GIANNINI; TESTA; SAVARINO, 2005; GREEN; FLAMM, 2002).

Em pacientes com hepatite crônica B ou C, o monitoramento dos níveis de atividade das enzimas hepáticas é importante na caracterização do estágio da doença hepática, decisão de terapia antiviral e necessidade de vigilância, uma vez que uma razão AST/ALT elevada é preditiva de complicações a longo prazo incluindo fibrose e cirrose. Isso pode ser explicado pelo fato de que a lesão com dano celular leve tende a liberar maiores concentrações de ALT, a qual encontra-se predominantemente no citoplasma, enquanto no dano celular severo e na cirrose, ocorre também disfunção mitocondrial, liberando além da ALT, a AST na circulação (BOTROS; SIKARIS, 2013; GLINGHAMMAR et al., 2009; SOOKOIAN, 2015).

De fato, a infecção crônica pelo HCV é caracterizada por um padrão de níveis de atividade da ALT e AST flutuando em torno do LSN, e GGT acima do LSN em cerca de 30% destes pacientes (GIANNINI; TESTA; SAVARINO, 2005). Em pacientes com hepatite B crônica, os níveis séricos elevados de ALT e de HBV-DNA são fortemente preditivos do risco de complicações hepáticas (ILOEJE et al., 2006) e uma ALT basal elevada de 2-5 vezes os limites superiores de normalidade e alta atividade

necroinflamatória na biópsia estão associadas com maior probabilidade de alcançar desfechos intermediários durante o tratamento (TERRAULT et al., 2015).

Além disso, os ensaios clínicos avaliando pacientes infectados pelo HBV utilizam os LSN da ALT como critério para indicação de tratamento, e geralmente requerem uma elevação da ALT de 1,3-2,0 vezes o LSN para inclusão nos estudos (TERRAULT et al., 2015). No entanto, ainda que o aumento da atividade necroinflamatória e níveis mais elevados de ALT estejam associados à necrose e regeneração, alguns estudos mostram que a necroinflamação, com consequente indução da fibrose, podem não induzir o aumento da ALT em muitos pacientes com infecção crônica pelo HBV ou HCV, que não seriam elegíveis para tratamento antiviral (DOR-MOHAMMADI et al., 2005; WONG et al., 2017; ZHENG et al., 2017). Assim, a interpretação acadêmica de causa e "gravidade" da lesão aguda com base na magnitude da elevação da atividade enzimática, às vezes pode ser enganosa, devido a possibilidade de uma zona cinza onde uma série de causas se sobrepõem (GIANNINI; TESTA; SAVARINO, 2005).

2.6 METABONÔMICA

A metabonômica é definida como a medida quantitativa da resposta metabólica dinâmica e multiparamétrica dos sistemas vivos à estímulos fisiopatológicos ou modificações genéticas, que surgiu da aplicação da espectroscopia de RMN de ^1H para analisar a composição metabólica dos componentes de fluidos biológicos, células e tecidos (NICHOLSON; LINDON; HOLMES, 1999).

Apesar dos termos metabolômica e metabonômica serem frequentemente utilizados como sinônimos, há uma distinção em relação à técnica utilizada e à quantificação de metabólitos que permite diferenciá-los. A estratégia metabolômica busca uma descrição analítica das amostras biológicas através da identificação e quantificação absoluta dos metabólitos, que estejam associados à discriminação dos grupos com status bioquímico diferentes, sendo necessária uma técnica de separação de misturas, como a cromatografia gasosa ou líquida, associada a um sistema de detecção de alta sensibilidade, como a espectrometria de massas (MS) (DUNN; ELLIS, 2005; NICHOLSON; LINDON, 2008). Enquanto na metabonômica, o objetivo é a análise do perfil de metabólitos endógenos e associação ao status bioquímico da amostra, sem uma separação prévia dos componentes da mistura, e com a

identificação e quantificação dos metabólitos realizada apenas de forma relativa, frequentemente através do uso da espectroscopia de RMN (DUNN; ELLIS, 2005; ROSS et al., 2007).

A metabolômica é caracterizada ainda como uma nova área do período "pós-genômico", a qual constitui o centro dos sistemas biológicos em conjunto com a genômica, a transcriptômica e a proteômica, sendo considerada um dos campos de pesquisa em ciências da vida mais ativos do mundo (YU et al., 2017).

As espectrometrias de RMN e de massa, em função de fornecer dados acerca das estruturas dos compostos, são meios poderosos de produção de dados metabólicos multivariados (NICHOLSON et al., 2002). A RMN, por ser uma técnica não destrutiva, aplicável à biomateriais intactos e que proporciona informações relacionadas à determinação das estruturas moleculares sem a necessidade de tratamento químico ou físico antes das análises, é muitas vezes preferida em relação às outras ferramentas analíticas (KEUN, 2006; NICHOLSON et al., 2002).

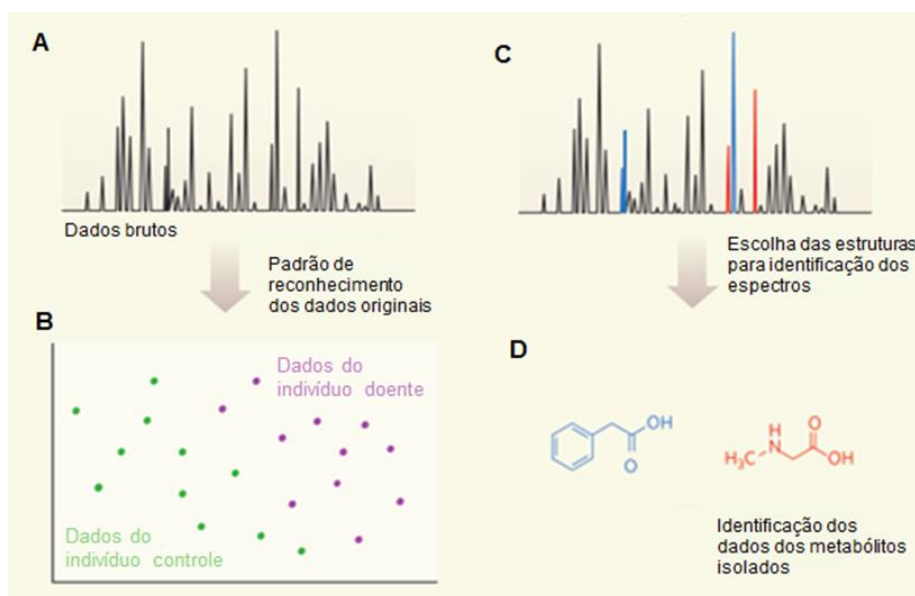
A presença abundante do hidrogênio nas biomoléculas, assim como a distribuição favorável do isótopo e a sua sensibilidade magnética, faz da RMN de ^1H uma escolha preferencial para a geração dos espectros. No entanto, outros isótopos como o ^{13}C , ^{31}P e ^{15}N também podem ser utilizados (KEUN, 2006).

Na análise de RMN de ^1H de uma amostra típica de fluido biológico, todas as espécies que contém hidrogênio, incluindo quase todos os metabólitos, originam sinal no espectro, desde que estejam presentes em concentrações acima do limite de detecção. O espectro de RMN de um fluido biológico é, portanto, a sobreposição dos sinais de todos os metabólitos presentes neste fluido (NICHOLSON; LINDON, 2008). Por outro lado, considerando que a água é o principal constituinte dos fluidos biológicos, o espectro é dominado pelo mesmo, exigindo o uso de técnicas que possam minimizar a intensidade desse sinal (LENZ; WILSON, 2007).

A partir do princípio que a metabonômica analisa os metabólitos nos fluidos biológicos para determinar a resposta metabólica de um organismo a um estímulo fisiológico, esta análise é iniciada com a obtenção dos espectros de RMN do fluido biológico, o qual contém sinais de centenas de metabólitos (Figura 6A). Após esta etapa, são utilizadas técnicas de reconhecimento de padrões e, utilizando ferramentas supervisionadas e não supervisionadas para analisar como os espectros de indivíduos com a doença diferem dos indivíduos controles. Através de uma interpretação visual dos conjuntos de dados em um gráfico de dimensões 2D e/ou 3D é possível observar

a separação entre os diferentes grupos (Figura 6B). Em seguida, os deslocamentos químicos (variáveis) mais importantes para a discriminação são identificados (Figura 6C), o que permite a atribuição dos sinais e determinação da estrutura dos metabólitos mais importantes na diferenciação entre os grupos (Figura 6D), e por fim, uma explicação bioquímica é proposta para a discriminação observada (GROMSKI et al., 2015; NICHOLSON; LINDON, 2008).

Figura 6 – O processo de análise metabonômica.



Fonte: NICHOLSON; LINDON (2008), adaptado.

Legenda: (A) aquisição e processamento do espectro; (B) técnicas de reconhecimento de padrões para separação dos grupos; (C) identificação dos sinais individuais; (D) determinação da estrutura dos metabólitos.

A análise dos materiais biológicos através da espectroscopia de RMN de ^1H é capaz de gerar um perfil de espectros dos metabólitos de baixo peso molecular que reflete o estado metabólico do organismo. Cada fluido biológico tem uma composição bioquímica característica e única que se altera em resposta a um estímulo fisiológico ou patológico, originando assim, uma "impressão digital" metabólica específica do tipo ou local de agressão (LINDON et al., 2004)

Para obtenção dos dados de "impressão digital" metabólica, geralmente são utilizados fluidos biológicos ou extratos de tecido. Os fluídos biológicos são relativamente mais fáceis de se obter, principalmente urina e sangue. Além da urina e do sangue, diversos fluidos têm sido estudados, incluindo o fluido seminal, fluido amniótico, fluido cefalorraquidiano, fluido sinovial, saliva e outros fluidos digestivos,

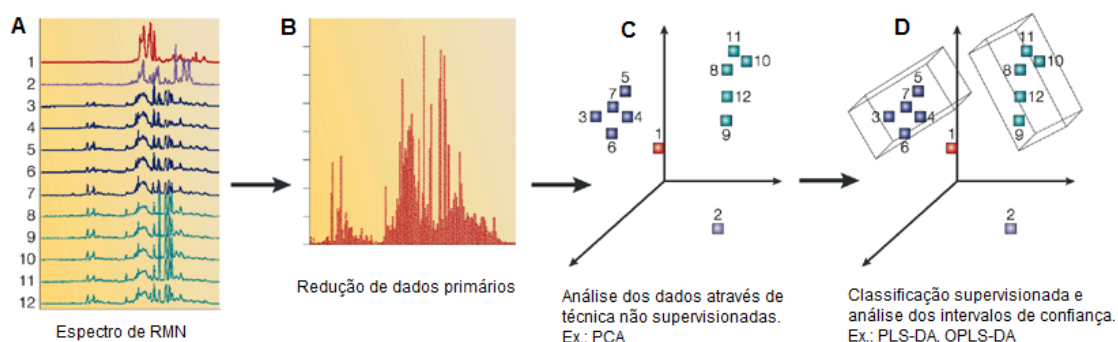
aspirados pulmonares e materiais como sobrenadante de cultura de células, extrato de tecidos, e amostras de biópsia de tecido intactas (BOLLARD et al., 2005; LINDON et al., 2004).

Nos fluidos corporais, os metabólitos estão em equilíbrio dinâmico com aqueles que estão dentro das células e tecidos. Desta forma, os processos celulares anormais nos tecidos do organismo resultam em uma alteração tóxica ou metabólica que será refletida nos fluidos, que terão a sua composição alterada (NICHOLSON; LINDON; HOLMES, 1999).

Assim, a forma mais efetiva de se obter as informações, necessárias para a construção de um modelo metabonômico, é a associação da espectroscopia de RMN (Figura 7A) a métodos estatísticos de análise multivariada. Os métodos de reconhecimento de padrões podem reduzir a dimensão de conjuntos de dados complexos por meio de análises bidimensionais ou tridimensionais, facilitando assim a visualização de padrões inerentes nos dados (Figura 7B).

A análise estatística dos espectros é realizada através de técnicas não supervisionadas (Figura 7C), como a Análise de Componentes Principais (PCA), e de técnicas supervisionadas (Figura 7D), como a Análise de Discriminantes Lineares (LDA), a Análise Discriminantes por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) (NICHOLSON et al., 2002), e a Análise de Discriminante Ortogonal por Mínimos Quadrados Parciais (OPLS-DA) (BYLESJO et al., 2006). Estas análises permitem a identificação de mudanças no perfil de metabólitos endógenos dos fluidos biológicos, quando expostos a agentes químicos, hábitos alimentares ou estados patológicos (NICHOLSON et al., 2002).

Figura 7 – Estratégia para a análise metabômica multivariada.



Fonte: NICHOLSON et al. (2002), adaptado.

Legenda: (A) aquisição e processamento do espectro; (B) redução primária de dados; (C) utilização de métodos não supervisionados; (D) utilização de métodos supervisionados e construção de um modelo para predição de dados independentes.

Métodos como a PCA são denominados técnicas não supervisionadas à medida que não é necessário conhecimento a priori da classe das amostras. A PCA é frequentemente a primeira etapa na análise de dados, pois busca encontrar padrões naturais de agrupamento entre as amostras, através de uma análise exploratória. Com a obtenção de novas variáveis, as componentes principais (PCs), é possível reduzir a dimensionalidade do conjunto de dados preservando o máximo de informações relevantes do conjunto de dados original (GROMSKI et al., 2015)..

Enquanto os métodos supervisionados como a LDA, a PLS-DA e a OPLS-DA usam informações de classe para maximizar a separação entre os grupos, sendo capazes de prever a que classe uma amostra desconhecida pertence (NICHOLSON et al., 2002). Na PLS-DA busca-se a relação entre as variáveis dependentes (Y) e as variáveis independentes (X), e a obtenção de variáveis latentes que explicam a máxima correlação entre os dados e a informação de classes das amostras (BALLABIO; CONSONNI, 2013).

Para uma melhor interpretação dos dados, é possível utilizar um filtro de correção de sinal ortogonal no modelo PLS, permitindo assim, que OPLS-DA separe a variância preditiva da não preditiva (ortogonal) (WORLEY; POWERS, 2015).

Além disso, essas técnicas fornecem vários parâmetros estatísticos, como os *loading weights*, ou pesos, que indicam a contribuição de cada variável, os escores denominados de importância da variável para a projeção (VIP) e os coeficientes de determinação (R^2) e de predição dos modelos (Q^2), que podem ser usados para identificar as variáveis mais importantes para o modelo (GROMSKI et al., 2015).

2.7 A UTILIZAÇÃO DA METABONÔMICA NA IDENTIFICAÇÃO DE DOENÇAS INFECCIOSAS

Vários estudos buscaram estabelecer um perfil metabólico como uma abordagem valiosa na caracterização da doença e na identificação de biomarcadores do estado fisiológico e patológico dos indivíduos (BARTON et al., 2008). Desta forma, a metabonômica tem sido empregada com sucesso na identificação e no estudo de várias doenças infecciosas como hepatite B (HOU; DUAN, 2016), hepatite C (GODOY et al., 2010), esquistossomose mansônica (BALOG et al., 2011; WANG et al., 2004), coinfeção por esquistossomose e hepatite B ou C (GOUVEIA et al., 2017), infecção pelo HIV (HEWER et al., 2006; SITOLE; WILLIAMS; MEYER, 2012) e complicações das hepatites virais, como fibrose hepática (BATISTA et al., 2018; EMBADE et al., 2016; SANDS et al., 2015), e HCC (LADEP et al., 2014).

Esses estudos geralmente envolvem a utilização de alguma forma de espectrometria de alta resolução, geralmente a RMN ou a MS, em conjunto com ferramentas de análise multivariada (BARTON et al., 2008).

Em relação à infecção pelo HBV e pelo HCV, existem alguns estudos sobre a utilização da metabonômica na avaliação da hepatite B e C crônica, e suas complicações, como a fibrose hepática e HCC, buscando encontrar novos biomarcadores sensíveis e específicos, principalmente envolvendo o metabolismo energético e de proteínas e lipídios, conforme a tabela 1 (EMBADE et al., 2016; SANDS et al., 2015; YU et al., 2017; ZHENG et al., 2017). No entanto, ainda não existem biomarcadores uniformes descritos na literatura, sendo necessário um número maior de estudos clínicos para avaliar esses novos marcadores (YU et al., 2017).

Tabela 1 – Estudos relevantes em metabonômica e metabolômica avaliando pacientes com infecção pelo HBV e pelo HCV e principais metabólitos identificados no soro

Referência	Método	Infecção	Metabólitos
Zheng et al. (2017)	Espectroscopia de RMN de ^1H	CHB <i>versus</i> controle	Altos níveis de histidina sérica (δ 7,04) e de citrato (δ 2,55) no grupo de infectados pelo HBV.
		Progressão de CHB para cirrose	Altos níveis de acetato, formato (δ 8,45), piruvato (δ 2,37) e glutamina (δ 2,46) em cirróticos.
		CHB e cirrose <i>versus</i> controle	Altos níveis de fenilalanina (δ 7,32), lipídios insaturados e níveis reduzidos de n-acetilglicoproteína (δ 2,04) e acetona (δ 2,2) em pacientes com CHB e cirróticos.
Hou et al. (2015)	GC-TOF-MS	CHB <i>versus</i> controle	Altos níveis de ácido cítrico, ácido aconítico, glutamina, N,N-dimetilglicina, e ácido malônico em pacientes com CHB.
Xue et al. (2009)	GC-MS	CHB <i>versus</i> cirrose	Ácido acético, sorbitol, ácido D-lático, ácido hexanoico, 1-naftilamina, ácido butanoico, ácido fosfórico, D-glucitol, e glicose discriminaram os grupos.
Sands et al. (2015)	Espectroscopia de RMN de ^1H	CHC com fibrose significativa <i>versus</i> controles saudáveis	Níveis aumentados de fenilalanina (δ 7,32) e tirosina (δ 6,87) e níveis reduzidos de alanina (δ 1,48), LDL (δ 0,82) em pacientes com CHC.
		CHC com fibrose avançada <i>versus</i> controles saudáveis	Altos níveis dos aminoácidos aromáticos tirosina (δ 6,87) e fenilalanina (δ 7,32).
Embade et al. (2016)	Espectroscopia de RMN de ^1H	CHC sem fibrose <i>versus</i> cirróticos	Níveis reduzidos de colina (δ 3,22), acetoacetato (δ 2,30), LDL1 (δ 0,84), glutamina (δ 2,46)/glutamato (δ 2,37), carboidratos (δ 3,4-4,0) e lipídios (δ 3,01, 1,28) em cirróticos, Altos níveis de creatinina (δ 3,05) e creatina (δ 3,06) no grupo controle.
		Progressão de CHC para cirrose	Altos níveis de glicose (δ 3,5), ácido cítrico (δ 2,5-2,7) e fenilalanina (δ 7,32) em cirróticos.

Fonte: A autora.

Legenda: CHB: hepatite B crônica; CHC: hepatite C crônica; GC-MS: Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas; GC-TOF-MS: Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas com analisador por tempo de voo; RMN de ^1H : Ressonância magnética nuclear de hidrogênio.

Em estudo prévio do nosso grupo de pesquisa, Leite buscou identificar pacientes com infecção pelo HBV e HCV com base no padrão espectral de RMN de ^1H de amostras de urina e obtiveram um modelo metabonômico com sensibilidade de 78,57% e especificidade de 84,61% na identificação de pacientes com HBV, e sensibilidade de 88,23% e especificidade de 83,33% para paciente com HCV. O

modelo foi capaz de classificar corretamente 83,87% dos dados de pacientes com HBV e HCV, no entanto sem a análise de um grupo controle (LEITE, 2014).

Em outro estudo recente publicado pelo nosso grupo, foi possível diferenciar pacientes coinfectados pelo HBV ou HCV e fibrose periportal por esquistossomose mansônica de pacientes monoinfectados pelo HBV ou HCV. O modelo construído a partir da PLS-DA mostrou acurácia, valores de R^2 e Q^2 iguais a 100%, 98,1% e 97,5%, respectivamente. Observou-se ainda que os níveis séricos de lactato foram maiores no grupo de coinfectados, enquanto os sinais atribuídos ao HDL foram mais intensos no grupo de monoinfectados, mostrando potencial como ferramenta diagnóstica em áreas endêmicas de *S. mansoni* (GOUVEIA et al., 2017).

A metabonômica baseada em RMN de ^1H também foi utilizada por Hewer et al. na diferenciação de amostras de soro de pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana 1 (HIV-1) submetidos e não submetidos a tratamento antirretroviral e de pacientes com sorologia negativa para o HIV-1. Através das análises, foi possível classificar corretamente 95% dos pacientes e discriminar os casos infectados pelo HIV que não estavam sob terapia antirretroviral (HEWER et al., 2006).

Yue et al., avaliaram anormalidades induzidas no metabolismo dos ácidos nucleicos pela proteína X do vírus da hepatite B (HBx) através da metabonômica baseada em RMN de ^1H . Os autores identificaram que o HBx induz inicialmente dano do DNA e, em seguida, interrompe o metabolismo dos ácidos nucleicos, que por sua vez bloqueia o reparo do DNA e induz a ocorrência de HCC (YUE et al., 2016).

Para a avaliação de complicações da hepatite C crônica, como a fibrose hepática, em outro estudo do grupo utilizando a RMN de ^1H e os formalismos LDA e PLS-DA, foram construídos modelos metabonômicos capazes de prever fibrose significativa, avançada e cirrose em pacientes com hepatite C. Foram observados valores de sensibilidade e especificidade acima de 95%, incluindo a zona cinza do APRI e FIB-4, mostrando-se promissora como marcador não invasivo de fibrose hepática nesses pacientes (BATISTA et al., 2018).

Ainda que a utilização da metabonômica na avaliação da atividade das enzimas hepáticas não tenha sido descrita na literatura, nos estudos que avaliaram as complicações decorrentes da infecção crônica pelo HBV e pelo HCV, observou-se que os níveis de atividade das enzimas hepáticas mostraram-se maiores nos pacientes

com fibrose hepática e HCC, quando comparados ao grupo sem fibrose, ou a indivíduos saudáveis.

Sands et al., utilizando a RMN de ^1H em amostras de soro de pacientes com hepatite C crônica e de controles saudáveis, construíram modelos metabonômicos por OPLS-DA, utilizando classificação de fibrose por METAVIR e índice ELF como padrão de referência, e demonstraram que foi possível discriminar pacientes sem fibrose daqueles com fibrose moderada e daqueles com fibrose avançada. Pacientes com fibrose significativa e avançada apresentaram maiores de níveis de atividade das enzimas ALT e AST, maiores níveis de citrato, tirosina e fenilalanina e metionina, e menores níveis de creatina, LDL, fosfatidilcolina e N-acetil- α 1-ácido-glicoproteína (SANDS et al., 2015).

Embade et al., foram capazes de distinguir pacientes com e sem fibrose hepática induzida pelo HCV, através da espectroscopia de RMN de ^1H . Demonstraram que pacientes cirróticos apresentaram maiores de níveis de atividade das enzimas ALT, AST e GGT, e identificaram a colina, o acetoacetato e as lipoproteínas de baixa densidade como biomarcadores discriminantes informativos para predizer cirrose nestes pacientes, o que representa uma potencial aplicação diagnóstica para a espectroscopia de RMN (EMBADE et al., 2016).

Em relação ao carcinoma hepatocelular, Ladep et al. utilizaram a RMN de ^1H em amostras de urina de indivíduos com HCC decorrentes da infecção pelo HBV, no oeste da África, para determinar o perfil de metabólitos desses pacientes. As análises permitiram diferenciar indivíduos com HCC de indivíduos com cirrose relacionada ao HBV (sensibilidade de 84%, especificidade de 64%), com doença hepática crônica não cirrótica (sensibilidade de 84% e especificidade de 96%) e de controles saudáveis (sensibilidade de 87% e especificidade de 75%). Observou-se ainda maiores de níveis de atividade da enzima ALT em pacientes com HCC, e que as mudanças associadas aos metabólitos dimetilglicina, 1-metilnicotinamida, metionina, acetilcarnitina, 2-oxoglutarato, colina e creatina, se mostraram mais úteis no diagnóstico do HCC quando comparadas a dosagem da alfa feto proteína no soro (LADEP et al., 2014).

Em outro estudo publicado pelo nosso grupo, também utilizando a metabonômica baseada em RMN de ^1H para diagnóstico da infecção pelo vírus da hepatite C em amostras de urina, foi possível desenvolver um modelo capaz de diferenciar pacientes infectados pelo HCV de indivíduos não infectados (imunes para hepatite B) com sensibilidade de 94% e especificidade de 97% ($p < 0,0001$) (GODOY

et al., 2010). Observou-se neste estudo, no entanto, que os níveis das enzimas hepáticas (AST, ALT e GGT) foram significativamente maiores no grupo de indivíduos infectados pelo HCV, visto que os indivíduos deste grupo estavam infectados por um vírus hepatotrópico, o que poderia estar discriminando um grupo do outro. E desta forma, o modelo metabonômico poderia não estar necessariamente identificando os pacientes com infecção pelo HCV, mas sim aqueles com alterações enzimáticas.

3 DEFINIÇÃO DOS OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Construir modelos metabonômicos, baseados em RMN de ^1H , para diagnosticar a infecção crônica pelos vírus das hepatites B e C, distinguir a infecção de acordo com o tipo de vírus relacionado (HBV ou HCV), e avaliar a atividade sérica das enzimas hepáticas (ALT, AST e GGT) e sua relação com as infecções pelo HBV e pelo HCV, a partir de uma única amostra de soro.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 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) e de indivíduos imunes ao HBV (controles);
- Desenvolver modelos metabonômicos, a partir dos espectros de RMN de ^1H obtidos, que permitam diferenciar:
 - Pacientes com infecção crônica pelo HBV ou pelo HCV e controles, independentemente das alterações na atividade das enzimas hepáticas (ALT, AST e GGT);
 - O diagnóstico da infecção viral crônica e a identificação da infecção de acordo com o tipo de vírus relacionado;
 - Pacientes com e sem alterações na atividade das enzimas hepáticas (ALT, AST e GGT), independentemente do tipo de vírus relacionado à infecção;
 - Pacientes com e sem alterações na atividade enzimática de acordo com o tipo de vírus relacionado à infecção;
 - Identificar a classe de compostos (metabólitos) associados à discriminação entre os grupos.

4 METODOLOGIA

4.1 DESENHO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo observacional analítico do tipo validação de teste diagnóstico fase I/II, adequado para a análise do modelo metabonômico de pacientes com diagnóstico previamente estabelecido (fase I) e determinação de pontos de corte e cálculo dos valores de sensibilidade, especificidade, acurácia, e razão de verossimilhança positiva e negativa (fase II) (SACKETT; HAYNES, 2002).

Na primeira etapa do estudo, foram construídos modelos metabonômicos para diferenciar os indivíduos com infecção crônica pelo HBV ou HCV e controles. Na segunda etapa, foi realizada a análise dos modelos para discriminar os pacientes com e sem alteração da atividade das enzimas hepáticas.

Definição dos grupos de estudo:

- **Grupo HBV:** pacientes com diagnóstico prévio de monoinfecção crônica pelo HBV (marcadores sorológicos HBsAg e anti-HBc total/IgG reagentes, e HBV-DNA detectável no plasma) com e sem alterações na atividade das enzimas hepáticas.
- **Grupo HCV:** Pacientes com diagnóstico prévio de monoinfecção crônica pelo HCV (marcador sorológico anti-HCV reagente, e HCV-RNA detectável no soro) com e sem alterações na atividade das enzimas hepáticas.
- **Grupo Controle:** indivíduos saudáveis imunes ao HBV com diagnóstico de contato prévio com o vírus (marcadores sorológicos anti-HBc total/IgG e anti-HBs reagentes), marcadores sorológicos HBsAg e anti-HCV não reagentes, e sem alterações na atividade das enzimas hepáticas.

4.2 LOCAL DO ESTUDO

O recrutamento dos pacientes e coleta das amostras de soro dos indivíduos incluídos no estudo foram realizados no serviço de Hepatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC/UFPE). Parte dos dados incluídos no estudo foi proveniente do banco de dados e de espectros (n=58) do nosso Grupo de pesquisa de Metabonômica e Ensino de Química (GMEQ), e amostras de novos pacientes foram coletadas (n=187), constituindo um total de 245 pacientes

incluídos, avaliados entre 2014 e 2016. Os exames laboratoriais de avaliação hepática, glicemia e perfil lipídico para caracterização da amostra foram realizados no Laboratório Central de Análises Clínicas do HC/UFPE como parte do *checklist* de exames de rotina do ambulatório, e os espectros de RMN de ^1H foram obtidos no laboratório da Central Analítica do Departamento de Química Fundamental da UFPE (DQF/UFPE).

4.3 POPULAÇÃO DO ESTUDO

A população alvo deste estudo foi composta por pacientes com infecção crônica pelo HBV ou HCV e indivíduos saudáveis imunes ao HBV, recrutados durante a consulta médica no ambulatório de Hepatologia do HC/UFPE.

4.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Foram incluídos no estudo pacientes maiores de 18 anos, de ambos os sexos, com diagnóstico prévio de infecção crônica pelo HBV ou HCV e indivíduos saudáveis imunes ao HBV, atendidos no ambulatório de Hepatologia do HC/UFPE.

No entanto, os indivíduos com doenças hepáticas de outras etiologias (esteatose, nódulos, cirrose), alcoolismo (consumo de etanol maior que 210 g por semana em homens e 140 g por semana em mulheres (SUMIDA et al., 2010), submetidos a qualquer tratamento antiviral, coinfectados com HIV e/ou HBV/HCV e/ou esquistossomose, utilizando imunossupressores ou medicamentos hepatotóxicos foram excluídos do estudo.

4.5 TIPO DE AMOSTRAGEM E DEFINIÇÃO DO TAMANHO DA AMOSTRA

Para o cálculo do tamanho da amostra, com a finalidade de avaliar a sensibilidade e especificidade do modelo metabonômico, utilizou-se a fórmula: $N = Z^2(P(1 - P))/D^2$ para estudos de validação (ANDRADE; ZICKER, 1997), com o objetivo de diferenciar:

1. Indivíduos com infecção crônica pelo HBV ou HCV dos indivíduos imunes, independentemente dos níveis das enzimas hepáticas, com as seguintes informações:

P = Proporção esperada de indivíduos com infecção e teste negativo (proporção de falso-negativos estimada pelo resultado do teste piloto com os 58 pacientes do banco de dados, para o cálculo da sensibilidade): HBV: 2,6% e HCV: 5,1% e de indivíduos imunes ao HBV e teste positivo (proporção de falso-positivos estimada pelo resultado do teste piloto para o cálculo da especificidade): 4,4%

D = Semiampitude do intervalo de confiança: 0,05 como o erro máximo aceitável.

Z = Intervalo de confiança (95%): 1,96

O tamanho da amostra calculado equivale a 211 indivíduos:

- Grupo de infectados pelo HBV: 72 pacientes;
- Grupo de infectados pelo HCV: 74 pacientes;
- Grupo de imunes ao HBV: 65 pacientes.

2. Indivíduos com e sem alterações da atividade das enzimas hepáticas, com as seguintes informações:

P = Proporção esperada de indivíduos com alteração da atividade enzimática e teste normal (proporção de falso-negativos estimada pelo resultado do teste piloto para o cálculo da sensibilidade): AST: 4,2%, ALT: 5,2% e GGT: 6,4% e indivíduos com atividade enzimática normal e teste alterado (proporção de falso-positivos estimada pelo resultado do teste piloto com os 58 pacientes do banco de dados, para o cálculo da especificidade): AST: 6,8%, ALT: 5,1% e GGT: 3,8%

D = Semiampitude do intervalo de confiança: 0,05 como o erro máximo aceitável.

Z = Intervalo de confiança (95%): 1,96

O tamanho da amostra calculado equivale ao maior número de indivíduos com atividade enzimática alterada (92 pacientes) somado ao maior número de indivíduos com atividade enzimática normal (97 pacientes), totalizando 189 indivíduos infectados pelo HBV/HCV:

- Grupo com alteração da atividade enzimática da AST: 62 pacientes;
- Grupo com alteração da atividade enzimática da ALT: 76 pacientes;
- Grupo com alteração da atividade enzimática da GGT: 92 pacientes;
- Grupo com atividade enzimática da AST normal: 97 pacientes;

- Grupo com atividade enzimática da ALT normal: 74 pacientes;
- Grupo com atividade enzimática da GGT normal: 56 pacientes;

Assim, o total de indivíduos a serem incluídos no estudo para que haja um erro máximo de 0,05 e um intervalo de confiança de 95% corresponde ao maior número calculado (211 pacientes). No entanto, como o espectro de 58 pacientes (HBV=22, HCV=28 e controle=8) já faziam parte do banco de dados e de espectros do grupo de estudo, foram incluídos mais 187 pacientes (HBV=95, HCV=58 e controle=34), constituindo um total de 245 pacientes incluídos no estudo.

4.6 DEFINIÇÃO E CATEGORIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS E COLETA DE DADOS

4.6.1 Operacionalização e categorização das variáveis

Variável dependente

Variável	Definição	Categorização
Espectros de RMN	Deslocamentos químicos obtidos dos espectros de RMN de ^1H	Variável numérica contínua: área de integração para cada bin – centrado em δ

Variáveis independentes

Variável	Definição	Categorização
Sexo	Refere-se ao sexo do paciente.	Variável categórica dicotômica: Masculino Feminino
Idade	Intervalo de tempo entre a data do nascimento e data de realização da coleta sanguínea (em anos).	Variável numérica discreta.
Infecção pelo HBV	Infecção crônica pelo HBV com os marcadores sorológicos HBsAg, anti-HBc reagentes utilizando a técnica de ELISA e HBV-DNA positivo pela técnica de qPCR.	Variável categórica dicotômica: Presença da infecção pelo HBV Ausência da infecção pelo HBV
Infecção pelo HCV	Infecção crônica pelo HCV com o marcador sorológico anti-HCV reagente utilizando a técnica de ELISA e HCV-RNA positivo pela técnica de qPCR	Variável categórica dicotômica: Presença da infecção pelo HCV Ausência da infecção pelo HCV
Imunidade para o HBV	Imunização natural para o HBV com os marcadores sorológicos Anti-HBs e anti-HBc reagentes pela técnica de ELISA.	Variável categórica dicotômica: Imunidade para o HBV Ausência de imunidade para o HBV

Variável	Definição	Categorização
Níveis normalizados de atividade das enzimas hepáticas (ALT, AST, GGT)	Refere-se à razão entre os níveis de atividade de cada uma das enzimas hepáticas pelos respectivos valores de referência. Homens: ALT/41, AST/38 e GGT/50 e Mulheres: ALT/31, AST/32 e GGT/32	Variável numérica contínua: Atividade enzimática normalizada: ALT (/LSN) AST (/LSN) GGT (/LSN)
Outras análises laboratoriais de avaliação hepática, glicemia e perfil lipídico	Análises bioquímicas em soro (albumina, bilirrubina total e direta, glicose, colesterol total e frações), quantificação de plaquetas em plasma com EDTA e determinação do INR em plasma com citrato de sódio 3,2%.	Variável numérica contínua: Albumina, bilirrubina total e direta, glicose, colesterol total e frações em mg/dL; Plaquetas em mm ³ ; INR: índice, sem unidade.

4.6.2 Métodos de coleta, processamento e armazenamento das amostras

Após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), os pacientes enquadrados nos critérios de elegibilidade que aceitaram participar do estudo, através da assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, tiveram os dados referentes ao diagnóstico prévio (hepatite B/C ou imunidade ao HBV), sexo e idade, carga viral e fatores de exclusão coletados através de um formulário com complementação da informação por consulta aos prontuários médicos.

Em seguida, foram coletados destes pacientes 4 tubos de 4 mL de sangue periférico, e as amostras foram centrifugadas no Setor de Bioquímica do Laboratório Central do HC/UFPE em alíquotas em cinco microtubos do tipo *ependorf*. Parte do soro obtido foi armazenado a -20 °C para posterior obtenção dos espectros por RMN de ¹H, no Laboratório da Central Analítica do DQF/UFPE.

4.6.3 Análise da atividade das enzimas hepáticas e outros testes de avaliação hepática

Os exames realizados fazem parte da rotina ambulatorial dos pacientes atendidos no serviço de Hepatologia do HC/UFPE. A atividade enzimática das enzimas hepáticas AST, ALT e GGT e as demais análises de avaliação hepática (albumina, bilirrubina total e direta, INR), perfil lipídico (colesterol total, HDL-C, LDL-C e triglicerídeos), e glicemia foram realizadas por método cinético automatizado (*kits Wiener Lab®*) em equipamento de automação Wiener Lab® (*Wiener Lab Group*), conforme o fabricante.

Para avaliação da atividade enzimática, os resultados obtidos foram transformados em valores normalizados (atividade enzimática em U/L dividida pelo valor de referência correspondente), de acordo com as instruções do fabricante:

Valores de referência	Homens	Mulheres
ALT (U/L)	< 41	< 31
AST (U/L)	< 38	< 32
GGT (U/L)	< 50	< 32

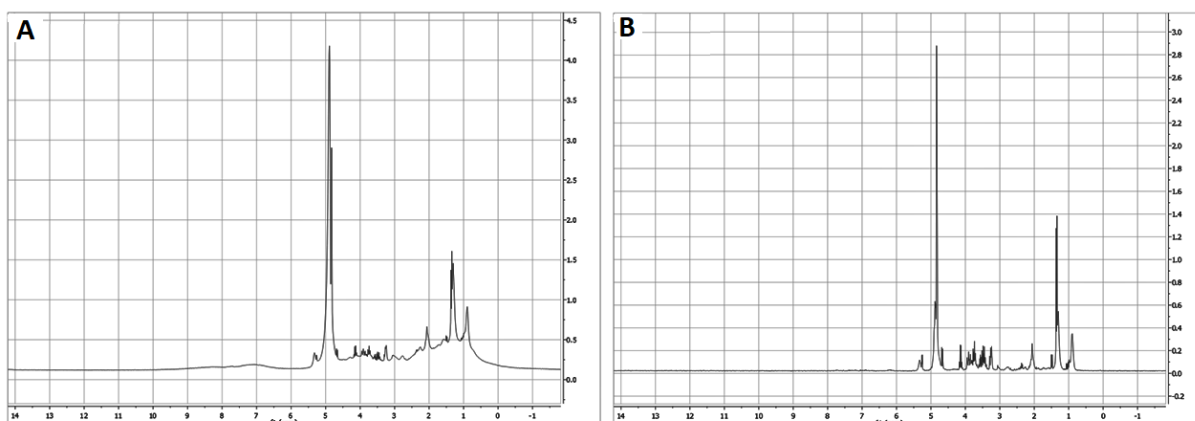
Posteriormente, estes pacientes foram estratificados, de acordo com o LSN (VERSLYPE, 2004), em grupos com níveis de atividade enzimática elevada (> 1 vez o LSN) ou níveis normais ($\leq$ 1 vez o LSN).

A quantificação de plaquetas foi realizada através do equipamento de automação para hematologia Pentra 120® (*Horiba ABX Diagnostics*), e a determinação do INR utilizando analisador ACL TOP 500® (*Werfen company*), conforme o fabricante.

4.6.4 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio-1

Para preparação das amostras de soro, foram adicionados 400 μ L de soro a 200 μ L de água deuterada (D_2O , D 99.9%, *Cambridge Isotope Laboratories, Inc., Tewksbury, USA*) em um tubo de RMN de 5 mm. Os espectros de RMN de 1H foram obtidos usando o espectrômetro *VARIAN Unity Plus 300 MHz* (*Varian Inc., Palo Alto, USA*) utilizando o lactato como referência interna de deslocamento químico (δ 1,342 ppm). Durante a aquisição do espectro de RMN de 1H utilizou-se a sequência de pulsos com pré-saturação (PRESAT) para a supressão do sinal da água (Figura 8A) e uma sequência CPMG (*Car-Purcell-Meiboom-Gill*), funcionando como um filtro de relaxação transversal (T_2), para reduzir os sinais das moléculas com tempo de T_2 curto, como os lipídios, e possibilitar uma melhor visualização dos sinais de moléculas com baixa massa molecular (Figura 8B). Como as espécies com massas molares maiores têm menor mobilidade, ocasionam uma redução no tempo de T_2 e implicam em sinais mais largos, conforme observado na Figura 8A. A utilização de filtros de T_2 permite que esses sinais sejam suprimidos ou minimizados, melhorando a resolução do espectro (Figura 8B).

Figura 8 – Aquisição do espectro após a sequência de pulsos (A) PRESAT e (B) CPMG.



Fonte: dados da pesquisa.

Os demais parâmetros foram configurados com janela espectral de 4,8 kHz, tempo de espera entre as sequências de pulsos de 2,0 s e tempo de aquisição de 1,704 s, pulso de radiofrequência RF de 90°, temperatura de 25 °C, 88 ciclos, *tau* equivalente a 0,0004 s, *bigtau* equivalente a 0,07 s, 128 varreduras e alargamento de linha de 0,3 Hz. As correções de fase e linha de base foram realizadas manualmente no espectrômetro.

4.7 ANÁLISE DE DADOS

Os dados clínicos e laboratoriais foram analisados utilizando-se o *software GraphPad Prism 6* (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Para a análise de frequência entre os grupos, utilizou-se o teste do qui-quadrado ou o teste exato de Fisher. A comparação entre as médias das variáveis com distribuição normal foi realizada através do teste t não pareado, e a comparação entre as medianas das variáveis não paramétricas, através do teste de Mann-Whitney. Foram considerados estatisticamente significantes os resultados com valor de *p* menor que 0,05.

Para as análises estatísticas dos espectros obtidos para cada amostra de soro, foi utilizado o método de alinhamento *binning*, que consiste em dividir o espectro em janelas, permitindo alinhar os espectros e filtrar ruídos. Assim, foram construídos 183 bins com 0,04 ppm de amplitude e região espectral entre δ 8,0-0,04 ppm, utilizando o *software MestreNova 10.0.1* (MestreLab Research). A região entre δ 5,16 e 4,52 ppm foi excluída para eliminar a interferência do sinal da água. Após a construção dos bins,

os dados espectrais foram organizados em uma planilha do Excel®, para a obtenção de uma matriz com 245 amostras (linhas) e 187 variáveis (colunas). Destas 187 variáveis, 183 colunas referiram-se aos bins construídos, 1 coluna à identificação clínica do paciente (HBV, HCV ou controle), e 3 colunas à classificação da atividade das enzimas hepáticas ALT, AST e GGT (normal ou alterada). A partir desta matriz, foram originadas as demais matrizes submetidas ao pré-processamento e à análise multivariada.

Os dados foram pré-processados utilizando a variação normal padrão (SNV), no qual o valor de cada elemento da matriz foi subtraído pela média de cada amostra e, em seguida, dividido pelo desvio padrão. Após o pré-processamento, foi realizada uma PCA e a matriz de escores obtida foi usada como matriz de entrada para a OPLS-DA utilizando a plataforma online *MetaboAnalyst*, versão 3.6 (XIA; WISHART, 2016) com a finalidade de obter modelos que permitissem distinguir os grupos.

O gráfico de escores da OPLS-DA foi utilizado para investigar se houve discriminação entre os grupos. Na sequência, as variáveis (componentes principais - PCs) foram projetadas, visando identificar quais foram as mais importantes para a discriminação. Uma vez identificadas, foi utilizado o gráfico de pesos (*loadings*) para identificar as regiões espectrais mais relevantes para aquelas PCs. Essas regiões foram comparadas com achados na literatura e com a base de dados do *Human Metabolome Database* (HMDB) (WISHART et al., 2009), visando identificar as classes de compostos associadas à discriminação.

Os valores de sensibilidade (Sn), especificidade (Sp), razão de verossimilhança positiva (LR+), razão de verossimilhança negativa (LR-) e acurácia (A) foram calculados. A validação do modelo OPLS-DA baseou-se no teste de permutação com 2000 permutações da variável de classe.

4.8 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da UFPE, sob o protocolo de número 1.782.771/2016 (Anexo A). A proposta da pesquisa foi apresentada aos participantes do estudo de forma clara e simples. Participaram do estudo aqueles que confirmaram a sua participação espontânea através da assinatura do TCLE (Apêndice A).

5 RESULTADOS

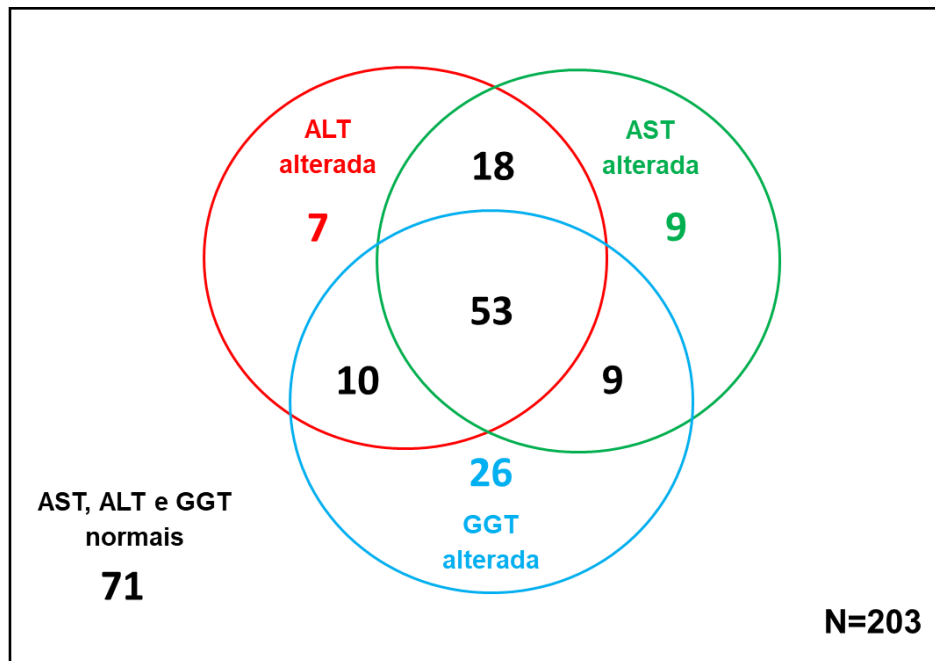
Visando responder aos objetivos da tese e melhor apresentar os seus achados, os resultados da pesquisa serão apresentados na forma de dois artigos científicos submetidos às revistas *Journal of gastroenterology and hepatology* (fator de impacto: 3,452, qualis A2) e *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* (fator de impacto: 3,255, qualis A2).

Inicialmente, foram construídos quatro modelos metabonômicos OPLS-DA apresentados no artigo 1: (1) Hepatite B ou C versus Controle; (2) HBV versus HCV; (3) HBV versus Controle; e (4) HCV versus Controle. Nessa primeira etapa do estudo, dos 245 indivíduos incluídos no estudo, 117 (47,8%) foram incluídos no grupo HBV, 86 (35,1%) no grupo HCV e 42 (17,1%) no grupo controle/imune ao HBV.

No artigo 2 foram construídos três modelos para avaliação da atividade enzimática, independentemente do tipo de vírus (HBV ou HCV) relacionado a infecção: (1) ALT; (2) AST; e (3) GGT; e quatro modelos avaliando a discriminação em função do tipo de vírus: (1) ALT em HBV; (2) AST em HBV; (3) ALT em HCV; (2) AST em HCV.

Na segunda etapa do estudo, para avaliação da atividade enzimática, os 203 pacientes infectados foram distribuídos independentemente do tipo de vírus (HBV ou HCV) relacionado à infecção, conforme a Figura 9. Os quatro conjuntos e as intersecções indicam as várias possibilidades de alteração das enzimas hepáticas incluídas no estudo. Dos 203 pacientes, 88 (43,3%) apresentaram níveis séricos de ALT alterada, 89 (43,8%) tinham AST alterada e 98 (48,3%) apresentaram alteração no nível sérico de GGT. Enquanto 71 (35,0%) não apresentaram alteração nos níveis séricos dessas enzimas.

Figura 9 – Distribuição de 203 pacientes infectados pelo HBV ou HCV em conjuntos de acordo com a combinação de alterações nos níveis séricos das enzimas hepáticas AST, ALT e GGT, em Recife/PE, no período de 2014 a 2016.



5.1 ARTIGO 1 - Diagnóstico da infecção crônica pelos vírus das hepatites B e C por metabonômica baseada em RMN de ^1H (versão em inglês - Apêndice B).

INTRODUÇÃO

Os vírus da hepatite B (HBV) e da hepatite C (HCV) constituem uma causa importante de doença hepática, pois induzem complicações como cirrose e carcinoma hepatocelular (IRSHAD, 2013; SAEED, 2014). Aproximadamente 240 milhões de indivíduos são portadores crônicos do HBV enquanto 80 milhões de indivíduos apresentam infecção por HCV em todo o mundo (WHO, 2017). No Brasil, a prevalência de exposição ao HBV (anti-HBc) e ao HCV (anti-HCV) em um inquérito populacional foi de 7,4% e 1,38%, respectivamente (PEREIRA et al., 2010, 2013).

A maioria das pessoas com infecção crônica pelo HBV e HCV permanece sem diagnóstico e são necessárias políticas de triagem nacionais especialmente nas populações de maior risco (WHO, 2017). O diagnóstico de infecção crônica pelo HBV e pelo HCV é realizado através de testes sorológicos seguidos pela confirmação do diagnóstico primário por testes moleculares, como a quantificação da carga viral, determinação do genótipo e cepas mutantes resistentes para tratamento antiviral. A presença de sinais de hepatite crônica pode ser baseada em aminotransferases elevadas e confirmada pela histologia (EASL, 2016, 2017; VILLAR et al., 2015).

Além disso, observa-se que o desenvolvimento de novos métodos diagnósticos e um melhor entendimento das infecções por estes vírus são importantes na identificação precoce destas doenças e na prevenção de complicações mais graves (IRSHAD; MANKOTIA; IRSHAD, 2013). Como alternativa, a metabonômica mostra-se como uma ferramenta poderosa, que permite avaliar o metabolismo sistêmico através da análise de amostras biológicas e de técnicas analíticas associadas a análises multivariadas de dados (NICHOLSON et al., 2002).

A metabonômica utiliza métodos abrangentes para avaliação do perfil metabólico nos fluidos biológicos e fornece uma análise sistêmica dos processos biológicos (BECKONERT et al., 2007). O uso de espectroscopia de RMN requer um preparo mínimo da amostra, sendo considerada uma técnica com alto custo-efetividade, rápida, reproduzível, e que proporciona informações relacionadas as estruturas moleculares a partir de quantidades pequenas de amostras. A espectroscopia de RMN faz parte da estratégia baseada no estudo integrado dos

sistemas biológicos com outras ferramentas ômicas, tais como genômica e proteômica (LENZ; WILSON, 2007).

Esta estratégia tem sido amplamente utilizada para fornecer informações sobre a patogênese e o diagnóstico de doenças hepáticas, incluindo infecções pelo HBV (YUE et al., 2016), HCV (GODOY et al., 2010), coinfecção entre esquistossomose e hepatite B ou C (GOUVEIA et al., 2017), fibrose hepática (BATISTA et al., 2018; EMBADE et al., 2016; SANDS et al., 2015) e cirrose (WANG et al., 2012), e para encontrar potenciais marcadores metabólicos com alta sensibilidade e especificidade (HOU; DUAN, 2016).

Assim, no presente estudo buscou-se utilizar a estratégia metabonômica baseada em RMN de ^1H para realizar em uma mesma amostra de soro o diagnóstico da infecção crônica pelos vírus das hepatites B e C e para distinguir a infecção de acordo com o tipo de vírus relacionado (HBV ou HCV),

MÉTODOS

Pacientes e coleta das amostras

Este estudo transversal, prospectivo, de validação fase I/II (SACKETT; HAYNES, 2002) incluiu indivíduos previamente diagnosticados com monoinfecção pelo HBV ou HCV, ou saudáveis com imunidade ao HBV e foram recrutados no ambulatório de Hepatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco no período de outubro de 2012 a setembro de 2016. Foram incluídos neste estudo 245 indivíduos adultos, 128 mulheres (52,2%) e 117 (47,8%) homens, com idade entre 18 e 83 anos ($46,8 \pm 14,77$).

Desses 245 pacientes, 117 (47,8%) apresentavam tanto HBsAg quanto anti-HBc por um período superior a 6 meses e apresentavam HBV-DNA detectável no plasma (grupo HBV), 86 pacientes (35,1%) eram anti-HCV positivos por mais de 6 meses e apresentavam HCV-RNA detectável no soro (grupo HCV) e 42 indivíduos (17,1%) apresentavam anti-HBs e anti-HBc reagentes (grupo controle/ imune ao HBV).

As amostras de sangue total foram imediatamente processadas para obtenção do soro. Parte das amostras foi armazenada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior obtenção dos espectros por RMN de ^1H , e outra parte para realização dos exames laboratoriais.

Pacientes submetidos a qualquer tratamento antiviral, utilizando imunossupressores, coinfectados com HIV e/ou HBV/HCV e/ou esquistossomose foram excluídos do estudo.

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CCS-UFPE), Recife, Brasil (Número de protocolo: 1.782.771/2016) e todos os pacientes eram adultos e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

Exames bioquímicos e de avaliação hepática

As amostras de soro de todos os pacientes foram analisadas e os testes de avaliação hepática, incluindo alanina e aspartato aminotransferase (ALT e AST), gamma-glutamil transferase (GGT), albumina, bilirrubina, INR, bem como os testes de perfil lipídico (colesterol total, HDL-C, LDL-C e triglicerídeos) e glicemia foram realizados utilizando kits *Wiener Lab*® em equipamento de automação *Wiener Lab*® (*Wiener Lab Group, Argentina*), de acordo com as instruções do fabricante. A quantificação de plaquetas foi realizada através do equipamento de automação para hematologia Pentra 120® (*Horiba ABX Diagnostics*), e a determinação do INR utilizando analisador ACL TOP 500® (*Werfen company*), conforme o fabricante.

Análise de RMN de ^1H

Antes da análise de RMN, foram adicionados 400 μL de amostras de soro a 200 μL de D_2O (óxido de deutério, D 99,9%, Cambridge Isotope Laboratories, Inc., Tewksbury, EUA) e colocados em tubos de RMN de 5 mm. Todos os espectros de RMN de ^1H foram realizadas no espectrômetro *VARIAN Unity Plus* 300 MHz (Varian Inc., Palo Alto, EUA) utilizando o lactato como referência interna de deslocamento químico (δ 1,342 ppm).

Os espectros das amostras de soro foram obtidos utilizando uma sequência de pulsos com pré-saturação (PRESAT) do sinal de água, seguida de uma sequência de Carr-Purcell-Mieboom-Gill (CPMG), empregado como um filtro de T2 para que os sinais dos metabólitos menores pudessem ser visualizados. Foi utilizada uma janela espectral de 4,8 kHz, tempo de espera de 2,0 s, 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, 128 varreduras e apodização de 0,3 Hz. As correções de fase e da linha de base foram feitas manualmente.

Análises estatísticas

Em todas as análises estatísticas, os espectros obtidos para cada amostra de soro (δ 8,0-0,04 ppm) foram reduzidos para 183 regiões espectrais (bins) de igual comprimento (δ 0,04 ppm) e a região de dados correspondente ao sinal da água (δ 5,16-4,52 ppm) foi removida, utilizando o software MestreNova (versão 10.0.1, *MestreLab Research*).

Assim, foi criada uma matriz contendo 245 casos (linhas) e 184 variáveis (colunas). Destas 184 variáveis, 183 colunas referiram-se ao espectro de RMN de ^1H , e uma coluna à identificação clínica do paciente (HBV, HCV ou controle). A partir dessa matriz foi originada todas as matrizes que foram submetidas à análise estatística multivariada.

As matrizes obtidas foram analisadas utilizando a plataforma de processamento online *MetaboAnalyst* 3.6 (XIA; WISHART, 2016). Na etapa de pré-processamento, utilizou-se SNV (Variação Normal Padrão) nas amostras, e posteriormente, foi realizada uma análise de componentes principais (PCA) e a matriz de escores obtida foi usada como matriz de entrada para a Análise Discriminante Ortogonal por Mínimos Quadrados Parciais (OPLS-DA). A validação do modelo OPLS-DA baseou-se no teste de permutação com 2000 permutações da variável de classe.

O gráfico de escores da OPLS-DA foi utilizado para investigar se houve discriminação entre os grupos. Na sequência, as variáveis (Componentes Principais - PCs) foram projetadas, visando identificar quais foram as mais importantes para a discriminação. Uma vez identificadas, foi utilizado o gráfico de pesos (*loadings*) para identificar as regiões espectrais mais relevantes para aquelas PCs. Essas regiões foram comparadas com achados na literatura e com a base de dados do *Human Metabolome Database* (HMDB) (WISHART et al., 2009), visando identificar as classes de compostos associadas à discriminação.

Para cada modelo OPLS-DA, foi utilizada uma tabela de contingência 2x2 para calcular a sensibilidade (S_n), especificidade (S_p), razão de verossimilhança positiva (LR^+), razão de verossimilhança negativa (LR^-), acurácia (A) e intervalo de confiança de 95% (IC de 95%) para cada parâmetro. A análise da razão de verossimilhança foi aplicada em vez dos valores preditivos, uma vez que não depende da prevalência do

resultado para o qual o teste é usado. Utilizaram-se os seguintes parâmetros: LR+ acima de 10 indicando uma alta probabilidade da presença da doença pós teste, e uma LR- abaixo de 0, indicando uma alta probabilidade de ausência da doença pós teste.

Para avaliar a distribuição de dados demográficos e exames bioquímicos e de avaliação hepática entre os grupos foram realizados os testes t de *Student* não pareado, Mann-Whitney, Exato de Fisher, e qui-quadrado, conforme apropriado, utilizando o software *GraphPad Prism 6* (*GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA*). Foram considerados estatisticamente significantes os resultados com valor de *p* menor que 0,05.

RESULTADOS

A Tabela 1 mostra as características demográficas e exames bioquímicos e de avaliação hepática dos grupos HBV, HCV e controle. Foram encontradas diferenças significativas entre os três grupos de pacientes, com exceção das variáveis gênero, fosfatase alcalina e HDL-c. Em pacientes com infecção crônica pelo HCV observaram-se maiores valores das variáveis idade, níveis de atividade da ALT, AST, GGT, níveis de bilirrubina total e glicose, enquanto no grupo de infectados pelo HBV e controles, os níveis de albumina, colesterol total e LDL-c foram ligeiramente maiores. Além disso, a quantificação de plaquetas e os níveis de triglicerídeos foram maiores no grupo controle quando comparados aos pacientes com HBV ($p=0,039$ e $p=0,007$, respectivamente) e com HCV ($p=0,001$ e $p=0,009$, respectivamente).

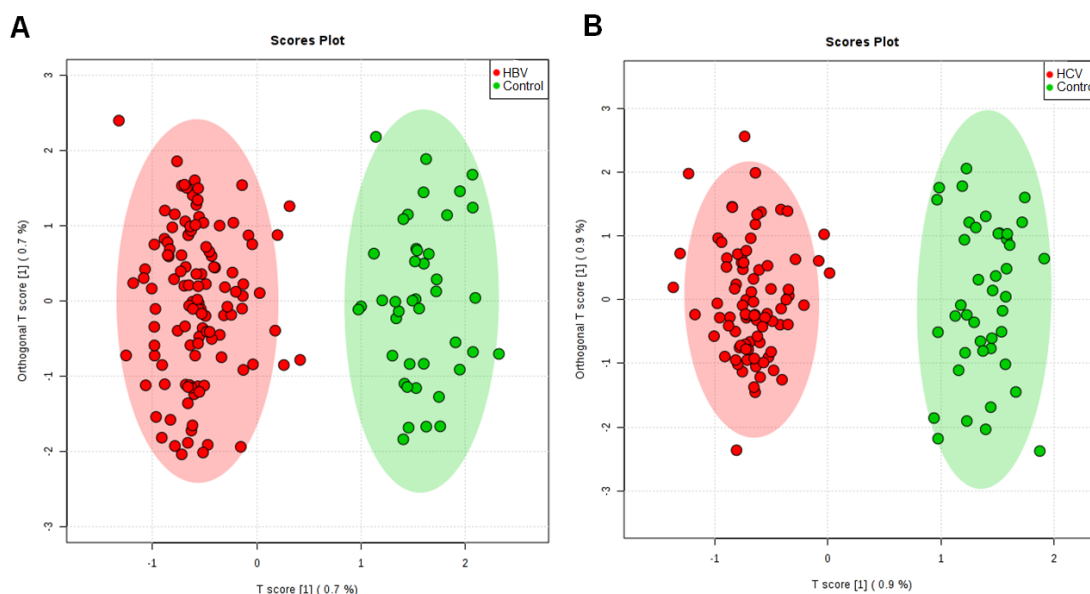
Tabela 1 - Características demográficas e exames bioquímicos e de avaliação hepática de pacientes com infecção crônica pelo HBV (n=117), pelo HCV (n=86) e controles (n=42), em Recife/PE, no período de 2014 a 2016.

Características	HBV (n=117)	HCV (n=86)	Controles (n=42)	<i>p</i> (B x C)	<i>P</i> (C x N)	<i>p</i> (B x N)
Gênero (M/F, n, %)	62/55 (53/47)	37/49 (43/57)	18/24 (42,9/57,1)	0,160 ^a	0,986 ^a	0,260 ^a
Idade (anos)*	40,1 ±13,5	56,2 ±12,7	46,5 ±11,6	<0,001 ^b	<0,001 ^b	0,007 ^b
ALT (/LSN)	0,75 (0,53-0,96)	1,53 (0,93-2,61)	0,48 (0,38-0,68)	<0,001 ^c	<0,001 ^c	<0,001 ^c
AST (/LSN)	0,72 (0,58-0,89)	1,42 (0,96-2,47)	0,56 (0,47-0,67)	<0,001 ^c	<0,001 ^c	<0,001 ^c
GGT (/LSN)	0,75 (0,52-1,18)	1,62 (1,00-2,96)	0,66 (0,56-0,92)	<0,001 ^c	<0,001 ^c	0,216 ^c
FA (/LSN)	1,18 (0,74-1,67)	1,23 (0,97-1,78)	1,13 (0,83-1,45)	0,085 ^c	0,069 ^c	0,663 ^c
Bilirrubina total (mg/dL)	0,5 (0,4-0,7)	0,7 (0,5-1,02)	0,5 (0,4-0,6)	<0,001 ^c	<0,001 ^c	0,115 ^c
Albumina (g/dL)	4,3 (4,1-4,5)	4,2 (3,9-4,4)	4,3 (4,2-4,5)	<0,001 ^c	0,002 ^c	0,609 ^c
Plaquetas (10 ⁹ /mm ³)*	220 ±69	201 ±75	246 ±56	0,064 ^b	0,001 ^b	0,039 ^b
INR	1,07 (1,02-1,14)	1,07 (1,00-1,12)	1,04 (1,00-1,09)	0,422 ^c	0,230 ^c	0,036 ^c
Glicose (mg/dL)	84,4 (77-96)	91,5 (81,2-103)	86,4 (77,3-99,8)	0,012 ^c	0,133 ^c	0,577 ^c
Colesterol total (mg/dL)*	183,8 ±40,7	160,7 ±40,3	185,3 ±55,2	<0,001 ^b	0,008 ^b	0,861 ^b
HDL-c (mg/dL)*	49,9 (42,8-59,4)	49,0 (38,5-60)	51,4 (41,5-59,1)	0,798 ^c	0,692 ^c	0,890 ^c
LDL-c (mg/dL)	109,7 ±36,8	86,6 ±32,7	111,2 ±37,5	<0,001 ^b	<0,001 ^b	0,830 ^b
Triglicerídeos (mg/dL)	117,1 (71-150,6)	100,9 (71-141,2)	142,7 (94,1-182,1)	0,875 ^c	0,009 ^c	0,007 ^c

^aTeste de qui-quadrado; ^bTeste *t* não pareado; ^cTeste de Mann-Whitney. Dados apresentados como valores medianos (intervalo interquartil entre parênteses), exceto aqueles marcados com um asterisco (*) que foram apresentados como média ± desvio padrão. Os valores de *P* em negrito indicam as categorias que diferem significativamente entre os grupos. **ALT**: alanina aminotransferase; **AST**: aspartato aminotransferase; **FA**: fosfatase alcalina; **GGT**: gamma-glutamil transferase; **HDL-c**: lipoproteína de alta densidade - colesterol; **INR**: Razão normalizada internacional; **LDL-c**: lipoproteína de baixa densidade - colesterol; **LSN**: limite superior da normalidade.

A Figura 1 mostra os gráficos de escores dos modelos OPLS-DA construídos para diagnosticar monoinfecção pelo vírus das hepatites B (Figura 1A) ou C (Figura 1B), separadamente.

Figura 1 - Gráficos de escores bidimensional dos modelos OPLS-DA para o diagnóstico da infecção crônica pelo HBV e pelo HCV, em Recife/PE, no período de 2014 a 2016. (A) pacientes infectados pelo HBV *versus* controles; (B) pacientes infectados pelo HCV *versus* controles.



Os gráficos de escores da OPLS-DA para os dois modelos mostraram clara discriminação entre os grupos (HBV x Controle; HCV x Controle). O gráfico que mostra a importância das variáveis para a discriminação observada (Apêndice D, Figura 1A) indicou que, no modelo HBV *versus* Controles, a discriminação entre os grupos foi provocada por PC1, PC2 e PC3. Destaca-se que a PC3 foi fortemente influenciada pelos deslocamentos em δ 0,8 e 1,2 ppm, ambos associados à cadeia alquílica de HDL e LDL, à medida que PC2 foi influenciada fortemente (loadings negativos) pela região espectral entre δ 5,4 e 6,4 ppm, a qual encontra-se associada a carboidratos e espécies insaturadas, e aos deslocamentos δ 3,36, 2,92 e 1,92 ppm relacionados aos aminoácidos prolina, asparagina e cistina, uma forma dimérica oxidada da cisteína. Para PC1, observou-se influência da região entre δ 6,8 e 8,0 ppm, com *loadings* negativos, associada a espécies insaturadas e aromáticas (Apêndice D, Figura 1B).

Para o modelo HCV *versus* Controles, observou-se discriminação dos grupos associada à PC2 (Apêndice D, figura 2A), a qual foi fortemente influenciada pelos sinais entre δ 3,28 e 3,88 ppm, relacionados a fenilalanina e a glicose. Observou-se também a contribuição do sinal em δ 3,04 ppm, atribuído à creatinina, e em δ 2,36 ppm ao glutamato. Com *loadings* negativos, identificou-se a região associada a espécies aromáticas e insaturadas (δ 6,8-8,0 ppm) (Apêndice D, figura 2B).

Em relação à matriz de classificação dos modelos OPLS-DA comparando pacientes infectados crônicos pelo HBV e controles, e pacientes infectados crônicos pelo HCV e controles (Tabela 2), observou-se maior especificidade (97,6%) para o modelo HCV *versus* controles, com Sn de 90,7%, LR+ de 37,2 e LR- de 0,1, quando comparado ao modelo HBV, o que indica que a chance de o modelo detectar corretamente a presença de infecção pelo HCV nos infectados é 37,2 vezes maior que nos controles, com uma probabilidade de 97% de identificar a doença pós teste. Enquanto para o modelo HBV *versus* controles, observou-se sensibilidade de 95,7%, com Sp de 95,2%, LR+ de 20,1 e LR- de 0,04, o que indica que a chance de o modelo detectar corretamente a presença de infecção pelo HBV nos infectados é 20,1 vezes que nos controles, com uma probabilidade de 95,2% de identificar a doença pós teste.

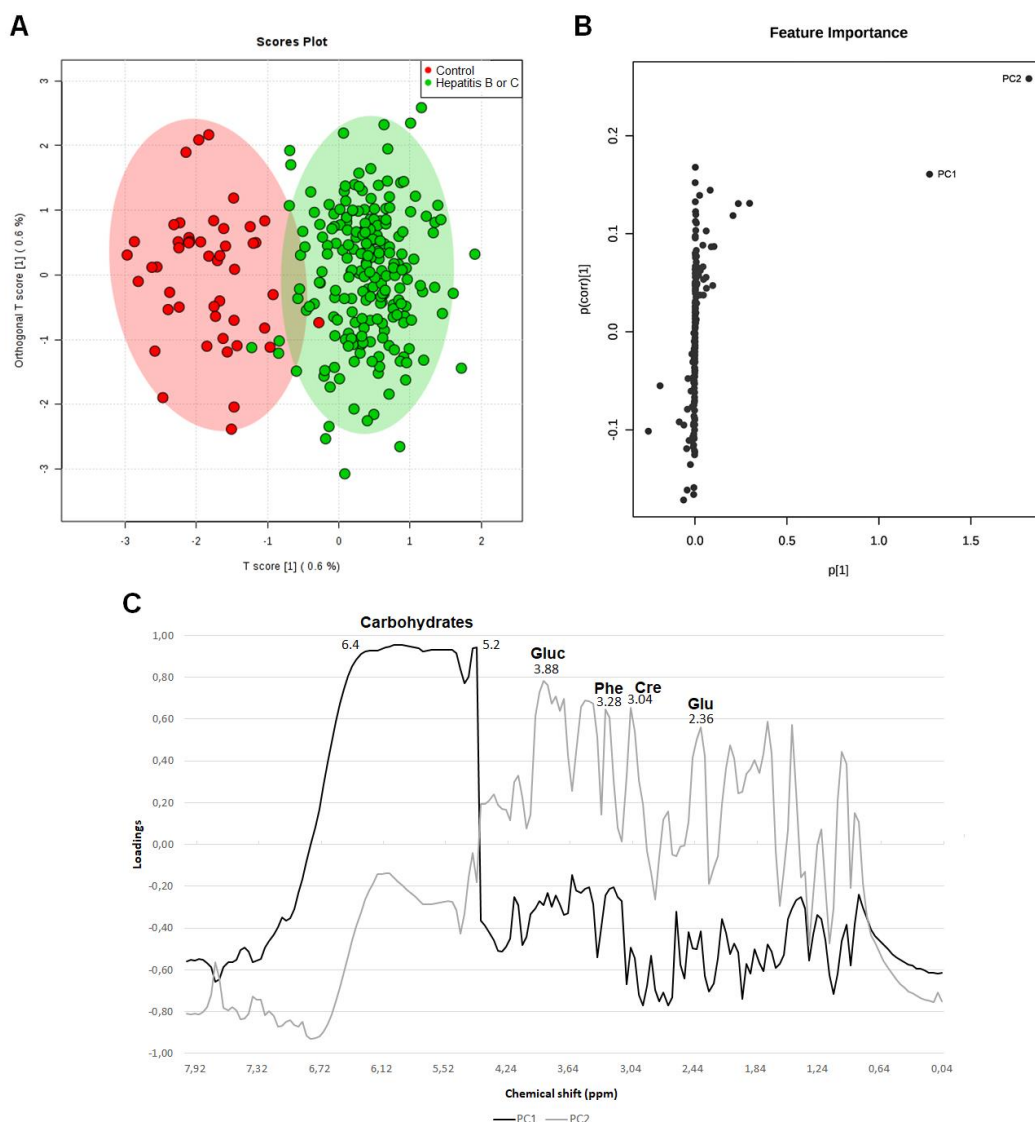
Tabela 2 – Desempenho dos modelos metabonômicos OPLS-DA para identificar infecção crônica pelo HBV ou HCV, em Recife/PE, no período de 2014 a 2016.

HBV versus controle												
Modelo (N=159)	Grupo		p ^a	Sensibilidade		Especificidade		LR+		LR-		A
	HBV	Controle		(%)	CI _{95%}	(%)	CI _{95%}	CI _{95%}	CI _{95%}			
HBV	112	2	<0,001	95,7	90,3-98,6	95,2	83,8-99,4	20,1	5,2-77,8	0,04	0,2-0,11	95,6
Controle	5	40										
HCV versus controle												
Modelo (N=128)	Grupo		p ^a	Sensibilidade		Especificidade		LR+		LR-		A
	HCV	Control		(%)	CI _{95%}	(%)	CI _{95%}	CI _{95%}	CI _{95%}			
HCV	78	1	<0,001	90,7	82,5-95,9	97,6	87,1-99,9	37,2	5,36-258	0,1	0,05-0,18	93,0
Controle	8	41										
Infecção viral versus controle												
Modelo (N=245)	Grupo		p ^a	Sensibilidade		Especificidade		LR+		LR-		A
	Infecção viral	Controle		(%)	CI _{95%}	(%)	CI _{95%}	CI _{95%}	CI _{95%}			
Infecção viral	183	1	<0,001	90,2	85,2-93,9	97,6	87,4-99,9	37,9	5,46-262,7	0,1	0,07-0,15	91,4
Controle	20	41										
HBV versus HCV												
Modelo (N=203)	Grupo		p ^a	Sensibilidade		Especificidade		LR+		LR-		A
	HCV	HBV		(%)	CI _{95%}	(%)	CI _{95%}	CI _{95%}	CI _{95%}			
HCV	82	9	<0,001	93,4	88,5-98,7	92,3	85,9-96,4	12,4	6,6-23,3	0,05	0,02-0,13	93,6
HBV	4	108										

^aTeste Exato de Fisher; A: Acurácia; LR+: Razão de verossimilhança positiva; LR-: Razão de verossimilhança negativa.

Na Figura 2, observa-se o resultado do modelo OPLS-DA comparando pacientes com infecção crônica pelo HBV (n=117) ou pelo HCV (n=86), combinados como um grupo de infecção viral, em relação ao grupo controle (n=42). Enquanto na figura 3, observa-se o resultado do modelo comparando amostras de pacientes com HBV e pacientes com HCV.

Figura 2 - Resultado do modelo OPLS-DA comparando amostras de pacientes com infecção viral crônica B ou C e controles, em Recife/PE, no período de 2014 a 2016. (A) Gráfico de escores bidimensional; (B) Gráfico de importância das componentes principais; (C) Gráfico de *loadings* das componentes principais.

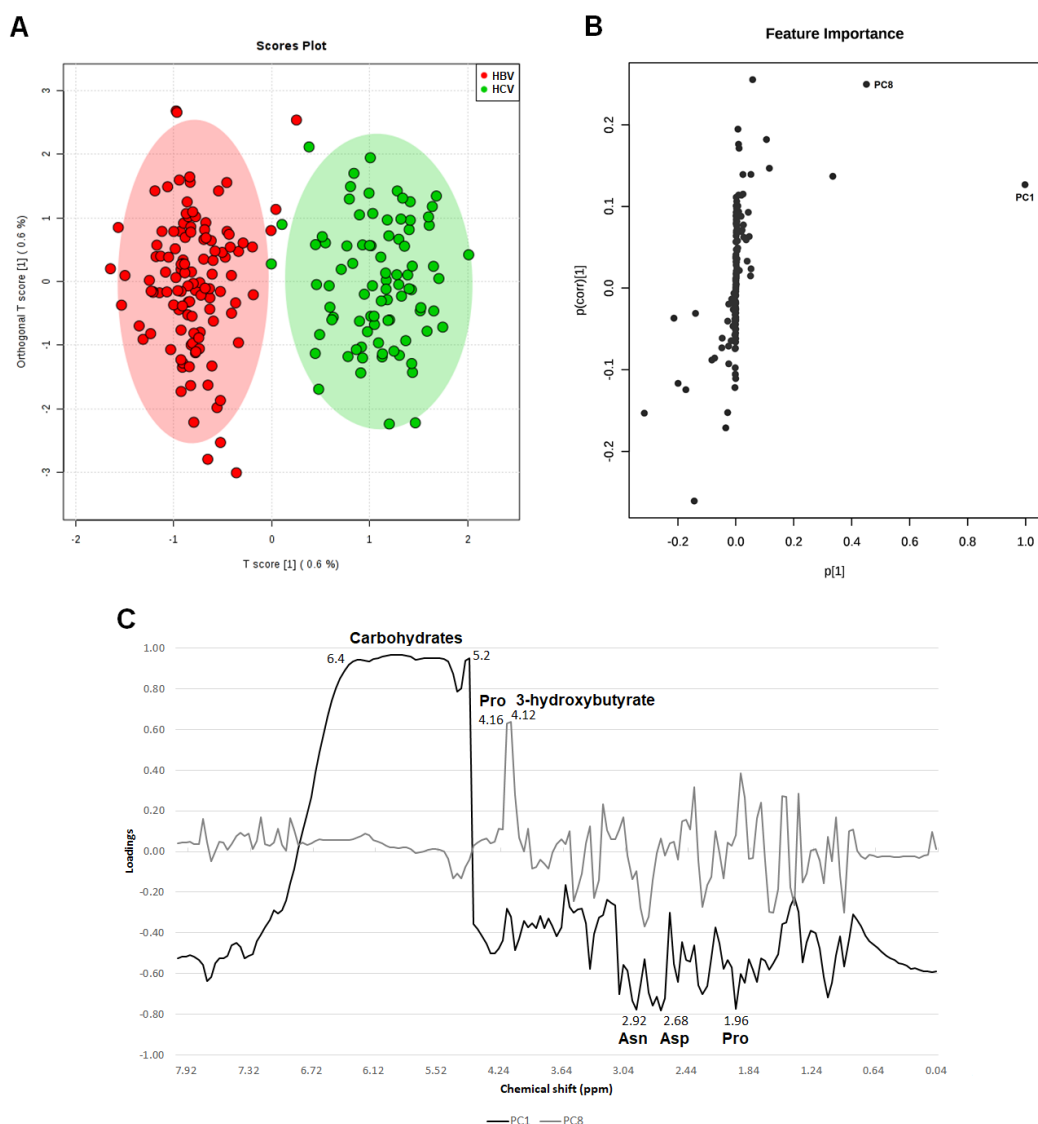


Legenda: Cre: creatinina; Glu: Glutamato; Gluc: glicose; Phe: fenilalanina.

A discriminação entre o grupo com infecção viral e o grupo controle (Figura 2A) ocorreu principalmente em função da PC1 e PC2 (Figura 2B). Ao analisar o gráfico de *loadings* da PCA (Figura 2C), PC1 mostrou uma forte contribuição da região associada aos carboidratos e espécies insaturadas (δ 5,2 e 6,4 ppm), à medida que para PC2, identificaram-se principalmente os sinais entre δ 3,28 e 3,88 ppm, associados à fenilalanina e glicose, e também os sinais atribuídos à creatinina (δ 3,04 ppm) e ao glutamato (δ 2,36 ppm).

Enquanto para o modelo comparando pacientes infectados pelo HBV e pelo HCV (Figura 3A), observou-se que a discriminação ocorreu essencialmente em função da PC1 e PC8 (Figura 3B). Ao analisar o gráfico de *loadings* dessas componentes, observou-se que PC1 foi fortemente influenciada pela região associada a carboidratos e espécies insaturadas (δ 5,2 e 6,4 ppm), e pelos sinais δ 1,96, 2,68 e 2,96 ppm, associados a prolina, aspartato e asparagina, à medida que PC8 foi determinada pelos sinais entre δ 4,12-4,16, associados à prolina e ao 3-hidroxibutirato (Figura 3C).

Figura 3 – Resultado do modelo OPLS-DA comparando amostras de pacientes infectados pelo HBV e pelo HCV, em Recife/PE, no período de 2014 a 2016. (A) Gráfico de escores bidimensional; (B) Gráfico de importância das componentes principais; (C) Gráfico de *loadings* das componentes principais.



Legenda: Asn: asparagina; Asp: aspartato; Pro: prolina.

Em relação ao desempenho destes modelos (Tabela 2), observou-se para o modelo comparando infecção viral e controles maior especificidade (97,6%), com Sn de 90,2%, e valores de LR + e LR- de 37,9 e 0,1, respectivamente, o que indica que a chance de o modelo detectar corretamente a presença de infecção pelo HBV ou HCV nos infectados é 37,9 vezes maior que nos controles, com uma probabilidade de 97,4% de identificar a doença pós teste. Por outro lado, o modelo comparando amostras de pacientes com HBV e HCV apresentou sensibilidade de 93,4%, com Sp de 92,3%, LR + de 12,4 e LR- de 0,05, o que indica que a chance de o modelo detectar corretamente a presença de infecção pelo HCV é 12,4 vezes maior que nos pacientes com infecção crônica pelo HBV, com uma probabilidade de 92,5% de identificar a doença pós teste.

DISCUSSÃO

Os pacientes com infecção crônica pelo HCV apresentaram idade mais avançada e níveis significativamente maiores de atividade das enzimas hepáticas (ALT, AST e GGT), bilirrubina total e glicose, e menores níveis de albumina, quantificação de plaquetas, colesterol total, LDL-c e triglicerídeos, quando comparados ao grupo de infectados pelo HBV e grupo controle.

Ainda que seja descrito na literatura que o aumento dos níveis de atividade das aminotransferases associado à infecção crônica pelo HCV seja geralmente mais modesto do que o associado à infecção crônica pelo HBV (GIANNINI; TESTA; SAVARINO, 2005), salienta-se que a maioria dos pacientes com infecção crônica pelo HBV avaliados neste estudo encontrava-se na fase HBeAg não reagente, com níveis de atividade enzimática normais e HBV-DNA inferiores a 2000 UI/mL. Além disso, entre os pacientes com infecção crônica pelo HCV, as lesões hepáticas são geralmente mais leves nos pacientes que apresentam níveis normais de ALT séricos, quando comparados àqueles com níveis de ALT alterados. No entanto, alguns pacientes com infecção crônica pelo HBV ou HCV que apresentam atividade histológica ou mesmo níveis normais de atividade da ALT também podem ter doença hepática avançada (DOR-MOHAMMADI et al., 2005; WONG et al., 2017).

Com efeito, a infecção crônica pelo HCV está associada à hipolipidemia com níveis de colesterol LDL, e colesterol total mais baixos, os quais aumentam após a resolução da infecção (COREY et al., 2011). Nos modelos construídos, ainda que os

sinais associados ao HDL e LDL (δ 0,8 e δ 1,2 ppm) não tenham sido intensos no modelo HCV *versus* controle, estes encontraram-se maiores no grupo controle. Embade et al, ao comparar pacientes com cirrose decorrente da infecção pelo HCV e pacientes sem fibrose, em um estudo metabonômico baseado em RMN, identificaram níveis mais baixos (85%) de colesterol em cirróticos (EMBADE et al., 2016). Além disso, evidências clínicas indicam que a infecção pelo HCV não está apenas ligada ao metabolismo dos lipídios nos hepatócitos infectados, mas também a uma desregulação do metabolismo das lipoproteínas circulantes, uma vez que os vírions circulantes estão fisicamente associados a lipoproteínas em complexos denominados partículas lipovirais (FELMLEE et al., 2013).

Também é descrito na literatura que a quantificação de plaquetas reduz significativamente em pacientes com hepatite C crônica com fibrose avançada e cirrose hepática, mas não em pacientes com infecção crônica pelo HBV, sobretudo no portador inativo ou controles saudáveis. A quantificação de plaquetas é considerada um preditor de fibrose hepática e são significativamente correlacionadas com estágio fibrótico, assim, a ativação plaquetária pode ser considerada uma das causas de trombocitopenia em pacientes com doenças hepáticas virais crônicas, principalmente em pacientes com hepatite C crônica (FUSEGAWA et al., 2002; NIELSEN et al., 2017). Além disso, a fibrose hepática é relatada como sendo significativamente maior em pacientes crônicos infectados pelo HCV do que em paciente com HBV, o que foi observado em nosso estudo, uma vez que a maioria dos pacientes infectados pelo HBV encontrava-se na fase HBeAg-negativa.

Os quatro modelos construídos no presente estudo foram capazes de discriminar pacientes com infecção crônica pelo HBV, pelo HCV e distinguir a infecção de acordo com o tipo de vírus relacionado. Para o modelo comparando HBV e controles, observou-se que as amostras de pacientes infectados pelo HBV apresentaram escores negativos na OPLS-DA, com PC1, PC2 e PC3 como componentes mais importantes para a discriminação. Para PC2, os deslocamentos mais importantes encontraram-se na região entre δ 5,2 e 6,4 ppm, associada a espécies insaturadas e carboidratos, enquanto para PC3 encontrou-se relacionado ao HDL e LDL (δ 0,8 e 1,2 ppm). Além disso, PC1 mostrou-se associada a espécies aromáticas e insaturadas (δ 6,8-8,0 ppm).

Dessa forma, o aumento da concentração de carboidratos e espécies insaturadas resultaram em uma diminuição no escore de PC2, enquanto

concentrações elevadas de HDL e LDL levaram a um aumento no score de PC3. Consequentemente, isso produziu escores positivos da OPLS-DA, e levou a amostra a ser classificada no grupo controle. No entanto, as concentrações aumentadas dos aminoácidos prolina, asparagina e da cistina resultaram em maiores escores de PC2, enquanto concentrações elevadas de espécies insaturadas e aromáticas levaram a menores escores de PC1, resultando em scores negativos da OPLS-DA, e levando a amostra a ser classificada no grupo HBV.

Este resultado corrobora as características bioquímicas apresentadas na tabela 1, uma vez que os pacientes infectados pelo HBV apresentaram níveis séricos de HDL e LDL mais baixos em comparação com o grupo controle. Resultados semelhantes foram observados para a glicose, onde voluntários saudáveis apresentaram níveis séricos mais elevados que os pacientes infectados pelo HBV. Embora essas diferenças não tenham apresentado diferença estatística na Tabela 1, no modelo metabonômico mostraram-se significativas. Portanto, o modelo metabonômico indicou que os pacientes infectados pelo HBV apresentaram maiores níveis séricos de aminoácidos, espécies insaturadas e aromáticas, e níveis mais baixos de HDL, LDL, carboidratos e espécies insaturadas, quando comparados ao grupo controle.

De forma semelhante, Zheng et al. ao avaliarem pacientes com infecção crônica pelo HBV e controles utilizando RMN de ^1H de amostras de soro, identificaram no grupo de infectados a presença de altos níveis lipídios insaturados, e ainda dos aminoácidos aromáticos histidina (δ 7,04 ppm) e fenilalanina (δ 7,32 ppm), correspondentes a região de hidrogênios ligados a carbonos insaturados ou aromáticos. No entanto observaram ainda redução nos níveis séricos de produtos do metabolismo de carboidratos, e de n-acetilglicoproteína (δ 2,04 ppm) e acetona (δ 2,2 ppm) (ZHENG et al., 2017). Hou et al., também analisando amostras de soro de pacientes com infecção crônica pelo HBV e controles por cromatografia, identificaram a presença de produtos do metabolismo de carboidratos, como o ácido cítrico e o ácido aconítico, e dos aminoácidos glutamina e N,N-dimetilglicina como metabólitos discriminantes entre os grupos (HOU et al., 2015).

Além disso, nestes estudos metabonômicos avaliando pacientes com infecção crônica pelo HBV, a análise destes metabólitos que apresentaram diferença significativa na caracterização da infecção, permite fornecer uma base para novas vias patogênicas e ideias para uma nova terapia antiviral direcionada (HOU; DUAN, 2016).

Em relação ao modelo HCV, semelhante ao modelo HBV, os pacientes com infectados também apresentaram escores negativos na OPLS-DA. A discriminação neste grupo foi associada a PC2, e os deslocamentos químicos mais relevantes foram os sinais entre δ 3,28 e 3,88 ppm, associados à fenilalanina e à glicose, além dos sinais atribuídos à creatinina (δ 3,04 ppm), glutamato (δ 2,36 ppm), e espécies aromáticas e insaturadas (δ 6,8-8,0 ppm).

Consequentemente, as concentrações aumentadas de fenilalanina, glicose, creatinina e glutamato resultaram em um aumento no escore de PC2 e, como apresentaram *loadings* positivos, resultaram em escores positivos da OPLS-DA, levando a amostra a ser classificada como grupo controle. No entanto, a concentração elevada de espécies aromáticas e insaturadas levou a uma diminuição no escore de PC2, uma vez que estas apresentaram *loadings* negativos e, portanto, a escores negativos da OPLS-DA. Assim, o grupo de infectados pelo HCV apresentou maiores níveis séricos de espécies aromáticas e insaturadas e menores níveis de aminoácidos, quando comparados com o grupo controle.

De fato, em relação às complicações da doença hepática crônica causadas pelo HCV, Sands et al. identificaram a presença de alterações no metabolismo de aminoácidos e lipídios ao analisarem amostras de plasma por RMN de ^1H de pacientes com infecção crônica pelo HCV. Os autores relataram também níveis elevados do aminoácido aromático tirosina (δ 6,87 ppm) em pacientes com fibrose avançada, e ainda níveis reduzidos de alanina (δ 1,48 ppm), no entanto identificaram maiores níveis de fenilalanina (δ 7,32 ppm) e LDL (δ 0,82 ppm) em pacientes com fibrose moderada quando comparados ao grupo de controles saudáveis (SANDS et al., 2015).

Embade et al., além de identificarem alterações no metabolismo de aminoácidos e lipídios em amostras de plasma de pacientes com infecção crônica pelo HCV, utilizando RMN de ^1H , encontraram ainda alterações no metabolismo de carboidratos. Pacientes com cirrose induzida pelo HCV apresentaram níveis reduzidos de acetoacetato (δ 2,30 ppm) e demais carboidratos, e dos aminoácidos glutamina (δ 2,46 ppm) e glutamato (δ 2,37 ppm). No entanto, diferente do nosso estudo, os autores identificaram menores níveis de colina (δ 3,22 ppm) e lipídios, como o LDL (δ 0,84 ppm), enquanto o grupo controle, sem fibrose, apresentou maiores níveis de creatinina (δ 3,05 ppm) e creatina (δ 3,06 ppm) (EMBADE et al., 2016).

Para o modelo de infecção viral *versus* controle, as PC1 e PC2 foram as componentes mais importantes, com as amostras do grupo de infecção viral

apresentando scores positivos da OPLS-DA. A região atribuída a carboidratos e espécies insaturadas (δ 5,2 e 6,4 ppm) mostrou-se importante para PC1, enquanto para PC2, os sinais mais relevantes foram semelhantes ao modelo HCV *versus* controle, com sinais associados a fenilalanina e glicose (δ 3,28 e 3,88 ppm), creatinina (δ 3,04 ppm) e glutamato (δ 2,36 ppm). Assim, pacientes com hepatite viral B ou C apresentaram maiores níveis séricos de carboidratos e espécies insaturadas, aminoácidos e creatinina, quando comparados com indivíduos saudáveis.

Em relação ao modelo comparando as duas infecções, observou-se maior importância da PC1 e PC8, com as amostras do grupo de infectados pelo HCV apresentando scores positivos da OPLS-DA. Semelhante ao modelo de infecção viral *versus* controle, a região atribuída a carboidratos e espécies insaturadas (δ 5,2 e 6,4 ppm) mostrou-se importante para PC1, enquanto os sinais mais relevantes para PC8 encontraram-se entre δ 4,12-4,16 ppm, os quais foram associados a prolina e ao 3-hidroxibutirato. Além disso, a PC1 também foi associada aos sinais relacionados aos aminoácidos prolina (δ 1,96 ppm) de aspartato (δ 2,68 ppm) e asparagina (δ 2,96 ppm), ainda que com *loadings* negativos.

Consequentemente, o aumento das concentrações de carboidratos e espécies insaturadas contribuíram para um aumento no escore de PC1, enquanto o aumento na concentração de prolina e 3-hidroxibutirato resultaram em aumento no escore de PC8, e, como apresentaram *loadings* positivos, resultaram em escores positivos da OPLS-DA, levando a amostra a ser classificada no grupo de infectados pelo HCV. No entanto, a concentração elevada de aminoácidos levou a uma diminuição no escore de PC1, e uma vez que estas apresentaram *loadings* negativos, resultou em escores negativos da OPLS-DA, levando a amostra a ser classificada no grupo de infectados pelo HBV. Assim, o grupo de infectados pelo HCV apresentou maiores níveis séricos de carboidratos e espécies insaturadas, prolina e 3-hidroxibutirato, enquanto pacientes com infecção pelo HBV apresentaram maiores níveis de aminoácidos. Isso corrobora os dados apresentados na Tabela 1, mostrando que os níveis de glicose são maiores no grupo de infectados pelo HCV.

Em relação ao desempenho dos quatro modelos OPLS-DA construídos, o modelo comparando pacientes com infecção viral e controles apresentou melhor especificidade (97,6%), enquanto o modelo comparando pacientes infectados pelo HBV e HCV apresentou melhor sensibilidade (93,4%) na discriminação dos grupos. Além disso, quando cada infecção viral foi comparada ao grupo controle, observou-se

melhor especificidade para o modelo HCV (97,6%) e melhor sensibilidade (95,7%) para o modelo HBV.

Vários estudos metabonômicos foram realizados para avaliar mudanças metabólicas durante a infecção crônica pelo HBV ou HCV (GODOY et al., 2010; HOU; DUAN, 2016; YUE et al., 2016), cirrose relacionada ao HBV ou HCV (WANG et al., 2012) e carcinoma hepatocelular (HCC) (LADEP et al., 2014). No entanto, ainda que algumas pesquisas tenham tentado encontrar novos biomarcadores sensíveis e específicos, principalmente envolvendo o metabolismo energético, e de proteínas e lipídios, ainda não existem biomarcadores uniformes descritos na literatura, sendo necessário um número maior de estudos clínicos para avaliar esses marcadores (SCHOEMAN et al., 2016; YU et al., 2017; ZHENG et al., 2017).

Além disso, estudos adicionais utilizando amostras de pacientes de diferentes regiões do Brasil e do mundo permitiriam a realização de uma validação externa e realização das etapas de validação de testes diagnósticos de fase III e IV dos modelos metabonômicos, para que estes sejam amplamente usados no diagnóstico das hepatites B e C em diferentes populações.

Desta forma, neste estudo foi possível a construção de modelos metabonômicos capazes de, com um único espectro de RMN de ^1H do soro, diagnosticar a infecção crônica pelos vírus das hepatites B e C, distinguir a infecção de acordo com o tipo de vírus relacionado (HBV ou HCV), além de indicar a classe de compostos (metabólitos) associada à discriminação. Sendo assim, a estratégia metabonômica se apresenta como um promissor método complementar na avaliação clínica e investigação das hepatites B e C.

REFERÊNCIAS

BATISTA, A. D. et al. Proton nuclear magnetic resonance-based metabonomic models for non-invasive diagnosis of liver fibrosis in chronic hepatitis C: Optimizing the classification of intermediate fibrosis. **World Journal of Hepatology**, v. 10, n. 1, p. 105–115, 2018.

BECKONERT, O. et al. Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. **Nature Protocols**, v. 2, n. 11, p. 2692–2703, jan. 2007.

COREY, K. E. et al. Acute hepatitis C infection lowers serum lipid levels. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 18, n. 7, p. 1–13, 2011.

DOR-MOHAMMADI, T. et al. Relationship between serum alanine aminotransferase levels and liver histology in chronic hepatitis C-infected patients. **Indian Journal of Gastroenterology**, v. 24, n. 2, p. 49–51, 2005.

EASL. EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF THE LIVER. EASL recommendations on treatment of hepatitis C 2016. **Journal of Hepatology**, v. 66, n. 1, p. 153–194, 2016.

EASL. EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF THE LIVER. EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection. **Journal of Hepatology**, v. 67, n. 0, p. 370–398, 2017.

EMBADE, N. et al. Metabolic characterization of advanced liver fibrosis in HCV patients as studied by serum ¹H-NMR spectroscopy. **PLoS ONE**, v. 11, n. 5, p. 1–19, 2016.

FELMLEE, D. J. et al. Hepatitis C virus, cholesterol and lipoproteins - Impact for the viral life cycle and pathogenesis of liver disease. **Viruses**, v. 5, n. 5, p. 1292–1324, 2013.

FUSEGAWA, H. et al. Platelet activation in patients with chronic hepatitis C. **Tokai Journal of Experimental & Clinical Medicine**, v. 27, n. 4, p. 101–106, 2002.

GIANNINI, E. G.; TESTA, R.; SAVARINO, V. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. **Canadian Medical Association Journal**, v. 172, n. 3, p. 367–379, 2005.

GODOY, M. M. G. et al. Hepatitis C virus infection diagnosis using metabonomics. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 17, p. 854–858, dez. 2010.

GOUVEIA, L. R. et al. Diagnosis of coinfection by schistosomiasis and viral hepatitis B or C using ¹H NMR-based metabonomics. **PloS ONE**, v. 12, n. 8, p. e0182196, 2017.

HOU, Q.; DUAN, Z. J. Metabonomic window into hepatitis B virus-related hepatic diseases. **World Journal of Hepatology**, v. 8, n. 1, p. 1–8, 2016.

HOU, Y. et al. [Exploration on serum metabolic biomarkers of hepatitis B virus infected patients based on gas chromatography-mass spectrometry]. **Se pu: Chinese Journal of Chromatography**, v. 33, n. 4, p. 383–388, 2015.

IRSHAD, M.; MANKOTIA, D. S.; IRSHAD, K. An insight into the diagnosis and pathogenesis of hepatitis C virus infection. **World Journal of Gastroenterology**, v. 19, n. 44, p. 7896–7909, 2013.

LADEP, N. G. et al. Discovery and validation of urinary metabolotypes for the diagnosis of hepatocellular carcinoma in West Africans. **Hepatology**, v. 60, n. 4, p. 1291–1301, out. 2014.

LENZ, E. M.; WILSON, I. D. Analytical Strategies in Metabonomics. **Journal of Proteome Research**, v. 6, p. 443–458, 2007.

NICHOLSON, J. K. et al. Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function. **Nature Reviews**, v. 1, n. February, p. 153–161, 2002.

NIELSEN, N. S. et al. Impaired platelet aggregation and rebalanced hemostasis in patients with chronic hepatitis C virus infection. **International Journal of Molecular**

Sciences, v. 18, n. 5, p. 1–13, 2017.

PEREIRA, L. M. M. B. et al. **Estudo de prevalência de base populacional das infecções pelos vírus das hepatites A, B e C nas capitais do Brasil**. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2010.

PEREIRA, L. M. M. B. et al. Prevalence and risk factors of Hepatitis C virus infection in Brazil, 2005 through 2009: a cross-sectional study. **BMC Infectious Diseases**, v. 13, n. 60, p. 1–12, 2013.

SACKETT, D. L.; HAYNES, R. B. Evidence base of clinical diagnosis: the architecture of diagnostic research. **British Medical Journal**, v. 324, n. March, p. 539–541, 2002.

SAEED, U.; WAHEED, Y.; ASHRAF, M. 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**, v. 4, n. 2, p. 88–96, 2014.

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

SCHOEMAN, J. C. et al. Metabolic characterization of the natural progression of chronic hepatitis B. **Genome Medicine**, v. 8, n. 64, p. 1–13, 2016.

VILLAR, L. M. et al. Update on hepatitis B and C virus diagnosis. **World Journal of Virology**, v. 4, n. 4, p. 323–342, 2015.

WANG, X. et al. Urinary metabolite variation is associated with pathological progression of the post-hepatitis B cirrhosis patients. **Journal of Proteome Research**, v. 11, n. 7, p. 3838–3847, 2012.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines on Hepatitis B and C Testing**. Geneva: World Health Organization, 2017.

WONG, R. J. et al. Significant Hepatic Fibrosis Among Treatment-Naive Chronic Hepatitis B Virus With Increased Hepatitis B Virus DNA and Normal Alanine Aminotransferase. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 16, n. 1, p. 146–148, 2017.

XIA, J.; WISHART, D. S. Using metaboanalyst 3.0 for comprehensive metabolomics data analysis. **Current Protocols in Bioinformatics**, v. 55, n. 14, p. 14.10.1-14.10.91, 2016.

YU, M. et al. Metabonomics Research Progress on Liver Diseases. **Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 2017, n. Article ID 8467192, p. 1–10, 2017.

YUE, D. et al. Hepatitis B virus X protein (HBx)-induced abnormalities of nucleic acid metabolism revealed by (1)H-NMR-based metabonomics. **Scientific Reports**, v. 6, n. 24430, p. 1–13, 2016.

ZHENG, H. et al. Metabolic characterization of hepatitis B virus-related liver cirrhosis using NMR-based serum metabolomics. **Metabolomics**, v. 13, n. 10, p. 1–9, 2017.

5.2 ARTIGO 2 – A utilização da metabonômica na identificação de alterações na atividade das enzimas hepáticas em pacientes com infecção crônica pelos vírus das hepatites B ou C (versão em inglês - Apêndice C).

INTRODUÇÃO

Os altos níveis de atividade das enzimas hepáticas alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e gamma-glutamil transferase (GGT) são preditivos de doença hepática e podem refletir lesões nos hepatócitos, incluindo uma ampla gama de etiologias, como hepatites virais, ou doença hepática gordurosa, alcoólica ou tóxica (SOOKOIAN et al., 2015; VAN BEEK et al., 2013) mesmo em pacientes assintomáticos (VERSLYPE, 2004).

Assim, a avaliação da atividade destas enzimas hepáticas ainda é o teste mais frequentemente utilizado na prática clínica para avaliar lesão dos hepatócitos (SOOKOIAN et al., 2015), mesmo que estes exames não sejam capazes de distinguir as diferentes etiologias (FORNACIARI et al., 2014; SOOKOIAN et al., 2015). Além disso, os níveis séricos das enzimas hepáticas são variáveis, e, às vezes, podem ser subestimados, já que nos anos 70, quando pacientes saudáveis foram recrutados para estabelecer os valores normais, pacientes com doença hepática subclínica, como hepatite C crônica ou doença hepática não alcoólica poderiam ter sido incluídos (GIANNINI; TESTA; SAVARINO, 2005; LOPES et al., 2006).

Em pacientes com hepatite B ou C crônica, o monitoramento dos níveis séricos de aminotransferases mostra-se importante na caracterização da atividade e do estágio da doença hepática, bem como nas decisões de terapias antivirais. De fato, a capacidade de estimar com exatidão os níveis séricos de AST e ALT é essencial para calcular índices não invasivos para identificar fibrose avançada, como o índice da relação aspartato aminotransferase sobre plaquetas (APRI) e o índice de fibrose baseado em quatro fatores (FIB-4), (WHO, 2015).

Em paralelo, a crescente utilização das ferramentas ômicas tem mudado a concepção clássica de que as aminotransferases são meramente indicadores de ruptura da membrana dos hepatócitos, e tem dado lugar a uma visão mais complexa da importância dessas enzimas na regulação da função metabólica sistêmica (SOOKOIAN et al., 2015). Portanto, técnicas de diagnóstico mais precisas e sensíveis são necessárias, e a metabonômica, como uma das técnicas ômicas bem

estabelecidas, funciona como ferramenta para investigar doenças em seres humanos (BALOG et al., 2011).

Assim, esta estratégia pode ser usada quando há interesse em classificar amostras pelo seu estado bioquímico, seja como resultado de uma doença ou outro fator que provocou alteração no perfil dos metabólitos endógenos (NICHOLSON et al., 2002). A metabonômica associada à espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) e à análise estatística multivariada permite não apenas a classificação da amostra, mas também uma interpretação efetiva das vias metabólicas e identificação de possíveis biomarcadores (BALOG et al., 2011). Esta técnica oferece ainda uma análise minimamente invasiva e com apenas uma amostra de soro seria possível avaliar uma série de infecções, como hepatite C (GODOY et al., 2010), coinfeção entre esquistossomose e hepatite B ou C (GOUVEIA et al., 2017), HIV (SITOLE; WILLIAMS; MEYER, 2012) e fibrose hepática (BATISTA et al., 2018; EMBADE et al., 2016; SANDS et al., 2015).

Dessa forma, o objetivo deste estudo foi identificar alterações dos níveis séricos das enzimas hepáticas (ALT, AST e GGT) em pacientes com infecção crônica pelo HBV ou HCV, em uma mesma amostra, através de modelos metabonômicos baseados em RMN de ^1H .

MÉTODOS

Pacientes e coleta das amostras

Este estudo transversal de validação fase I/II (SACKETT; HAYNES, 2002) incluiu 203 pacientes adultos, 104 mulheres (51,2%) e 99 homens (48,8%) com idade entre 18 e 83 anos ($46,9 \pm 15,4$), atendidos no período de outubro de 2012 a setembro de 2016, no ambulatório de Hepatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco. Desses 203 pacientes, 117 (57,6%) foram previamente diagnosticados com monoinfecção crônica pelo HBV (HBsAg e anti-HBc reagentes por mais de 6 meses e HBV-DNA detectável no plasma) e 86 (42,4%) pelo HCV (anti-HCV reagente por mais de 6 meses e HCV-RNA detectável no soro).

As amostras de sangue total foram imediatamente processadas para obtenção do soro. Parte das amostras foi armazenada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior obtenção dos espectros por RMN de ^1H , e outra parte para realização dos exames laboratoriais.

Pacientes submetidos a qualquer tratamento antiviral, utilizando imunossupressores, coinfectados com HIV e/ou HBV/HCV e/ou esquistossomose foram excluídos do estudo.

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CCS-UFPE), Recife, Brasil (Número de protocolo: 1.782.771/2016) e todos os pacientes eram adultos e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

Avaliação da atividade das enzimas hepáticas e demais exames laboratoriais

Os exames de atividade sérica da ALT, AST e GGT, e as demais análises de avaliação hepática (albumina, INR, bilirrubina total e direta), perfil lipídico (colesterol total, HDL-C, LDL-C e triglicerídeos), e glicemia foram realizados utilizando kits *Wiener Lab®* em equipamento de automação *Wiener Lab®* (*Wiener Lab Group*). A quantificação de plaquetas foi realizada através do equipamento de automação para hematologia *Pentra 120®* (*Horiba ABX Diagnostics*), e a determinação do INR utilizando analisador *ACL TOP 500®* (*Werfen company*), conforme o fabricante.

Os níveis de atividade enzimática obtidos foram então transformados em valores normalizados (atividade enzimática em U/L dividida pelo limite superior da normalidade), de acordo com as instruções do fabricante: para ALT < 41 U/L (homens) e < 31 U/L (mulheres), para AST < 38 U/L (homens) e < 32 U/L (mulheres), e para GGT < 50 U/L (homens) e < 32 U/L (mulheres). Posteriormente, estes pacientes foram estratificados em grupos de acordo com o limite superior da normalidade (LSN) (VERSLYPE, 2004) e com os níveis de atividade enzimática elevada (>1 vez o LSN) ou níveis normais ($\leq$ 1 vez o LSN).

Análise de RMN de ^1H

Para análise de RMN, foram adicionados 400 μL de soro a 200 μL de água deuterada (Óxido de deutério, D 99.9%, Cambridge Isotope Laboratories, Inc., Tewksbury, USA), utilizando tubos de RMN de 5 mm. Todos os espectros de RMN de ^1H obtidos através do espectrômetro *VARIAN Unity Plus 300 MHz* (Varian Inc., Palo Alto, USA), utilizando o lactato como referência interna de deslocamento químico (δ 1,342 ppm). Durante a aquisição do espectro de RMN de ^1H , utilizou-se uma sequência de pulsos com pré-saturação (PRESAT) do sinal de água com a divisão de

pulsos Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG), que foi empregado como um filtro de T₂. Foi utilizada uma janela espectral de 4,8 kHz, atraso de saturação de 2,0 s, tempo de aquisição de 1,704 s, pulso de RF de 90 °C, temperatura de 25 °C, 88 ciclos, tau igual a 0,0004 s, bigtau igual a 0,07 s, 128 varreduras e apodização de 0,3 Hz. As correções de fase e de linha de base foram corrigidas manualmente. Utilizando o *software* *MestreNova* 9.0, a região entre δ 8,0 e 0,04 ppm foi reduzida para 183 regiões espectrais (bins) com 0,04 ppm de amplitude, excluindo a região entre δ 5,16 e 4,52 ppm, para eliminar o sinal de água.

Análises estatísticas

Após a construção dos bins, foi obtida uma matriz contendo 203 casos (linhas) e 187 variáveis (colunas). Destas 187 variáveis, 183 colunas referiram-se ao espectro de RMN de ¹H, 1 coluna à identificação clínica do paciente (HBV ou HCV) e 3 colunas à classificação da atividade das enzimas hepáticas ALT, AST e GGT (normal ou alterada). A partir dessa matriz foram originadas todas as matrizes que foram submetidas ao pré-processamento e à análise estatística multivariada.

Assim, as matrizes obtidas foram analisadas utilizando a plataforma de processamento online *MetaboAnalyst* 3.6 (XIA; WISHART, 2016). Na etapa de pré-processamento, utilizou-se SNV (Variação Normal Padrão) nas amostras, e posteriormente, foi realizada uma análise de componentes principais (PCA) e a matriz de escores obtida foi usada como matriz de entrada para a Análise Discriminante Ortogonal por Mínimos Quadrados Parciais (OPLS-DA). A validação do modelo OPLS-DA baseou-se no teste de permutação com 2000 permutações da variável de classe.

O gráfico de escores da OPLS-DA foi utilizado para investigar se houve discriminação entre os grupos. Na sequência, as variáveis (componentes principais - PCs) foram projetadas, visando identificar quais foram as mais importantes para a discriminação. Uma vez identificadas, foi utilizado o gráfico de pesos (*loadings*) para identificar as regiões espectrais mais relevantes para aquelas PCs. Essas regiões foram comparadas com achados na literatura e com a base de dados do *Human Metabolome Database* (HMDB) (WISHART et al., 2009), visando identificar as classes de compostos associadas à discriminação.

Para avaliar a distribuição de dados demográficos e exames bioquímicos e de avaliação hepática entre os grupos foram realizados os testes t de *Student* não

pareado, Mann-Whitney, Exato de Fisher, e qui-quadrado, conforme apropriado, utilizando o software *GraphPad Prism 6* (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Foram considerados estatisticamente significantes os resultados com valor de p menor que 0,05.

Análise de desempenho do modelo metabonômico

Para cada modelo OPLS-DA, foi utilizada uma tabela de contingência 2x2 para calcular a sensibilidade (Sn), especificidade (Sp), razão de verossimilhança positiva (LR+), razão de verossimilhança negativa (LR-), acurácia (A) e intervalo de confiança de 95% (IC de 95%) para cada parâmetro.

A análise da razão de verossimilhança foi aplicada em vez dos valores preditivos, uma vez que não depende da prevalência do resultado para o qual o teste é usado. Utilizaram-se os seguintes parâmetros: LR+ acima de 10 indicando uma alta probabilidade da presença da alteração das enzimas hepáticas pós teste, e uma LR- abaixo de 0, indicando uma alta probabilidade de ausência da alteração das enzimas hepáticas pós teste.

RESULTADOS

Os níveis séricos de ALT em 88 (43,3%), AST em 89 (43,8%) e GGT em 98 (48,3%) pacientes com infecção crônica pelo HBV ou HCV apresentaram-se elevados em relação aos valores de referência.

A Tabela 1 mostra as características demográficas e exames bioquímicos e de avaliação hepática dos 203 pacientes com infecção pelo HBV ou HCV, de acordo com os níveis séricos aumentados *versus* normais para cada enzima. Foram encontradas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos com atividade enzimática alterada e normal, com exceção das variáveis gênero, INR, triglicerídeos, HDL-c e níveis de colesterol total.

De forma geral, quando uma das enzimas, ALT, AST ou GGT, apresentou níveis séricos acima do LSN, foi acompanhada por alterações de alguns testes de avaliação hepática e da glicemia, conforme a Tabela 1. Além disso, os níveis de atividade das enzimas ALT, AST e GGT foram aproximadamente 2,5 vezes maiores no grupo com enzimas alteradas, e com as variáveis idade, bilirrubina total, fosfatase alcalina (apenas em AST e GGT) e glicose apresentando valores maiores neste grupo. No entanto, os níveis de albumina em pacientes apenas com AST e GGT aumentadas,

LDL-c (apenas em GGT) e contagem de plaquetas (apenas em ALT e AST) foram ligeiramente maiores no grupo com enzimas normais.

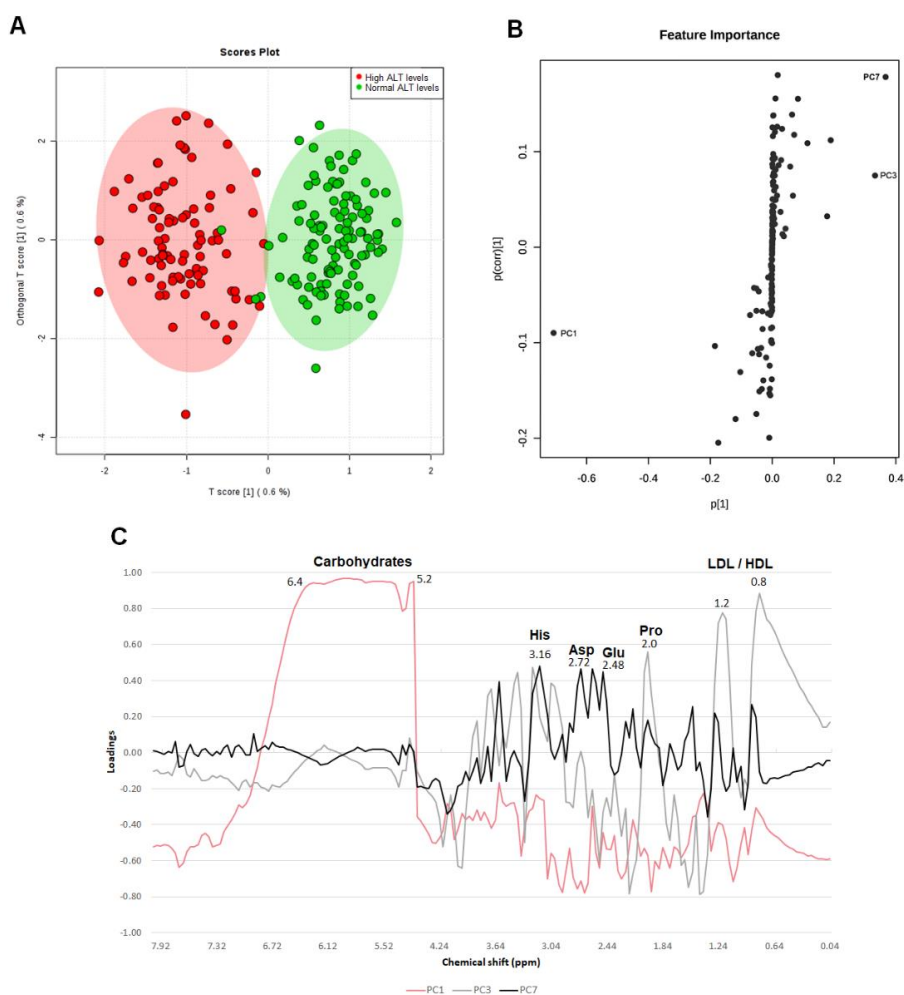
Tabela 1 - Características demográficas e exames bioquímicos e de avaliação hepática de 203 pacientes com infecção crônica pelo HBV ou HCV, de acordo com os níveis séricos aumentados ($>1\times$ LSN) *versus* normais ($\leq 1\times$ LSN) para as enzimas ALT de ALT, AST e GGT, em Recife/PE, no período de 2014 a 2016.

Características	ALT $>1\times$ LSN (n=88)		ALT $\leq 1\times$ LSN (n=115)		p
Gênero (M/F, n, %)	45/88	(51,1/48,9)	54/61	(47/53)	0,035 ^a
Idade (anos)*	52	$\pm 15,2$	43	$\pm 14,3$	$<0,001^b$
ALT (/LSN)	1,74	(1,27-2,95)	0,65	(0,51-0,80)	$<0,001^c$
AST (/LSN)	1,74	(1,13-2,66)	0,69	(0,57-0,86)	$<0,001^c$
GGT(/LSN)	1,69	(0,96-2,97)	0,69	(0,50-1,10)	$<0,001^c$
FA (/LSN)	1,25	(0,92-1,78)	1,18	(0,80-1,65)	0,213 ^c
Bilirrubina total (mg/dL)	0,64	(0,50-0,90)	0,50	(0,40-0,80)	0,011^c
Albumina (g/dL)	4,2	(3,9-4,5)	4,3	(4,1-4,4)	0,430 ^c
Plaquetas ($10^9/\text{mm}^3$)*	199	± 73	222	± 71	0,030^b
INR	1,13	(1,00-1,16)	1,07	(1,03-1,13)	0,697 ^c
Glicose (mg/dL)	91	(82-102)	84	(76-98)	0,007^c
Colesterol total (mg/dL)*	173,1	$\pm 40,7$	173,9	$\pm 43,2$	0,588 ^b
HDL-c (mg/dL)*	50,6	(41-60,5)	48,6	(42,3-59)	0,622 ^c
LDL-c (mg/dL)	96,5	$\pm 36,01$	102	$\pm 37,4$	0,743 ^b
Triglicerídeos (mg/dL)	99,5	(69,3-141,4)	116,8	(72-153)	0,994 ^c
	AST $>1\times$ LSN (n=89)		AST $\leq 1\times$ LSN (n=114)		
Gênero (M/F, n, %)	40/49	(44,9/55,1)	59/55	(51,8/48,2)	0,335 ^a
Idade (anos)*	54,8	$\pm 14,3$	40,8	$\pm 13,2$	$<0,001^b$
ALT (/LSN)	1,71	(1,11-2,86)	0,66	(0,51-0,86)	$<0,001^c$
AST (/LSN)	1,74	(1,24-2,59)	0,68	(0,57-0,81)	$<0,001^c$
GGT(/LSN)	1,69	(0,96-3,00)	0,67	(0,50-1,10)	$<0,001^c$
FA (/LSN)	1,29	(0,98-1,87)	1,13	(0,80-1,48)	0,011^c
Bilirrubina total (mg/dL)	0,60	(0,50-1,00)	0,50	(0,40-0,80)	0,009^c
Albumina (g/dL)	4,2	(3,8-4,4)	4,3	(4,1-4,5)	0,003^c
Plaquetas ($10^9/\text{mm}^3$)*	194	± 74	226	± 68	0,002^b
INR	1,06	(1,00-1,14)	1,08	(1,02-1,14)	0,412 ^c
Glicose (mg/dL)	91	(82-102)	85	(76,2-98)	0,027^c
Colesterol total (mg/dL)*	171,6	$\pm 44,5$	175,1	$\pm 40,04$	0,591 ^b
HDL-c (mg/dL)*	50,6	(43,8-60,5)	47,7	(41-58,8)	0,138 ^c
LDL-c (mg/dL)	94,7	$\pm 37,25$	103,6	$\pm 36,05$	0,122 ^b
Triglicerídeos (mg/dL)	95,4	(68,1-141,4)	94,8	(72,6-153)	0,745 ^c
	GGT $>1\times$ LSN (n=98)		GGT $\leq 1\times$ LSN (n=105)		
Gênero (M/F, n, %)	43/55	(43,9/56,1)	56/105	(53,3/46,7)	0,144 ^a
Idade (anos)*	51	$\pm 15,1$	43,1	$\pm 14,7$	$<0,001^b$
ALT (/LSN)	1,32	(0,81-2,52)	0,72	(0,51-1,00)	$<0,001^c$
AST (/LSN)	1,29	(0,85-2,34)	0,73	(0,59-1,00)	$<0,001^c$
GGT(/LSN)	1,83	(1,32-3,00)	0,59	(0,48-0,79)	$<0,001^c$
FA (/LSN)	1,34	(0,95-1,91)	1,13	(0,78-1,43)	0,007^c
Bilirrubina total (mg/dL)	0,60	(0,50-0,80)	0,60	(0,40-0,80)	0,280 ^c
Albumina (g/dL)	4,2	(3,9-4,4)	4,3	(4,1-4,5)	0,002^c
Plaquetas ($10^9/\text{mm}^3$)*	204	± 77	219	± 67	0,147 ^b
INR	1,07	(1,00-1,14)	1,07	(1,02-1,13)	0,991 ^c
Glicose (mg/dL)	91	(81,4-101,5)	84,2	(76-96,2)	0,007^c
Colesterol total (mg/dL)*	166,9	$\pm 44,8$	179,4	$\pm 38,7$	0,051 ^b
HDL-c (mg/dL)*	48	(40-60)	51	(42,8-59,5)	0,820 ^c
LDL-c (mg/dL)	91,5	$\pm 36,7$	106,7	$\pm 35,5$	0,008^b
Triglicerídeos (mg/dL)	104,5	(70,6-147,3)	91,8	(71,1-144,1)	0,378 ^c

^aTeste de qui-quadrado; ^bTeste *t* não pareado; ^cTeste de Mann-Whitney; ^dTeste Exato de Fisher. Dados apresentados como valores medianos (intervalo interquartil entre parênteses), exceto aqueles marcados com um asterisco (*) que foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Os valores de *P* em negrito indicam as categorias que diferem significativamente entre os grupos. **ALT**: alanina aminotransferase; **AST**: aspartato aminotransferase; **FA**: fosfatase alcalina; **GGT**: gamma-glutamil transferase; **HDL-c**: lipoproteína de alta densidade - colesterol; **INR**: INR: Razão normalizada internacional; **LDL-c**: lipoproteína de baixa densidade - colesterol; **LSN**: limite superior da normalidade.

Para avaliar a alteração da atividade das enzimas hepáticas, foram construídos três modelos OPLS-DA (ALT, AST e GGT) a partir das amostras de soro de pacientes monoinfectados crônicos pelo HBV (n=117) ou pelo HCV (n=86), independentemente do tipo de vírus relacionado à infecção. Na Figura 1, observa-se o resultado do modelo OPLS-DA construído para identificar alteração na atividade da enzima ALT, enquanto na figura 2, observa-se o resultado do modelo comparando amostras de pacientes com atividade da enzima AST aumentada e normal.

Figura 1 - Resultado do modelo OPLS-DA comparando amostras de pacientes com a atividade da enzima ALT aumentada e normal, em 203 infectados pelo HBV ou HCV, em Recife/PE, no período de 2014 a 2016. (A) Gráfico de escores bidimensional; (B) Gráfico de importância das componentes principais; (C) Gráfico de loadings das componentes principais selecionadas.



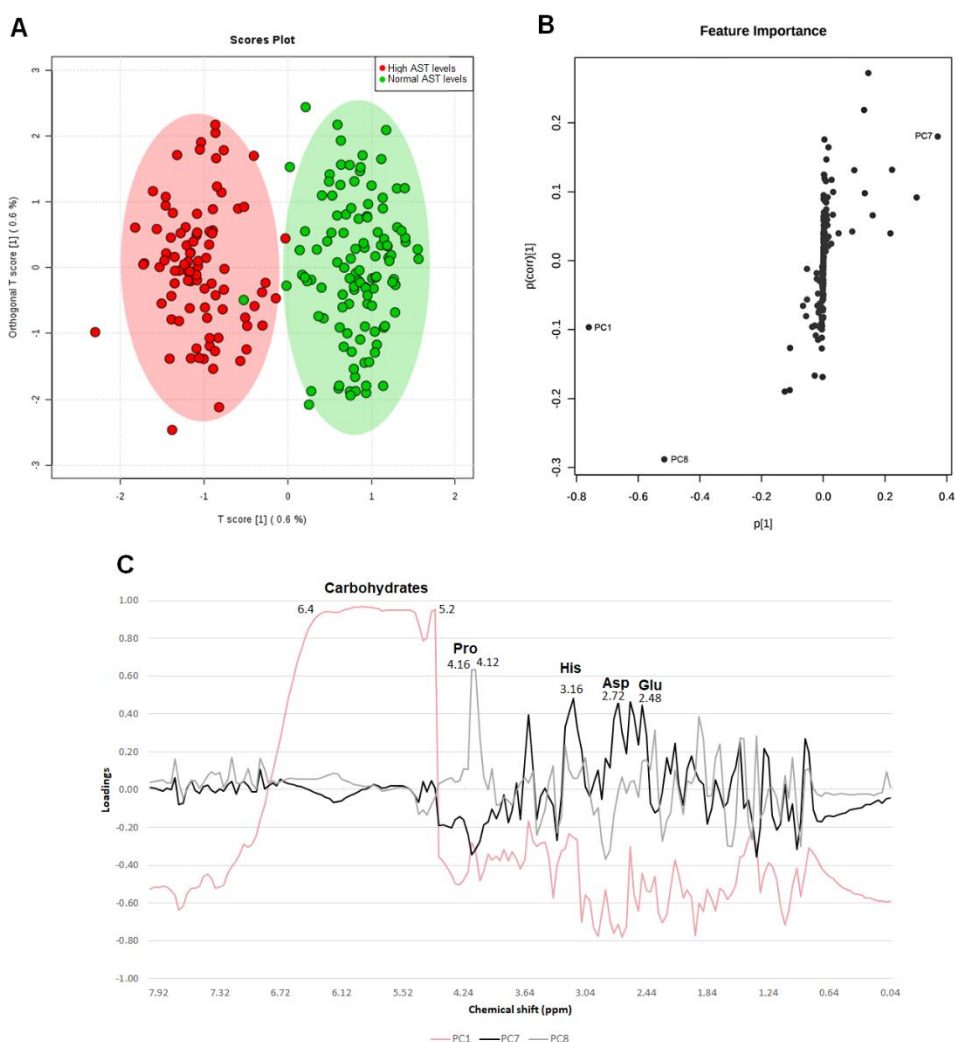
Legenda: Asp: aspartato; Glu: glutamato; HDL: lipoproteína de alta densidade; His: Histidina; LDL-c: lipoproteína de baixa densidade; Pro: prolina.

Os gráficos de escores da OPLS-DA para os dois modelos (Figura 1A e 2A) mostram clara discriminação entre os grupos (ALT aumentada *versus* normal; AST aumentada *versus* normal).

De acordo com o gráfico que mostra a importância das variáveis para a discriminação, observou-se no modelo ALT que a discriminação entre os grupos ocorreu principalmente por PC1, PC3 e PC7 (Figura 1B). A PC1 foi influenciada fortemente pela região espectral entre δ 5,2 e 6,4 ppm, a qual encontra-se associada a carboidratos e espécies insaturadas, como carboidratos, à medida que PC3 foi influenciada pelos deslocamentos δ 0,8 e 1,2 ppm, ambos associados à cadeia alquílica de HDL e LDL e por δ 2,0 ppm, associada à prolina. Para PC7, observou-se influência do sinal δ 3,16 ppm associado à histidina, e a região entre δ 2,48 e 2,72 ppm, associada à glutamina e ao ácido N-acetilaspártico, um derivado do ácido aspártico (Figura 1C).

Em relação ao modelo AST, observou-se discriminação dos grupos associada à PC1, PC7 e PC8 (Figura 2B). De forma semelhante ao modelo ALT, foi identificada forte contribuição da região associada a carboidratos e espécies insaturadas (δ 5,2 e 6,4 ppm), e aminoácidos (δ 3,16 ppm, δ 2,48-2,72 ppm) para PC7. Para PC8, os sinais entre δ 4,12-4,16 ppm foram associados aa prolina e ao 3-hidroxibutirato (Figura 2C). Em relação ao modelo GGT (Apêndice E, Figura 1), as PC4, PC7 e PC8 foram associadas à discriminação, ainda que com resultados menos satisfatórios na discriminação entre os grupos.

Figura 2 - Resultado do modelo OPLS-DA comparando amostras de pacientes com a atividade da enzima AST aumentada e normal, em 203 infectados pelo HBV ou HCV, em Recife/PE, no período de 2014 a 2016. (A) Gráfico de escores bidimensional; (B) Gráfico de importância das componentes principais; (C) Gráfico de loadings das componentes principais.



Legenda: Asp: aspartato; Glu: glutamato; His: Histidina; Pro: prolina.

A Tabela 2 mostra a matriz de classificação dos modelos OPLS-DA. Para o modelo comparando a atividade das enzimas hepáticas aumentadas e normais, esta classificação apresentou melhor desempenho para o modelo AST com Sn de 95,5%, Sp de 96,5%, valores de LR+ e LR- de 27,2 e 0,05, respectivamente, indicando que a chance de o modelo detectar corretamente a alteração da AST é 27,2 vezes maior que nos pacientes com AST normal, com uma probabilidade de 96,4% de identificar a alteração pós teste. Seguido pelo modelo ALT, com Sn de 95,4%, Sp de 93,9%, LR+ de 15,7 e LR- de 0,05. O modelo GGT apresentou Sn de 90,8%, Sp 95,2%, LR+ de 19,1 e LR- de 0,09.

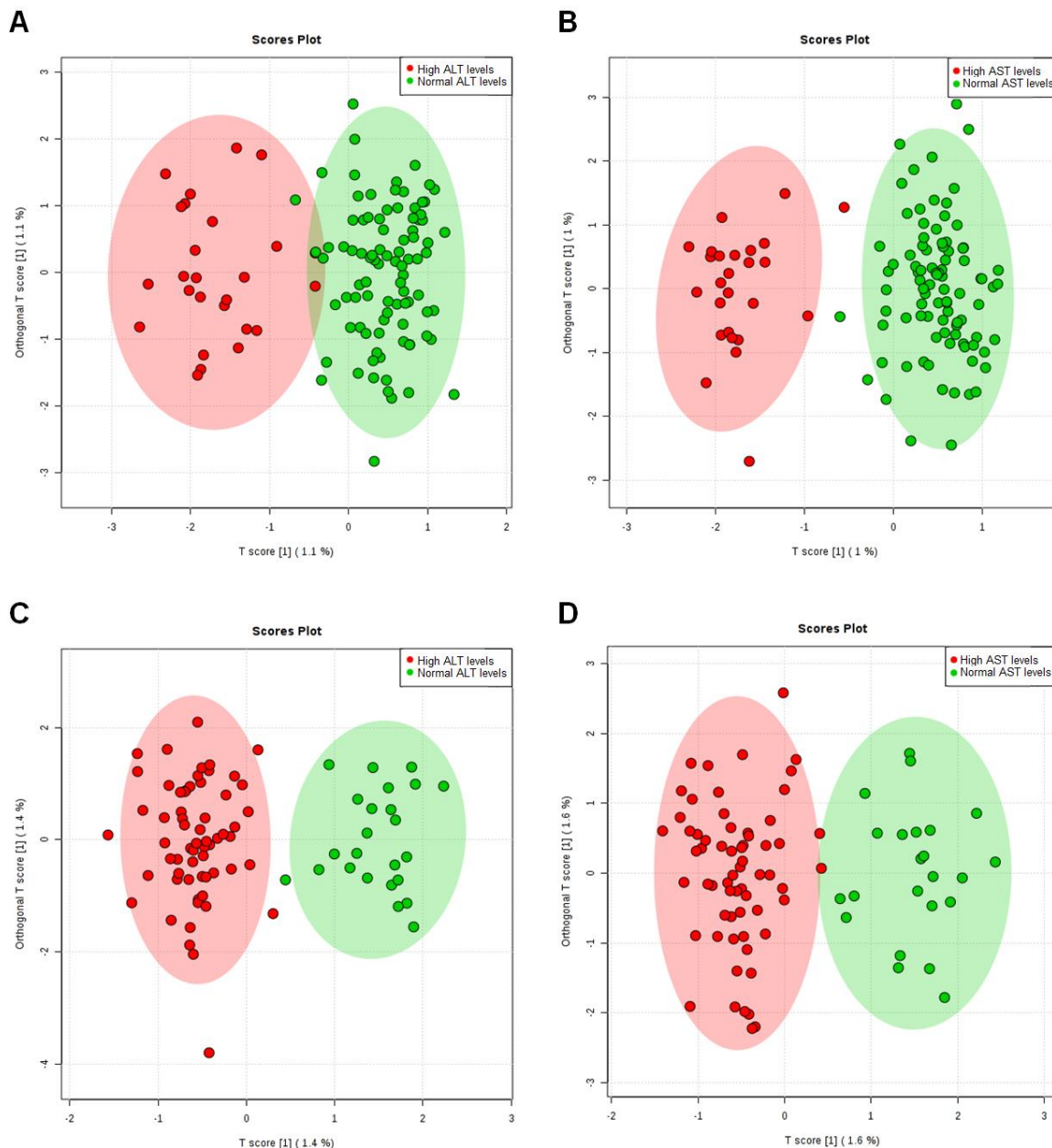
Tabela 2 – Desempenho dos modelos metabonômicos OPLS-DA para identificar níveis séricos elevados das enzimas ALT, AST e GGT em pacientes com infecção crônica pelo HBV ou HCV, em Recife/PE, no período de 2014 a 2016.

Níveis de atividade enzimática												
Modelo (N=203)	ALT		<i>p</i> ^a	Sensibilidade		Especificidade		LR+		LR-		A (%)
	>1,0	≤1,0		(%)	IC _{95%}	(%)	IC _{95%}	IC _{95%}	IC _{95%}	IC _{95%}		
>1,0	84	7	<0,001	95,4	88,8-98,8	93,9	87,9-97,5	15,7	7,6-32,2	0,05	0,02-0,13	94,6
≤1,0	4	108										
AST												
>1,0	85	4	<0,001	95,5	88,9-98,8	96,5	91,3-99	27,2	10,4-71,3	0,05	0,02-0,12	96,1
≤1,0	4	110										
GGT												
>1,0	89	5	<0,001	90,8	83,3-95,7	95,2	89,2-98,4	19,1	8,1-45	0,09	0,05-0,18	93,1
≤1,0	9	100										
Níveis de atividade enzimática em HBV												
Modelo (N=117)	ALT		<i>p</i> ^a	Sensibilidade		Especificidade		LR+		LR-		A (%)
	>1,0	≤1,0		(%)	IC _{95%}	(%)	IC _{95%}	IC _{95%}	IC _{95%}	IC _{95%}		
>1,0	25	8	<0,001	96,1	80,4-99,9	91,2	83,4-96,1	10,9	5,6-21,3	0,04	0,01-0,29	92,3
≤1,0	1	83										
AST												
>1,0	24	7	<0,001	92,3	74,9-99	92,3	84,8-96,9	12	5,8-24,7	0,08	0,02-0,32	92,3
≤1,0	2	84										
Níveis de atividade enzimática em HCV												
Modelo (N=86)	ALT		<i>p</i> ^a	Sensibilidade		Especificidade		LR+		LR-		A (%)
	>1,0	≤1,0		(%)	IC _{95%}	(%)	IC _{95%}	IC _{95%}	IC _{95%}	IC _{95%}		
>1,0	58	1	<0,001	93,6	84,3-98,2	95,8	78,9-99,9	22,4	3,3-153,1	0,07	0,03-0,17	94,2
≤1,0	4	23										
AST												
>1,0	60	0	<0,001	95,2	86,7-99,1	100	85,2-100	45,4 [*]	2,9-705,1	0,06 [*]	0,02-0,16	96,5
≤1,0	3	23										

^aTeste Exato de Fisher; *Valor estimado; A: Acurácia; LR+: Razão de verossimilhança positiva; LR-: Razão de verossimilhança negativa.

Uma vez que os modelos de atividade da ALT e AST apresentaram melhores resultados, eles foram utilizados na avaliação da discriminação em função do tipo de vírus relacionado à infecção: (1) ALT em HBV; (2) AST em HBV; (3) ALT em HCV; (2) AST em HCV. A Figura 3 apresenta os gráficos de escores da OPLS-DA comparando níveis aumentados e normais de atividade da ALT e AST, de acordo com o tipo de vírus relacionado à infecção, mostrando clara discriminação entre os grupos.

Figura 3 - Gráficos de escores bidimensional da OPLS-DA comparando a atividade das enzimas hepáticas aumentada e normal, estratificada pela infecção por HBV ou HCV, em Recife/PE, no período de 2014 a 2016. (A) Modelo ALT e (B) Modelo AST para 117 pacientes infectados crônicos pelo HBV. (C) Modelo ALT e (D) modelo AST para 86 pacientes infectados crônicos pelo HCV.



Em relação à importância das variáveis para a discriminação, observou-se que tanto para o modelo ALT aumentada *versus* normal, em pacientes infectados pelo HBV (Apêndice E, Figura 2) quanto para HCV (Apêndice E, Figura 3), a discriminação entre os grupos foi provocada principalmente por PC1, associada à carboidratos e espécies insaturadas (δ 5,2 e 6,4 ppm). Para o modelo ALT em pacientes com HBV, PC1 foi associada ainda aos sinais δ 1,96, 2,68 e 2,96 ppm relacionados à prolina,

aspartato e asparagina. Para o modelo ALT em pacientes com HCV observou-se ainda a influência da PC2 e PC4. PC4 foi influenciada pela região entre δ 4,24 e 4,48 ppm, associados à treonina. No sentido contrário, PC2 sofreu influência da região espectral entre δ 6,7 e 8,0 ppm, a qual se encontrou associada a espécies insaturadas e aromáticas, enquanto PC1 foi influenciada pelos sinais δ 2,72 e 3,08 ppm, relacionados à cisteína e ao ácido N-acetilaspártico.

Para o modelo AST aumentada *versus* normal em pacientes infectados pelo HBV (Apêndice E, Figura 4), observou-se discriminação dos grupos associada à PC1 e PC6. Da mesma forma, para PC1 foi identificada forte contribuição da região associada a carboidratos e espécies insaturadas, e para PC6, aos sinais δ 2,48 e 3,8 ppm, associados ao glutamato e à glicose, e no sentido contrário, ao sinal δ 1,84 ppm, relacionado à lisina. Quando avaliado o modelo AST em pacientes com HCV (Apêndice E, Figura 5), as PC mais importantes foram PC1, PC4 e PC6, com PC1 fortemente associada a carboidratos e espécies insaturadas, PC4 à região associada à treonina (δ 4,24 e 4,48 ppm), e PC6 influenciada pelos sinais δ 1,6, 2,24 e 2,84 ppm, relacionada aos aminoácidos arginina, valina e aspartato, respectivamente.

Em relação à matriz de classificação dos modelos OPLS-DA comparando a atividade de enzimas hepáticas aumentada e normal, estratificada pela infecção por HBV ou HCV (Tabela 2), observou-se melhor desempenho para o modelo ALT em pacientes com HBV, com Sn de 96,1%, Sp de 91,2%, LR+ de 10,9 e LR- de 0,04, quando comparado ao modelo para AST, indicando que a chance de o modelo detectar corretamente a alteração da ALT nos infectados pelo HBV é 10,9 vezes maior que nos pacientes com ALT normal, com uma probabilidade de 91,6% de identificar a alteração pós teste. Enquanto para os pacientes com HCV, o modelo de AST apresentou melhor desempenho com Sn de 95,2%, Sp de 100%, LR+ de 45,4 e LR- de 0,06, o que indica que a chance de o modelo detectar corretamente a alteração da AST nos infectados pelo HCV é 45,4 vezes maior que nos pacientes com AST normal, com uma probabilidade de 97,8% de identificar a alteração pós teste.

DISCUSSÃO

Os pacientes com níveis séricos aumentados de atividade das enzimas ALT, AST e GGT tinham idade mais avançada, e de uma forma geral, apresentaram níveis

mais elevados de alguns testes de avaliação hepática, como também de glicose, quando comparados aos pacientes com atividade enzimática normal.

Godoy et al. em um estudo piloto envolvendo espectroscopia de RMN de ^1H em amostras de urina para o diagnóstico de infecção por HCV, observaram alterações no perfil metabólico associadas à agressão hepática resultante da infecção pelo HCV, com níveis séricos das enzimas AST, ALT e GGT maiores no grupo de infectados (GODOY et al., 2010).

Os três modelos OPLS-DA construídos inicialmente no presente estudo foram capazes de discriminar pacientes com alteração na atividade das enzimas hepáticas, independentemente do tipo de vírus relacionado à infecção, ainda que os modelos ALT e AST tenham apresentado melhores resultados quando comparados ao modelo GGT. Embora a GGT seja encontrada no fígado e nas células epiteliais biliares, é considerada um marcador mais sensível para doenças das vias biliares ou agressões determinadas pelo álcool ou outras drogas, e não por vírus (PRATT; KAPLAN, 2000). Porém, os níveis de GGT podem ser encontrados acima do limite superior em cerca de 30% dos pacientes com infecção crônica pelo HCV (GIANNINI; TESTA; SAVARINO, 2005) e há uma variedade de isoformas da GGT que diferem no conteúdo e na estrutura dos carboidratos (TARGHER, 2010) com especificidade diferenciada no diagnóstico de doenças hepáticas (FORNACIARI et al., 2014).

Para os modelos ALT e AST, tanto independentemente, quanto de acordo com tipo de vírus relacionado à infecção, observou-se que as amostras de pacientes com aumento da atividade das enzimas hepáticas apresentaram escores negativos na OPLS-DA, com PC1 como a componente mais importante na discriminação.

Além disso, para o modelo ALT, independentemente do tipo de vírus relacionado à infecção, PC3 e PC7 também mostraram importância, enquanto PC2 e PC4 apresentaram influência no modelo ALT em pacientes com HCV. Para PC1, os deslocamentos químicos mais importantes encontraram-se associados a carboidratos e espécies insaturadas (δ 5,2 e 6,4 ppm), enquanto para PC3, os sinais centrados em δ 0,8 e 1,2 ppm mostraram-se relacionados a lipídios (HDL e LDL).

No modelo ALT em pacientes com HBV, PC1 mostrou ainda associação com regiões relacionadas aos aminoácidos prolina (δ 1,96 ppm), aspartato (δ 2,68 ppm) e asparagina (δ 2,96 ppm), enquanto os aminoácidos cisteína (δ 3,08 ppm) e ácido N-acetilaspártico (δ 2,72 ppm) foram associados ao modelo ALT em pacientes com HCV. Da mesma forma, PC4 e PC7 também se mostraram associadas a regiões de

aminoácidos, com PC4 relacionada à treonina (δ 4,24 ppm), e PC7 à histidina (δ 3,16 ppm), glutamina (δ 3,16 ppm) e ao ácido N-acetilaspártico (δ 2,72 ppm). PC2, no entanto, encontrou-se associada a espécies insaturadas e aromáticas (δ 6,7-8,0 ppm).

Assim, o aumento da concentração de carboidratos e espécies insaturadas resultaram em aumento dos escores de PC1 e conseqüentemente, em escores negativos na OPLS-DA, levando a amostra a ser classificada no grupo com aumento da atividade da ALT. No entanto, concentrações aumentadas de HDL, LDL, aminoácidos e espécies insaturadas e aromáticas resultaram em aumento dos escores de PC3, PC7 e PC2 e escores positivos na OPLS-DA, o que levou a amostra a ser classificada no grupo com atividade normal da ALT.

Portanto, os pacientes com alteração da atividade da ALT apresentaram maiores níveis séricos de carboidratos e menores níveis de HDL e LDL, aminoácidos e espécies insaturadas e aromáticas, quando comparados ao grupo com atividade normal da ALT. Esse resultado corrobora as características bioquímicas apresentadas na Tabela 1, já que os pacientes com atividade aumentada da ALT apresentaram aumento nos níveis de glicose e níveis mais baixos de LDL. Ainda que os níveis de LDL não tenham apresentado diferença estatística, foram suficientes para serem observados na discriminação dos modelos metabonômicos.

Em relação ao modelo AST, independentemente do tipo de vírus relacionado à infecção, PC7 e PC8 também apresentaram importância na discriminação. Semelhante ao modelo ALT, observou-se influência da presença de carboidratos e espécies insaturadas na PC1 (δ 5,2 e 6,4 ppm) para o grupo com AST alterada, e dos aminoácidos histidina (δ 3,16 ppm), glutamina (δ 3,16 ppm) e do ácido N-acetilaspártico (δ 2,72 ppm) na PC7.

De forma semelhante, para o modelo AST, de acordo com o tipo de vírus relacionado à infecção, além da PC1, a PC6 mostrou importância no modelo de pacientes infectados pelo HBV e a PC4 e PC6 em pacientes com HCV. Em ambos modelos foram identificadas associações com as regiões de aminoácidos na PC6, com sinais associados à arginina (δ 1,6 ppm), valina (δ 2,24 ppm), e aspartato (δ 2,84 ppm) no modelo AST em infectados pelo HBV, e ao glutamato (δ 2,48 ppm) e lisina (δ 1,84 ppm) em pacientes com HCV. Para o modelo AST em pacientes com HBV, observou-se ainda a contribuição de sinais associados à lisina (δ 1,84 ppm) e à glicose na PC6 (δ 2,48 ppm), enquanto em pacientes com HCV, identificou-se um sinal relacionado à treonina (δ 4.24 ppm) na PC4.

Dessa forma, semelhante ao modelo ALT, o aumento da concentração de carboidratos e espécies insaturadas resultaram em aumento dos escores de PC1. Além disso, tanto o aumento das concentrações de prolina e 3-hidroxibutirato em PC8, no modelo AST independentemente do tipo de vírus relacionado à infecção, quanto de treonina em PC4, e de aspartato, valina e arginina em PC6, no modelo AST em pacientes com HCV, resultaram em escores negativos na OPLS-DA, levando a amostra a ser classificada no grupo com aumento da atividade da AST. No entanto, concentrações reduzidas do aminoácido lisina resultaram em um aumento do escore de PC6, enquanto concentrações aumentadas de histidina, glutamina e ácido N-acetilaspártico resultaram em aumento do escore de PC7, e consequentemente escores positivos na OPLS-DA, o que levaram a amostra a ser classificada no grupo com AST normal.

Portanto, os pacientes com alteração da atividade da AST apresentaram maiores níveis séricos de carboidratos e dos aminoácidos prolina, aspartato, valina, arginina, e menores níveis dos aminoácidos histidina, glutamina e ácido N-acetilaspártico, quando comparados ao grupo com atividade normal da AST. Esse resultado corrobora as características bioquímicas apresentadas na Tabela 1, já que os pacientes com atividade alterada da AST apresentaram aumento nos níveis de glicose.

Com base no desempenho, os modelos AST e ALT foram mais adequados para diferenciar os pacientes com alterações da atividade sérica das enzimas hepáticas. Além disso, quando avaliados de acordo com o tipo de vírus relacionado à infecção, observou-se melhor performance para detecção de alteração da atividade da ALT no modelo construído com amostras de pacientes infectados pelo HBV, enquanto a alteração da atividade da AST foi detectada com melhor desempenho no modelo em infectados pelo HCV.

Isso pode ser explicado pelo fato de que existem duas isoformas humanas da ALT e AST, uma citoplasmática e outra mitocondrial, com papel biológico divergente no contexto da patogênese aguda ou crônica da doença hepática. No fígado, a ALT é predominante no citoplasma, sendo associada a danos mais leves nos hepatócitos, como é caso da maior parte dos pacientes com infecção crônica pelo HBV avaliados neste estudo, que se encontravam na fase de portador inativo, com HBeAg não reagente, níveis normais de ALT, e HBV-DNA inferiores a 2000 UI /mL. A AST, no entanto, encontra-se localizada principalmente na mitocôndria, indicando uma lesão

mais severa dos hepatócitos associada à disfunção mitocondrial, como as que ocorrem nas infecções crônicas pelo HCV (BOTROS; SIKARIS, 2013; GLINGHAMMAR et al., 2009; SOOKOIAN, 2015).

Além disso, os ensaios clínicos para tratamento de pacientes infectados pelo HBV utilizam os LSN da ALT como critério para indicar tratamento, e geralmente requerem uma elevação da ALT de 1,3-2,0 vezes o LSN para inclusão nos estudos (TERRAULT et al., 2015). No entanto, ainda que o aumento da atividade necroinflamatória e níveis mais elevados de ALT estejam associados à necrose e regeneração, alguns estudos mostram que a necroinflamação, com consequente indução da fibrose, podem não induzir o aumento da ALT em muitos pacientes com infecção crônica pelo HBV ou HCV, que não seriam elegíveis para tratamento antiviral (DOR-MOHAMMADI et al., 2005; WONG et al., 2017; ZHENG et al., 2017). Assim, a interpretação acadêmica de causa e "gravidade" da lesão aguda com base na magnitude da elevação da atividade enzimática, às vezes pode ser enganosa, devido a possibilidade de uma zona cinza onde uma série de causas se sobrepõem (GIANNINI; TESTA; SAVARINO, 2005).

Ainda que não tenham estudos na literatura avaliando a utilização da metabonômica na avaliação da atividade das enzimas hepática, alguns autores buscaram avaliar pacientes com hepatite B e C crônica buscando novos biomarcadores sensíveis e específicos, principalmente envolvendo o metabolismo energético, e de proteínas e lipídios. No entanto, ainda não existem biomarcadores uniformes descritos na literatura, sendo necessário um número maior de estudos clínicos para avaliar esses novos marcadores (SCHOEMAN et al., 2016; YU et al., 2017; ZHENG et al., 2017).

Yue et al. analisaram anormalidades induzidas no metabolismo dos ácidos nucleicos pela proteína X do vírus da hepatite B (HBx) através da metabonômica baseada em RMN de ^1H , e identificaram que o HBx induz inicialmente dano do DNA e, em seguida, interrompe o metabolismo dos ácidos nucleicos, que por sua vez bloqueia o reparo do DNA e induz a ocorrência de HCC (YUE et al., 2016). Nos estudos metabonômicos de pacientes com infecção crônica pelo HBV, foram encontrados alguns metabolitos com diferença significativa em relação aos controles, que podem fornecer uma base para novas vias patogênicas e ideias para uma nova terapia direcionada (HOU; DUAN, 2016).

Em relação às complicações da doença hepática crônica causada por esses vírus, Sands et al. avaliaram os metabólitos responsáveis pela discriminação de amostras de pacientes com fibrose hepática significativa em pacientes com hepatite C crônica versus controles saudáveis, utilizando modelos de RMN de ^1H . Os autores observaram que os pacientes com fibrose significativa e avançada apresentaram maiores níveis de atividade das enzimas ALT e AST, e que o aumento da gravidade da fibrose foi associado com maiores níveis de citrato, como produto do metabolismo dos carboidratos, e dos aminoácidos aromáticos tirosina e fenilalanina, e ainda de metionina, enquanto menores níveis de creatina, LDL, fosfatidilcolina e N-acetil- α 1-ácido-glicoproteína foram observados nestes grupos (SANDS et al., 2015). De forma semelhante, identificamos no presente estudo maiores níveis de carboidratos, e menores níveis de colesterol HDL e LDL nos pacientes com atividade das enzimas hepáticas aumentada, no entanto menores níveis de espécies insaturadas e aromáticas nesse grupo.

Além disso, Embade et al., também utilizaram a espectroscopia de RMN de ^1H na caracterização do metabolismo da fibrose hepática induzida pelo HCV para distinguir pacientes com cirrose e sem fibrose, e identificaram alterações no metabolismo de aminoácidos, lipídios e carboidratos. Pacientes com cirrose induzida pelo HCV apresentaram maiores níveis de atividade das enzimas ALT, AST e GGT, e níveis reduzidos de colina, acetoacetato, LDL, glutamina/glutamato, carboidratos e lipídios, enquanto o grupo controle, apresentou maiores níveis de creatinina e creatina (EMBADE et al., 2016). Em nosso estudo, também foram identificados menores níveis de glutamina e de lipídios, no entanto, com menores níveis de carboidratos nesse grupo.

Assim, os modelos metabonômicos construídos neste estudo foram capazes de, com um único espectro de RMN de ^1H do soro, distinguir pacientes com e sem alterações da atividade sérica da AST e da ALT decorrentes da infecção crônica pelo HBV ou HCV. Além disso, foi possível indicar a classe de compostos (metabólitos) associada à discriminação, mostrando assim mais uma potencial aplicação da estratégia metabonômica na prática clínica, e permitindo uma análise mais profunda do processo de investigação da doença hepática desses pacientes.

Além disso, estudos adicionais utilizando amostras de pacientes de diferentes regiões do Brasil e do mundo permitiriam a realização de uma validação externa e realização das etapas de validação de testes diagnósticos de fase III e IV dos modelos

metabonômicos, para que estes sejam amplamente usados no diagnóstico das hepatites B e C e na avaliação da atividade das enzimas hepáticas em diferentes populações.

REFERÊNCIAS

BALOG, C. I. A et al. Metabonomic investigation of human *Schistosoma mansoni* infection. **Molecular BioSystems**, v. 7, n. 5, p. 1473–1480, 2011.

BATISTA, A. D. et al. Proton nuclear magnetic resonance-based metabonomic models for non-invasive diagnosis of liver fibrosis in chronic hepatitis C: Optimizing the classification of intermediate fibrosis. **World Journal of Hepatology**, v. 10, n. 1, p. 105–115, 2018.

BOTROS, M.; SIKARIS, K. A. The De Ritis ratio: the test of time. **The Clinical biochemist Reviews**, v. 34, n. 3, p. 117–130, 2013.

DOR-MOHAMMADI, T. et al. Relationship between serum alanine aminotransferase levels and liver histology in chronic hepatitis C-infected patients. **Indian Journal of Gastroenterology**, v. 24, n. 2, p. 49–51, 2005.

EMBADE, N. et al. Metabolic characterization of advanced liver fibrosis in HCV patients as studied by serum ¹H-NMR spectroscopy. **PLoS ONE**, v. 11, n. 5, p. 1–19, 2016.

FORNACIARI, I. et al. Gamma-glutamyltransferase fractions in human plasma and bile: Characteristic and biogenesis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, p. 2–8, 2014.

GIANNINI, E. G.; TESTA, R.; SAVARINO, V. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. **Canadian Medical Association Journal**, v. 172, n. 3, p. 367–379, 2005.

GLINGHAMMAR, B. et al. Detection of the mitochondrial and catalytically active alanine aminotransferase in human tissues and plasma. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 23, n. 5, p. 621–631, 2009.

GODOY, M. M. G. et al. Hepatitis C virus infection diagnosis using metabonomics. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 17, p. 854–858, dez. 2010.

GOUVEIA, L. R. et al. Diagnosis of coinfection by schistosomiasis and viral hepatitis B or C using ¹H NMR-based metabonomics. **PLoS ONE**, v. 12, n. 8, p. e0182196, 2017.

HOU, Q.; DUAN, Z. J. Metabonomic window into hepatitis B virus-related hepatic diseases. **World Journal of Hepatology**, v. 8, n. 1, p. 1–8, 2016.

LOPES, E. P. A. et al. Determination of the cut-off value of serum alanine aminotransferase in patients undergoing hemodialysis, to identify biochemical activity in patients with hepatitis C viremia. **Journal of Clinical Virology**, v. 35, n. 3, p. 298–302, mar. 2006.

NICHOLSON, J. K. et al. Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function. **Nature Reviews**, v. 1, n. February, p. 153–161, 2002.

PRATT, D. S.; KAPLAN, M. M. Evaluation of abnormal liver-enzyme results in asymptomatic patients. **The New England Journal of Medicine**, v. 342, n. 17, p. 1266–1271, 2000.

SACKETT, D. L.; HAYNES, R. B. Evidence base of clinical diagnosis: the architecture of diagnostic research. **British Medical Journal**, v. 324, n. March, p. 539–541, 2002.

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

SITOLE, L. J.; WILLIAMS, A. A.; MEYER, D. Metabonomic analysis of HIV-infected biofluids. **Molecular BioSystems**, v. 9, p. 18–28, 2012.

SOOKOIAN, S.; PIROLA, C. J. Liver enzymes, metabolomics and genome-wide association studies: From systems biology to the personalized medicine. **World Journal of Gastroenterology**, v. 21, n. 213, p. 711–725, 2015.

TARGHER, G. Elevated serum gamma-glutamyltransferase activity is associated with increased risk of mortality, incident type 2 diabetes, cardiovascular events, chronic kidney disease and cancer: a narrative review. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 48, n. 2, p. 147–157, 2010.

TERRAULT, N. A. et al. AASLD guidelines for treatment of chronic hepatitis B. **Hepatology**, v. 63, n. 1, p. 261–283, 2015.

VAN BEEK, J. H. D. A. et al. The genetic architecture of liver enzyme levels: GGT, ALT and AST. **Behavior Genetics**, v. 43, n. 4, p. 329–339, 2013.

VERSLYPE, C. Evaluation of abnormal liver-enzyme results in asymptomatic patients. **Acta Clinica Belgica**, v. 59, n. 5, p. 285–289, 2004.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for the Prevention, Care and Treatment of Persons with Chronic Hepatitis B Infection**. Geneva: World Health Organization, 2015.

WONG, R. J. et al. Significant Hepatic Fibrosis Among Treatment-Naive Chronic Hepatitis B Virus With Increased Hepatitis B Virus DNA and Normal Alanine Aminotransferase. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 16, n. 1, p. 146–148, 2017.

YU, M. et al. Metabonomics Research Progress on Liver Diseases. **Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 2017, n. Article ID 8467192, p. 1–10, 2017.

YUE, D. et al. Hepatitis B virus X protein (HBx)-induced abnormalities of nucleic acid metabolism revealed by (1)H-NMR-based metabonomics. **Scientific Reports**, v. 6, n. 24430, p. 1–13, 2016.

ZHENG, H. et al. Metabolic characterization of hepatitis B virus-related liver cirrhosis using NMR-based serum metabolomics. **Metabolomics**, v. 13, n. 10, p. 1–9, 2017.

6 CONCLUSÕES

Os MM construídos foram capazes de distinguir os pacientes com infecção crônica pelo HBV ou pelo HCV e indivíduos imunes ao HBV, com melhor especificidade para o modelo HCV e melhor sensibilidade para o modelo HBV.

A infecção pelo HBV mostrou-se associada a maiores níveis de aminoácidos, enquanto sinais atribuídos a carboidratos foram mais intensos em pacientes com HCV.

Em relação aos MM construídos para avaliação da atividade das enzimas hepáticas, os modelos foram capazes de distinguir pacientes com e sem alterações de atividade AST e ALT, independentemente do tipo de vírus relacionado à infecção, com valores de sensibilidade e especificidade semelhantes. Para o modelo GGT os resultados foram menos satisfatórios.

Para os MM associando a atividade enzimática, de acordo com o tipo de vírus relacionado à infecção, observou-se melhor desempenho do modelo ALT em pacientes com HBV, enquanto para os pacientes com HCV, o modelo de AST apresentou melhor desempenho.

O aumento da atividade da enzima ALT mostrou associação com altas concentrações de carboidratos e menores níveis de HDL e LDL, aminoácidos e de espécies insaturadas e aromáticas, enquanto o aumento da atividade da AST mostrou-se associada a altas concentrações de carboidratos e menores níveis de aminoácidos.

Desta forma, os resultados sugerem que a estratégia metabonômica, mostrou-se promissora no diagnóstico da infecção crônica pelos vírus da hepatite B ou C, do tipo de vírus relacionado, e da atividade sérica das enzimas hepáticas. Além disso, foi possível indicar a classe de compostos (metabólitos) associada à discriminação, permitindo analisar em uma mesma amostra, a presença de infecção pelo HBV ou HCV e a função hepática.

7 LIMITAÇÕES METODOLÓGICAS DO ESTUDO E PERPECTIVAS

Uma limitação metodológica encontrada foi a presença de viés de seleção, já que a maior parte dos pacientes com infecção crônica pelo HBV atendidos no ambulatório de Hepatologia e incluídos neste estudo encontravam-se na fase de portador inativo. No entanto, durante as análises, ainda que estes pacientes tenham apresentado dados laboratoriais semelhantes ao grupo controle, os modelos permitiram a discriminação entre os grupos.

A ausência de um grupo controle adequado para os pacientes infectados pelo HCV também constituiu uma limitação, já que o marcador sorológico anti-HCV permanece presente no soro mesmo após a carga viral tornar-se indetectável. Estudos futuros utilizando um grupo controle de indivíduos imunes apenas pela vacina contra o HBV poderia minimizar este viés.

Como perspectivas, para o presente estudo, mostra-se importante a obtenção de amostras de pacientes de diferentes regiões do Brasil e do mundo, para que os modelos construídos sejam validados externamente e utilizados amplamente no diagnóstico das hepatites B e C e avaliação da atividade das enzimas hepáticas em diferentes populações.

A realização de etapas de validação de teste diagnóstico fase III e IV também auxiliaria na avaliação do desempenho dos modelos construídos para que sejam incluídos na prática clínica.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, A. L. S. S.; ZICKER, F. **Métodos de Investigação Epidemiológica em Doenças Transmissíveis**. Brasília: Organização Pan-Americana de Saúde/Fundação Nacional de Saúde, 1997. v. 1.
- BALLABIO, D.; CONSONNI, V. Classification tools in chemistry. Part 1: linear models. PLS-DA. **Analytical Methods**, v. 5, p. 3790–3798, 2013.
- BALOG, C. I. A et al. Metabonomic investigation of human *Schistosoma mansoni* infection. **Molecular BioSystems**, v. 7, n. 5, p. 1473–1480, 2011.
- BARTON, R. H. et al. High-throughput ¹H NMR-based metabolic analysis of human serum and urine for large-scale epidemiological studies: Validation study. **International Journal of Epidemiology**, v. 37, n. SUPPL. 1, p. 31–40, 2008.
- BATISTA, A. D. et al. Proton nuclear magnetic resonance-based metabonomic models for non-invasive diagnosis of liver fibrosis in chronic hepatitis C: Optimizing the classification of intermediate fibrosis. **World Journal of Hepatology**, v. 10, n. 1, p. 105–115, 2018.
- BECKONERT, O. et al. Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. **Nature Protocols**, v. 2, n. 11, p. 2692–2703, jan. 2007.
- BOLLARD, M. E. et al. NMR-based metabonomic approaches for evaluating physiological influences on biofluid composition. **NMR in Biomedicine**, v. 18, n. 3, p. 143–162, 2005.
- BOTROS, M.; SIKARIS, K. A. The De Ritis ratio: the test of time. **The Clinical biochemist Reviews**, v. 34, n. 3, p. 117–130, 2013.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE. DEPARTAMENTO DE ATENÇÃO HOSPITALAR E DE URGÊNCIA. **Testes de Ácidos Nucleicos (NAT) Implantação e Rotina dos Testes de Ácidos Nucleicos (NAT) Implantação e Rotina nos Serviços de Hemoterapia**. 1. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2013.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. DEPARTAMENTO DE DST AIDS E HEPATITES VIRAIS. **Manual técnico para o diagnóstico das Hepatites Virais**. Brasília: Ministério da Saúde, 2015.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. DEPARTAMENTO DE DST AIDS E HEPATITES VIRAIS. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas Para Hepatite B e Coinfecções**. Brasília: Ministério da Saúde, 2017a.
- 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**. 1. ed. Brasília: Editora MS, 2017b.
- BYLESJO, M. et al. Identification of genes involved in radiation-induced G 1 arrest y.

Journal of Chemometrics, v. 20, p. 341–351, 2006.

COREY, K. E. et al. Acute hepatitis C infection lowers serum lipid levels. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 18, n. 7, p. 1–13, 2011.

CROAGH, C. M.; LUBEL, J. S. Natural history of chronic hepatitis B: Phases in a complex relationship. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 30, p. 10395–10404, 2014.

DONA, A. C. et al. Precision High-Throughput Proton NMR Spectroscopy of Human Urine, Serum, and Plasma for Large-Scale Metabolic Phenotyping. **Analytical Chemistry**, v. 86, p. 9887–9894, 2014.

DOR-MOHAMMADI, T. et al. Relationship between serum alanine aminotransferase levels and liver histology in chronic hepatitis C-infected patients. **Indian Journal of Gastroenterology**, v. 24, n. 2, p. 49–51, 2005.

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

EASL. EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF THE LIVER. EASL recommendations on treatment of hepatitis C 2016. **Journal of Hepatology**, v. 66, n. 1, p. 153–194, 2016.

EASL. EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF THE LIVER. EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection. **Journal of Hepatology**, v. 67, n. 0, p. 370–398, 2017.

EMBADE, N. et al. Metabolic characterization of advanced liver fibrosis in HCV patients as studied by serum ¹H-NMR spectroscopy. **PLoS ONE**, v. 11, n. 5, p. 1–19, 2016.

FELMLEE, D. J. et al. Hepatitis C virus, cholesterol and lipoproteins - Impact for the viral life cycle and pathogenesis of liver disease. **Viruses**, v. 5, n. 5, p. 1292–1324, 2013.

FORNACIARI, I. et al. Gamma-glutamyltransferase fractions in human plasma and bile: Characteristic and biogenesis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, p. 2–8, 2014.

FUSEGAWA, H. et al. Platelet activation in patients with chronic hepatitis C. **Tokai Journal of Experimental & Clinical Medicine**, v. 27, n. 4, p. 101–106, 2002.

GHOLSON, C. F. et al. Chronic hepatitis C with normal aminotransferase levels: a clinical histologic study. **American Journal of Gastroenterology**, v. 92, n. 10, p. 1788–1792, 1997.

GIANNINI, E. G.; TESTA, R.; SAVARINO, V. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. **Canadian Medical Association Journal**, v. 172, n. 3, p. 367–379, 2005.

GLINGHAMMAR, B. et al. Detection of the mitochondrial and catalytically active alanine aminotransferase in human tissues and plasma. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 23, n. 5, p. 621–631, 2009.

GODOY, M. M. G. et al. Hepatitis C virus infection diagnosis using metabonomics. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 17, p. 854–858, dez. 2010.

GOESSLING, W.; MASSARO, J. Aminotransferase levels and 20-year risk of metabolic syndrome, diabetes, and cardiovascular disease. **Gastroenterology**, v. 135, n. 6, p. 1935–1944, 2008.

GOUVEIA, L. R. et al. Diagnosis of coinfection by schistosomiasis and viral hepatitis B or C using ¹H NMR-based metabolomics. **PloS ONE**, v. 12, n. 8, p. e0182196, 2017.

GOWER, E. et al. Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus. **Journal of hepatology**, v. 61, p. S45–S57, 2014.

GREEN, R. M.; FLAMM, S. AGA technical review on the evaluation of liver chemistry tests. **Gastroenterology**, v. 123, n. 4, p. 1367–1384, 2002.

GROMSKI, P. S. et al. A tutorial review: Metabolomics and partial least squares-discriminant analysis - a marriage of convenience or a shotgun wedding. **Analytica Chimica Acta**, v. 879, p. 10–23, 2015.

HAJARIZADEH, B.; GREBELY, J.; DORE, G. J. Epidemiology and natural history of HCV infection. **Nature reviews. Gastroenterology & hepatology**, v. 10, p. 553–562, 2013.

HALL, P.; CASH, J. What is the real function of the liver “function” tests? **The Ulster Medical Journal**, v. 81, n. 1, p. 30–36, 2012.

HEWER, R. et al. Applying biofluid ¹H NMR-based metabolomic techniques to distinguish between HIV-1 positive/AIDS patients on antiretroviral treatment and HIV-1 negative individuals. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, p. 1442–1446, 16 jun. 2006.

HOLMES, E. et al. The promise of metabolic phenotyping in gastroenterology and hepatology. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 12, n. 8, p. 458–471, 2015.

HOU, Q.; DUAN, Z. J. Metabonomic window into hepatitis B virus-related hepatic diseases. **World Journal of Hepatology**, v. 8, n. 1, p. 1–8, 2016.

HOU, Y. et al. [Exploration on serum metabolic biomarkers of hepatitis B virus infected patients based on gas chromatography-mass spectrometry]. **Se pu: Chinese Journal of Chromatography**, v. 33, n. 4, p. 383–388, 2015.

ILOEJE, U. H. et al. Predicting cirrhosis risk based on the level of circulating hepatitis B viral load. **Gastroenterology**, v. 130, n. 3, p. 678–686, 2006.

IRSHAD, M.; MANKOTIA, D. S.; IRSHAD, K. An insight into the diagnosis and pathogenesis of hepatitis C virus infection. **World Journal of Gastroenterology**, v. 19, n. 44, p. 7896–7909, 2013.

KESLI, R. An Overview of the Laboratory Assay Systems and Reactives Used in the Diagnosis of Hepatitis C Virus (HCV) Infections. In: ABUELZEIN, E. (Ed.). **Trends in Immunolabelled and Related Techniques**. [s.l.] InTech, 2012. p. 340–350.

KEUN, H. C. Metabonomic modeling of drug toxicity. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 109, n. 1–2, p. 92–106, 2006.

LADEP, N. G. et al. Discovery and validation of urinary metabotypes for the diagnosis of hepatocellular carcinoma in West Africans. **Hepatology**, v. 60, n. 4, p. 1291–1301, out. 2014.

LEITE, É. DE A. **Construção de modelo metabonômico baseado em RNM de ¹H a partir de amostras de urina para classificar portadores de hepatites B ou C**. Dissertação (Mestrado em Química) - Centro de Ciências Exatas e da Natureza - Departamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco. Recife, p.64. 2014.

LENZ, E. M.; WILSON, I. D. Analytical Strategies in Metabonomics. **Journal of Proteome Research**, v. 6, p. 443–458, 2007.

LEVIN, J. **Baseline HCV RNA of 400,000 best predicts SVR and relapse rates in patients treated with pegasys plus ribavirin**. Disponível em: <http://www.natap.org/2007/EASL/EASL_41.htm>. Acesso em: 1 jul. 2017.

LINDON, J. C. et al. Metabonomics technologies and their applications in physiological monitoring, drug safety assessment and disease diagnosis. **Biomarkers**, v. 9, n. 1, p. 1–31, 2004.

LOPES, E. P. A. et al. Determination of the cut-off value of serum alanine aminotransferase in patients undergoing hemodialysis, to identify biochemical activity in patients with hepatitis C viremia. **Journal of Clinical Virology**, v. 35, n. 3, p. 298–302, mar. 2006.

MATTOS, A. A. DE; DANTAS-CORREA, E. B. Hepatite pelo vírus B em pacientes HBeAg-negativo. In: **Tratado de Hepatologia**. Rio de Janeiro: Rubio, 2010. p. 189–203.

MOHD HANAFIAH, K. et al. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: New estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence. **Hepatology**, v. 57, n. 4, p. 1333–1342, 2013.

NICHOLSON, J. K. et al. Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function. **Nature Reviews**, v. 1, n. February, p. 153–161, 2002.

NICHOLSON, J. K.; LINDON, J. C. Metabonomics. **Nature**, v. 455, n. 23, p. 1054–1056, 2008.

NICHOLSON, J. K.; LINDON, J. C.; HOLMES, E. “Metabonomics”: understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. **Xenobiotica**, v. 29, n. 11, p. 1181–1189, nov. 1999.

NIELSEN, N. S. et al. Impaired platelet aggregation and rebalanced hemostasis in patients with chronic hepatitis C virus infection. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 5, p. 1–13, 2017.

PEREIRA, L. M. M. B. et al. **Estudo de prevalência de base populacional das infecções pelos vírus das hepatites A, B e C nas capitais do Brasil**. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2010.

PEREIRA, L. M. M. B. et al. Prevalence and risk factors of Hepatitis C virus infection

in Brazil, 2005 through 2009: a cross-sectional study. **BMC Infectious Diseases**, v. 13, n. 60, p. 1–12, 2013.

PRATT, D. S.; KAPLAN, M. M. Evaluation of abnormal liver-enzyme results in asymptomatic patients. **The New England Journal of Medicine**, v. 342, n. 17, p. 1266–1271, 2000.

RAFTER, I. et al. Isoform-specific alanine aminotransferase measurement can distinguish hepatic from extrahepatic injury in humans. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 30, n. 5, p. 1241–1249, 2012.

ROSS, A. et al. NMR Spectroscopy Techniques for Application to Metabonomics. In: LINDON, J. C.; NICHOLSON, J. K.; HOLMES, E. (Eds.). . **The Handbook of Metabonomics and Metabolomics**. 1. ed. Amsterdam: Elsevier B.V., 2007. p. 55–112.

SACKETT, D. L.; HAYNES, R. B. Evidence base of clinical diagnosis: the architecture of diagnostic research. **British Medical Journal**, v. 324, n. March, p. 539–541, 2002.

SAEED, U.; WAHEED, Y.; ASHRAF, M. 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**, v. 4, n. 2, p. 88–96, 2014.

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

SCHOEMAN, J. C. et al. Metabolic characterization of the natural progression of chronic hepatitis B. **Genome Medicine**, v. 8, n. 64, p. 1–13, 2016.

SCHWEITZER, A. et al. Estimations of worldwide prevalence of chronic hepatitis B virus infection: A systematic review of data published between 1965 and 2013. **The Lancet**, v. 386, n. 10003, p. 1546–1555, 2015.

SEEFF, L. B. The history of the “natural history” of hepatitis C (1968-2009). **Liver International**, v. 29, p. 89–99, 2009.

SITOLE, L. J.; WILLIAMS, A. A.; MEYER, D. Metabonomic analysis of HIV-infected biofluids. **Molecular BioSystems**, v. 9, p. 18–28, 2012.

SOOKOIAN, S.; PIROLA, C. J. Liver enzymes, metabolomics and genome-wide association studies: From systems biology to the personalized medicine. **World Journal of Gastroenterology**, v. 21, n. 213, p. 711–725, 2015.

SUMIDA, Y.; EGUCHI, Y.; ONO, M. Current status and agenda in the diagnosis of nonalcoholic steatohepatitis in Japan. **World Journal of Hepatology**, v. 2, n. 10, p. 374–383, 2010.

TARGHER, G. Elevated serum gamma-glutamyltransferase activity is associated with increased risk of mortality, incident type 2 diabetes, cardiovascular events, chronic kidney disease and cancer: a narrative review. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 48, n. 2, p. 147–157, 2010.

TERRAULT, N. A. et al. AASLD guidelines for treatment of chronic hepatitis B. **Hepatology**, v. 63, n. 1, p. 261–283, 2015.

THAPA, B. R.; WALIA, A. Liver function tests and their interpretation. **Indian Journal of Pediatrics**, v. 74, n. 7, p. 663–671, 2007.

VAN BEEK, J. H. D. A. et al. The genetic architecture of liver enzyme levels: GGT, ALT and AST. **Behavior Genetics**, v. 43, n. 4, p. 329–339, 2013.

VERSLYPE, C. Evaluation of abnormal liver-enzyme results in asymptomatic patients. **Acta Clinica Belgica**, v. 59, n. 5, p. 285–289, 2004.

VILLAR, L. M. et al. Update on hepatitis B and C virus diagnosis. **World Journal of Virology**, v. 4, n. 4, p. 323–342, 2015.

WANG, X. et al. Urinary metabolite variation is associated with pathological progression of the post-hepatitis B cirrhosis patients. **Journal of Proteome Research**, v. 11, n. 7, p. 3838–3847, 2012.

WANG, Y. et al. Metabonomic investigations in mice infected with *Schistosoma mansoni*: an approach for biomarker identification. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 34, p. 12676–12681, 2004.

WESTBROOK, R. H.; DUSHEIKO, G. Natural history of hepatitis C. **Journal of Hepatology**, v. 61, p. S58–S68, 2014.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for the Prevention, Care and Treatment of Persons with Chronic Hepatitis B Infection**. Geneva: World Health Organization, 2015.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for the Screening Care and Treatment of Persons with Chronic Hepatitis C Infection**. Geneva: World Health Organization, 2016.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines on Hepatitis B and C Testing**. Geneva: World Health Organization, 2017.

WISHART, D. S. et al. HMDB: a knowledgebase for the human metabolome. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. Database issue, p. D603–D610, 2009.

WONG, R. J. et al. Significant Hepatic Fibrosis Among Treatment-Naive Chronic Hepatitis B Virus With Increased Hepatitis B Virus DNA and Normal Alanine Aminotransferase. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 16, n. 1, p. 146–148, 2017.

WORLEY, B.; POWERS, R. Multivariate Analysis in Metabolomic. **Current Metabolomics**, v. 1, n. 1, p. 92–107, 2015.

XIA, J.; WISHART, D. S. Using metaboanalyst 3.0 for comprehensive metabolomics data analysis. **Current Protocols in Bioinformatics**, v. 55, n. 14, p. 14.10.1–14.10.91, 2016.

XUE, R. et al. Gas chromatography/mass spectrometry screening of serum

metabolomic biomarkers in hepatitis B virus infected cirrhosis patients. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 47, n. 3, p. 305–310, 2009.

YU, M. et al. Metabonomics Research Progress on Liver Diseases. **Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 2017, n. Article ID 8467192, p. 1–10, 2017.

YUE, D. et al. Hepatitis B virus X protein (HBx)-induced abnormalities of nucleic acid metabolism revealed by (1)H-NMR-based metabonomics. **Scientific Reports**, v. 6, n. 24430, p. 1–13, 2016.

ZHENG, H. et al. Metabolic characterization of hepatitis B virus-related liver cirrhosis using NMR-based serum metabolomics. **Metabolomics**, v. 13, n. 10, p. 1–9, 2017.

ZOPPINI, G. et al. The aspartate aminotransferase-to-alanine aminotransferase ratio predicts all-cause and cardiovascular mortality in patients with type 2 diabetes. **Medicine**, v. 95, n. 43, p. e4821, 2016.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Termo de consentimento livre e esclarecido



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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (Resolução 466/12)

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

Pesquisadora: Joelma Carvalho Santos

Orientador: Prof. Dr. Edmundo Pessoa de Almeida Lopes (UFPE)

Coorientador: Prof. Ricardo Oliveira da Silva (UFPE)

Convidamos o (a) Sr. (a) para participar como voluntário (a) da pesquisa “**A utilização da metabonômica no diagnóstico das hepatites B, C e esquistossomose mansônica em pacientes com e sem alterações das enzimas hepáticas**”, que está sob a responsabilidade da pesquisadora Joelma Carvalho Santos (Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical. Avenida Professor Moraes Rego, s/n – Bloco “A” Térreo do Hospital das Clínicas da UFPE. Cidade Universitária 50670-420, Recife – PE. Telefone: (81) 2126-8527. E-mail: joelma.carvalho04@yahoo.com). Também participam desta pesquisa a pesquisadora Andrea Doria Batista (e-mail: adoria04@globo.com) e está sob a orientação do Prof. Dr. Edmundo Pessoa de Almeida Lopes (e-mail: epalopes@uol.com.br) e coorientação do Prof. Ricardo Oliveira da Silva (e-mail: rosilvaufpe@gmail.com).

Caso este Termo de Consentimento contenha informações que não lhe sejam compreensíveis, as dúvidas podem ser tiradas com a pessoa que está lhe entrevistando e apenas ao final, quando todos os esclarecimentos forem dados, caso concorde com a realização do estudo pedimos que rubriche as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias, uma via lhe será entregue e a outra ficará com o pesquisador responsável.

Caso não concorde, não haverá penalização, bem como será possível retirar o consentimento a qualquer momento, também sem nenhuma penalidade.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Esta pesquisa tem como objetivo estudar pacientes com hepatite B ou hepatite C, com enzimas do fígado normais e aumentadas, pacientes com associação das hepatites com esquistossomose, portadores apenas de esquistossomose e indivíduos imunes ao vírus da hepatite B, além de diferenciar os graus de lesão no fígado nos pacientes com esquistossomose, através da análise dos metabólitos no sangue do paciente por ressonância magnética. Será necessária a coleta de 8mL de sangue – 2 tubos - de uma veia para realizar os exames. Os materiais que serão utilizados na coleta de sangue são estéreis e descartáveis, para que não haja risco de contaminação.

Será necessária apenas uma coleta de sangue. No entanto, caso haja problemas com a amostra de sangue coletada, como material insuficiente ou quebra de tubos, o senhor (a) será convidado a participar de uma nova coleta. A coleta de sangue no braço poderá acarretar uma leve dor e pequenos hematomas, contudo, não comprometerá a sua saúde. Para amenizar os riscos, a coleta será realizada por profissionais experientes que tomarão os cuidados necessários para diminuir o risco de que o local onde a veia for mexida fique arroxado e/ou dolorido.

Os benefícios diretos que os participantes terão será a realização de um exame por ressonância magnética de soro sem nenhum custo, e como benefício indireto a contribuição para o desenvolvimento de um método diagnóstico que visa associar o perfil de metabólitos

desses pacientes à presença de hepatite B ou C, e esquistossomose poderão contribuir para o desenvolvimento de um método diagnóstico de fibrose no fígado, minimamente invasivo.

Todas as informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados de prontuário coletados nesta pesquisa ficarão armazenados em pastas de arquivo e no computador pessoal dos pesquisadores, sob a responsabilidade das pesquisadoras Joelma Carvalho Santos e Andrea Doria Batista, no endereço acima informado, pelo período de mínimo 5 anos.

Nada lhe será pago e nem será cobrado para participar desta pesquisa, pois a aceitação é voluntária, mas fica também garantida a indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extra-judicial. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidas pelos pesquisadores (ressarcimento de transporte e alimentação).

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: **(Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br).**

(Assinatura do pesquisador)

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO (A)

Eu, _____, CPF _____, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e de ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do estudo **“A utilização da metabonômica no diagnóstico das hepatites B, C e esquistossomose mansônica em pacientes com e sem alterações das enzimas hepáticas”**, como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pelo(a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade (ou interrupção de meu acompanhamento/ assistência/tratamento).

Recife, _____ de _____ de 201____.

Assinatura do participante: _____

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e o aceite do voluntário em participar. (02 testemunhas não ligadas à equipe de pesquisadores):

Testemunha 1

Testemunha 2

APÊNDICE B – Artigo 1 em inglês

DIAGNOSIS OF CHRONIC HEPATITIS B AND C VIRUS INFECTION BY ¹H NMR-BASED METABONOMICS

Joelma Carvalho Santos^{1*}; Liana Ribeiro Gouveia²; Andrea Dória Batista³; Tássia Brena Barroso Carneiro da Costa²; Izolda Maria Fernandes de Moura^{1,3}; Ronaldo Dionísio Silva^{2,3}; Edmundo Pessoa de Almeida Lopes^{1,3}; Ricardo Oliveira Silva².

¹Postgraduate Program in Tropical Medicine, Center for Health Sciences, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco, Brazil.

²Postgraduate Program in Chemistry, Fundamental Chemistry Department, Center for Exact and Natural Sciences, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco, Brazil.

³Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco, Brazil.

*Corresponding author

Email: joelma.carvalho04@yahoo.com

ABSTRACT

Background and aims: The development of diagnostic tests is important to provide an effective diagnosis and to assess hepatitis B or C patients. The aim of this study was to diagnose chronic HBV or HCV infection and to distinguish the infection according to the type of virus related, in a single serum sample through ¹H-NMR-based metabonomics models. **Patients and methods:** This phase I/II validation study included 245 adult patients previously diagnosed with HBV (n=117), HCV (n=86) and a control group immune to HBV (n=42). Liver evaluation tests were carried out using a Wiener Lab® analyzer and ¹H-NMR spectra were measured on a Varian Unity Plus 300 MHz spectrometer. Metabonomics models were based on Orthogonal Partial Least Squares – Discriminant Analysis (OPLS-DA) using MetaboAnalyst 3.6 data processing platform. **Results:** Four OPLS-DA models were built: (1) HBV versus Control; (2) HCV versus Control (3) Viral Hepatitis B or C versus Control; and (4) HBV

versus HCV. When each viral infection was compared to the control group, it was observed a higher specificity for the HCV model (97.6%) and higher sensitivity (95.7%) for the HBV model. In addition, the viral infection versus control model showed higher specificity (97.6%) with higher levels of carbohydrates and amino acids in the viral infection group, whereas the HBV versus HCV model showed slightly higher sensitivity (93.4%) with HBV infection associated with higher levels of amino acids, and HCV infection related to more intense carbohydrates signals. **Conclusion:** Metabonomics models were able to diagnose chronic HBV or HCV infection and to distinguish the infection according to the type of virus related, using a single serum sample. It was also possible to identify the classes of compounds associated with each discrimination, showing to be a promising complementary method in clinical practice.

Keywords: HBV. HCV. Metabolomics. OPLS-DA

INTRODUCTION

Hepatitis B (HBV) and hepatitis C virus (HCV) are an important cause of liver disease as they induce severe liver disorders, including cirrhosis and hepatocellular carcinoma (IRSHAD, 2013; SAEED, 2014). Approximately 240 million people are chronic carriers of HBV while 80 million individuals present HCV infection worldwide (WHO, 2017). In Brazil, the prevalence of exposure to HBV (anti-HBc) and HCV (anti-HCV) in a population-based survey was 7.4% and 1.38%, respectively (PEREIRA et al., 2010, 2013).

Most people with HBV and HCV chronic infection remain undiagnosed and national testing policies are needed, especially in key populations (WHO, 2017). The diagnosis of HBV and HCV chronic infection is made by using serological tests followed by molecular tests to confirm primary diagnosis, to quantify viral load, to determine genotypes and resistance mutants for antiviral treatment (VILLAR et al., 2015). The presence of signs of chronic hepatitis might be based either by elevated aminotransferases and confirmed by histology (EASL, 2016, 2017; VILLAR et al., 2015).

In addition, the development of new diagnostic tools and a better understanding of the infections caused by these viruses may allow an early identification of these

diseases and prevention of more serious complications (IRSHAD; MANKOTIA; IRSHAD, 2013). As an alternative, metabolomics is a powerful tool that allows the evaluation of systemic metabolism through the analysis of biological samples by analytical techniques associated coupled with multivariate data analysis (NICHOLSON et al., 2002).

Metabonomics employ comprehensive metabolic profiling methods for the analysis of biological fluids and provide systemic views of biological processes (BECKONERT et al., 2007). The use of NMR spectroscopy requires minimal sample preparation, is cost-effective, rapid, reproducible, and nondestructive useful data can be generated from small samples. NMR spectroscopy is part of systems biology-based strategy for the study of organisms integrated with other omics technologies such as genomics and proteomics (LENZ; WILSON, 2007).

This strategy has recently been widely used to provide information on pathogenesis and diagnosis of liver diseases, including HBV (YUE et al., 2016) and HCV infections (GODOY et al., 2010), coinfection by schistosomiasis and hepatitis B or C (GOUVEIA et al., 2017), liver fibrosis (BATISTA et al., 2018; EMBADE et al., 2016; SANDS et al., 2015) and cirrhosis (WANG et al., 2012), and potential metabolic markers were found with high sensitivity and specificity (HOU; DUAN, 2016).

Herein, ^1H -NMR-based metabonomics approach was applied to diagnose chronic hepatitis B and C virus infection and to distinguish the infection according to the type of virus related (HBV or HCV), in a single serum sample through ^1H -NMR-based metabonomics models.

METHODS

Participants and sample collection

This prospective cross-sectional phase I/II validation diagnostic study (SACKETT; HAYNES, 2002) included patients previously diagnosed with HBV or HCV infection and immune to HBV healthy subjects and were recruited from the Hepatology outpatient clinic at the Hospital das Clínicas of Universidade Federal de Pernambuco, from October 2012 to September 2016. It was included in this research 245 adult patients, 128 women (52.2%) and 117 (47.8%) men, aged between 18 and 83 years (46.8 ± 14.77).

From these 245 patients, 117 (47.8%) had been positive for both HBsAg and anti-HBc total/IgG for over 6 months and had serum HBV-DNA positive (HBV group), 86 patients (35.1%) were anti-HCV positive for over 6 months and had serum HCV-RNA positive (HCV group) and 42 (17.1%) subjects were anti-HBs and anti-HBc positive patients (control/ immune to HBV infection group).

Whole blood samples were immediately processed for serum. Part of the samples was stored at -20 °C until the NMR analysis was performed, and another part was used for laboratory tests.

Patients receiving any antiviral treatment, undergoing immunosuppressive therapy, HIV, HBV-HCV and/or schistosomiasis co-infection were excluded from the study.

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

Assessment of biochemical and liver evaluation tests

Sera collected from all patients were analyzed and liver evaluation tests, including alanine and aspartate aminotransferase (ALT and AST), gamma-glutamyl transferase (GGT), albumin, bilirubin, as well as lipid profile tests (total cholesterol, HDL-C, LDL-C and triglycerides) were carried out using a Wiener Lab® kits in a Wiener Lab® autoanalyzer (Wiener Lab Group, Argentina), according to the manufacturer's instructions. Platelets quantification was performed using Pentra 120® automated hematology analyzer (Horiba ABX Diagnostics), and the determination of INR using ACL TOP 500® analyzer (Werfen company), according to manufacturer's instructions.

NMR analysis

Prior to NMR analysis, 400 µL of serum samples were added to 200 µL of D₂O (Deuterium oxide, D 99.9%, Cambridge Isotope Laboratories, Inc., Tewksbury, USA) and placed in 5mm NMR tubes. All NMR experiments were performed on Varian Unity Plus 300 MHz spectrometer (Varian Inc., Palo Alto, USA) using the signal attributed to lactate (δ 1.33 ppm) as a chemical shift reference.

Serum spectra were obtained using a sequence of pulses with water suppression by presaturation (PRESAT), followed by a Carr-Purcell-Mieboom-Gill

(CPMG) sequence used as T2 filter to selectively highlight the signals from the small metabolites. It was used a spectral window of 4.8 kHz, a saturation delay of 2.0 s, an acquisition time of 1.704 s, a RF pulse of 90°, a temperature of 25°C, 88 cycles, tau equal to 0.0004 s, bigtau equal to 0.07 s, 128 scans and a line broadening of 0.3 Hz. The phase and baseline corrections were made manually.

Statistical analysis

For all statistical analyses the spectra obtained for each serum sample (δ 8.0-0.04 ppm) were reduced to 183 segments of equal length (δ 0.04 ppm) and the data region corresponding to residual water (δ 5.16-4.52 ppm) was removed. This binning process was performed using the MestReNova software (version 10.0.1, Mestrelab Research). A matrix containing 245 cases (rows) and 184 variables (columns) was built. These 184 variables were the 183 bins of the ^1H -NMR spectrum plus 1 column with the patient's condition (HBV, HCV or control). From this matrix was originated all the matrices that were submitted to multivariate statistical analysis.

The matrices obtained were analyzed using MetaboAnalyst 3.6 data processing platform (XIA; WISHART, 2016). In the pre-processing step, SNV (Standard Normal Variate) was used in the samples, and after, a principal component analysis (PCA) was performed and the PCA's score matrix was used as input matrix for the orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA). The validation of the OPLS-DA model was based on the permutation test with 2000 permutations of the class label.

The OPLS-DA score plots were used to investigate the discrimination between samples. Afterwards, Feature Importance plots were projected in order to identify the variables (Principal Components - PCs) more relevant for discrimination. Once identified the most relevant PCs, loading plots were used to identify the most relevant spectral regions for these PCs. These regions were compared with findings in the literature and according to the Human Metabolome Database (HMDB) (WISHART et al., 2009), to identify the classes of compounds associated with observed discrimination.

For each OPLS-DA model, a 2x2 contingency table was used to calculate sensitivity (Sn), specificity (Sp), positive likelihood ratio (LR+), negative likelihood ratio (LR-), accuracy (A) and 95% confidence interval (95% IC) for each parameter. Likelihood ratio analysis was applied instead of predictive values, since it does not depend on the prevalence of the outcome that the test is used for. The following

parameters were used: an LR+ above 10 indicating an increased probability post-test that the disease was present, and an LR- below 0, indicating a high probability of absence of the disease post-test.

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

RESULTS

Table 1 shows the demographic characteristics and biochemical and liver evaluation tests of HBV, HCV and control groups. Significant differences were found between the three groups of patients, except for gender, alkaline phosphatase levels and HDL-c. HCV infected patients showed higher values of the variables age, ALT, AST, GGT activity levels, total bilirubin and glucose levels, while in HBV and control groups albumin, total cholesterol and LDL-c levels were slightly higher. In addition, platelets count and triglycerides levels were higher in the control group when compared with HBV ($p=0.039$ and $p=0.007$, respectively) and HCV infected patients ($p=0.001$ and $p=0.009$, respectively).

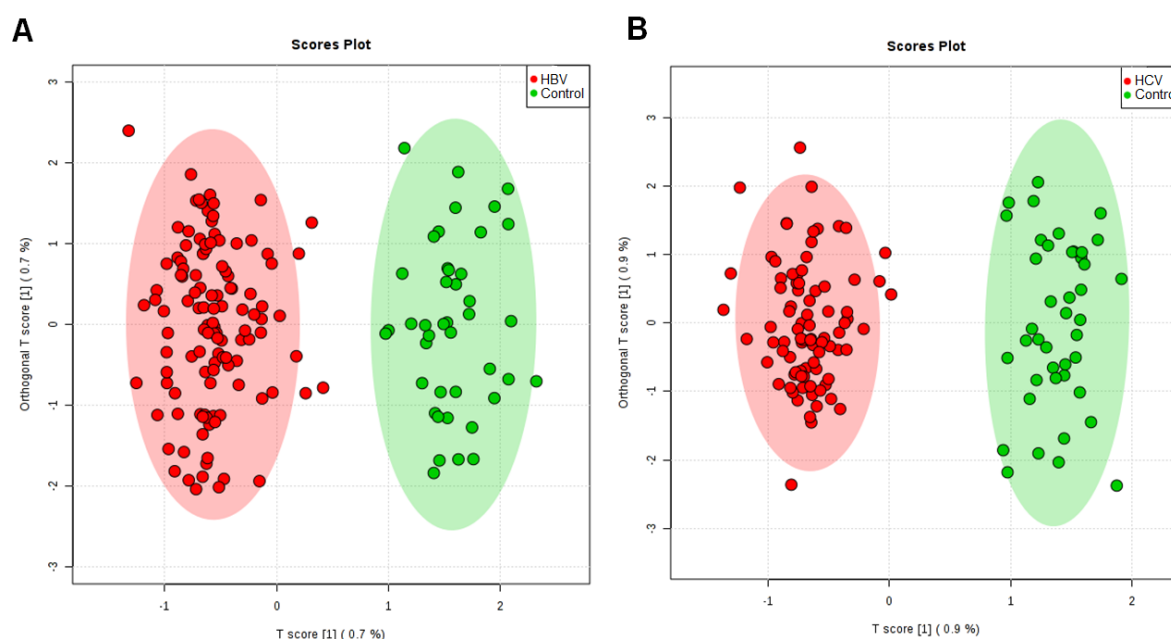
Table 1 – Demographic characteristics and biochemical and liver evaluation tests of HBV (n=117) and HCV (n=86) chronic infected patients and controls (n=42), in Recife/PE, from 2014 to 2016.

Characteristics	HBV (n=117)	HCV (n=86)	Controls (n=42)	<i>p</i> (B x C)	<i>p</i> (C x N)	<i>p</i> (B x N)
Gender (M/F, n, %)	62/55 (53/47)	37/49 (43/57)	18/24 (42.9/57.1)	0.160 ^a	0.986 ^a	0.260 ^a
Age (years)*	40.1 ±13.5	56.2 ±12.7	46.5 ±11.6	<0.001^b	<0.001^b	0.007^b
ALT (/ULN)	0.75 (0.53-0.96)	1.53 (0.93-2.61)	0.48 (0.38-0.68)	<0.001^c	<0.001^c	<0.001^c
AST (/ULN)	0.72 (0.58-0.89)	1.42 (0.96-2.47)	0.56 (0.47-0.67)	<0.001^c	<0.001^c	<0.001^c
GGT (/ULN)	0.75 (0.52-1.18)	1.62 (1.00-2.96)	0.66 (0.56-0.92)	<0.001^c	<0.001^c	0.216^c
ALP (/ULN)	1.18 (0.74-1.67)	1.23 (0.97-1.78)	1.13 (0.83-1.45)	0.085 ^c	0.069 ^c	0.663 ^c
TBil (mg/dL)	0.5 (0.4-0.7)	0.7 (0.5-1.02)	0.5 (0.4-0.6)	<0.001^c	<0.001^c	0.115^c
Albumin (g/dL)	4.3 (4.1-4.5)	4.2 (3.9-4.4)	4.3 (4.2-4.5)	<0.001^c	0.002^c	0.609^c
Platelets (10 ⁹ /mm ³)*	220 ±69	201 ±75	246 ±56	0.064 ^b	0.001^b	0.039^b
INR	1.07 (1.02-1.14)	1.07 (1.00-1.12)	1.04 (1.00-1.09)	0.422 ^c	0.230 ^c	0.036^c
Glucose (mg/dL)	84.4 (77-96)	91.5 (81.2-103)	86.4 (77.3-99.8)	0.012^c	0.133 ^c	0.577 ^c
Total cholesterol (mg/dL)*	183.8 ±40.7	160.7 ±40.3	185.3 ±55.2	<0.001^b	0.008^b	0.861^b
HDL-c (mg/dL)*	49.9 (42.8-59.4)	49.0 (38.5-60)	51.4 (41.5-59.1)	0.798 ^c	0.692 ^c	0.890 ^c
LDL-c (mg/dL)	109.7 ±36.8	86.6 ±32.7	111.2 ±37.5	<0.001^b	<0.001^b	0.830^b
Triglycerides (mg/dL)	117.1 (71-150.6)	100.9 (71-141.2)	142.7 (94.1-182.1)	0.875 ^c	0.009^c	0.007^c

^aChi-square test; ^bUnpaired *t* teste; ^cMann-Whitney test. Data presented as median values (interquartile range in brackets) except those marked with an asterisk (*) which were presented as mean ± standard deviation. P values in bold denote the categories that differ significantly between groups. **ALP**: alkaline phosphatase; **ALT**: alanine aminotransferase; **AST**: aspartate aminotransferase; **GGT**: gamma-glutamyl transferase; **HDL-c**: high density lipoprotein cholesterol; **INR**: international normalized ratio; **LDL-c**: low density lipoprotein cholesterol; **TBil**: total bilirubin; **ULN**: upper limits of normal.

Figure 1 shows the OPLS-DA model score plots built to diagnose hepatitis B (Figure 1A) or C (Figure 1B) monoinfection, separately.

Figure 1 – OPLS-DA two-dimensional score plots to diagnose HBV or HCV infection, in Recife/PE, from 2014 to 2016. (A) HBV infected patients versus control group; (B) HCV infected patients versus control group.



The OPLS-DA score plots for both models showed clear discrimination between groups (HBV x Control; HCV x Control). The feature significance plot showing the importance of the variables for the observed discrimination (Appendix D, Figure 1A) indicated that, in the HBV versus Control model, discrimination between groups was caused by PC1, PC2 and PC3. It is noted that PC3 was strongly influenced by δ 0.8 and 1.2 ppm both associated with the alkyl chain of HDL and LDL, while PC2 was strongly determined (negative loadings values) by the spectral region between δ 5.2 and 6.4 ppm, which is associated with carbohydrates and unsaturated species, and by signals at δ 1.96, 3.36 and 2.96 ppm, which are related to the amino acids proline, asparagine and cystine, an oxidized dimeric form of cysteine. For PC1, it was observed an influence of the region between δ 6.8 and 8.0 ppm, with negative loadings, associated with aromatic and unsaturated species (Appendix D, Figure 1B).

For the HCV *versus* Control model, group discrimination was associated with PC2 (Appendix D, figure 2A), which had been strongly influenced by signals between δ 3.28 and 3.88 ppm, associated with phenylalanine and glucose. It is also observed the contribution of the signal at δ 3.04 ppm, attributed to creatinine, and δ 2.36 ppm to glutamate. With negative loadings, we identified the region associated with aromatic and unsaturated species (δ 6.8-8.0 ppm) (Appendix D, figure 2B).

As for the classification matrix of the OPLS-DA models for the HBV versus controls and HCV versus controls (Table 2), it was observed a higher specificity (97.6%) for the HCV model, with Sn of 90.7%, LR+ of 37.2 and LR- of 0.1, when compared to the HBV model, which indicates that the chance of the model to detect correctly the presence of HCV infection in those infected is 37 times higher than in the control group, with a likelihood of 97% of identifying post-test disease. Whereas for the HBV model, higher sensitivity values (95.7%) were identified with, Sp of 95.2%, LR+ of 20.1 and LR- of 0.04, which indicates that the chance of the model to detect correctly the presence of HBV infection in those infected is 20.1 times higher than in the control group, with a likelihood of 95.2% of identifying post-test disease.

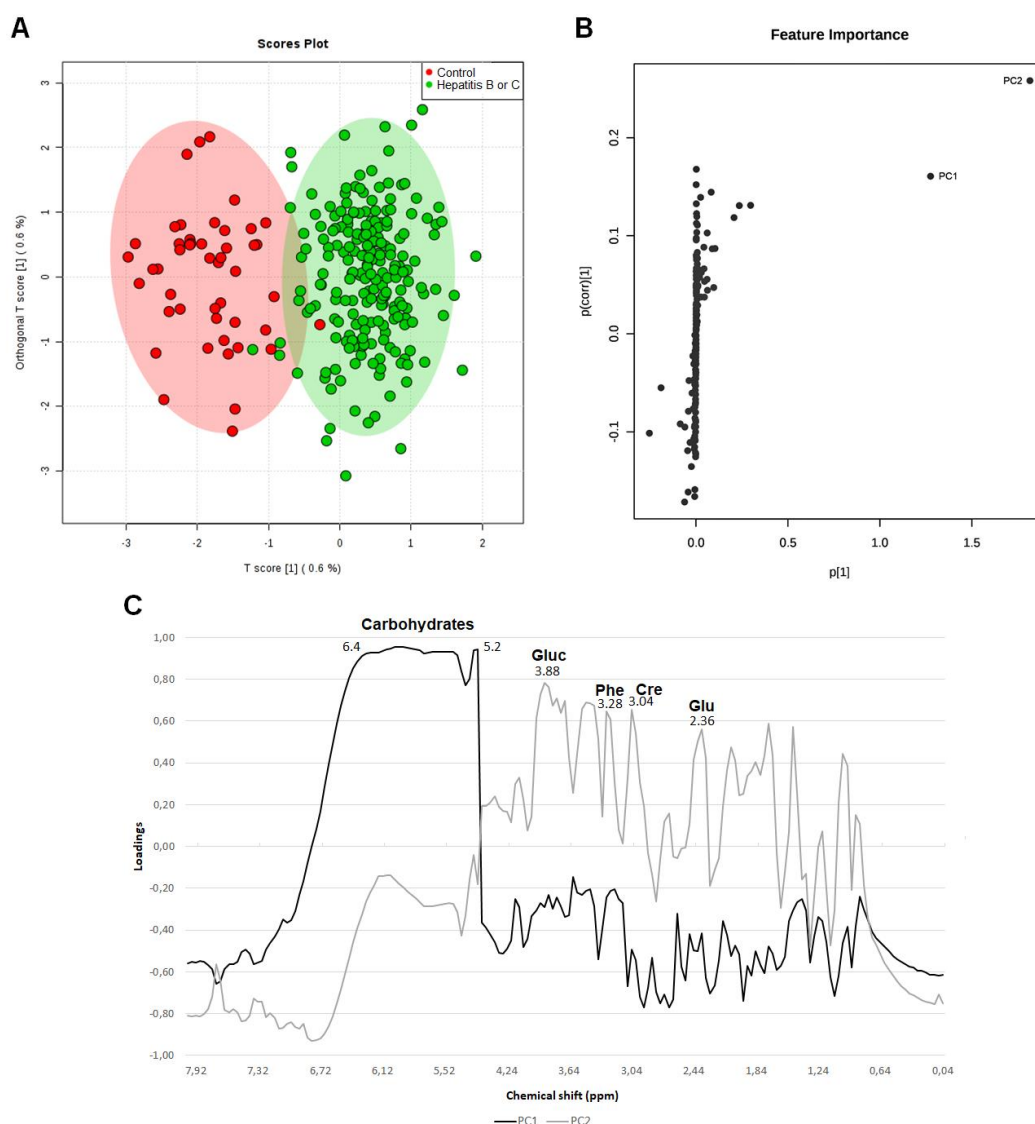
Table 2 – Performance of the OPLS-DA models to identify HBV or HCV infection, in Recife/PE, from 2014 to 2016.

HBV versus controls												
Model (N=159)	Group		<i>p</i> ^a	Sensitivity		Specificity		LR+		LR-		A
	HBV	Controle		(%)	CI _{95%}	(%)	CI _{95%}	CI _{95%}	CI _{95%}	CI _{95%}		
HBV	112	2	<0.001	95.7	90.3-98.6	95.2	83.8-99.4	20.1	5.2-77.8	0.04	0.2-0.11	95.6
Controls	5	40										
HCV versus controls												
Model (N=128)	Group		<i>p</i> ^a	Sensitivity		Specificity		LR+		LR-		A
	HCV	Control		(%)	CI _{95%}	(%)	CI _{95%}	CI _{95%}	CI _{95%}	CI _{95%}		
HCV	78	1	<0.001	90.7	82.5-95.9	97.6	87.1-99.9	37.2	5.36-258	0.1	0.05-0.18	93.0
Controls	8	41										
Viral infection versus controls												
Model (N=245)	Group		<i>p</i> ^a	Sensitivity		Specificity		LR+		LR-		A
	Viral infection	Control		(%)	CI _{95%}	(%)	CI _{95%}	CI _{95%}	CI _{95%}	CI _{95%}		
Viral infection	183	1	<0.001	90.2	85.2-93.9	97.6	87.4-99.9	37.9	5.46-262.7	0.1	0.07-0.15	91.4
Controls	20	41										
HBV versus HCV												
Model (N=203)	Group		<i>p</i> ^a	Sensitivity		Specificity		LR+		LR-		A
	HCV	HBV		(%)	CI _{95%}	(%)	CI _{95%}	CI _{95%}	CI _{95%}	CI _{95%}		
HCV	82	9	<0.001	93.4	88.5-98.7	92.3	85.9-96.4	12.4	6.6-23.3	0.05	0.02-0.13	93.6
HBV	4	108										

^aFisher's exact test; A: Accuracy; LR+: Positive Likelihood Ratio; LR-: Negative Likelihood Ratio

Figure 2 displays the OPLS-DA score plots of HBV (n=117) and HCV (n=86) chronic monoinfected patients, combined as a viral infection group, *versus* controls (n=42). Whereas figure 3 shows the results from modeling comparing HBV versus HCV samples.

Figure 2 – Results from OPLS-DA modeling comparing viral infection B or C group versus control samples, in Recife/PE, from 2014 to 2016. (A) Two-dimensional score plot; (B) Feature significance plot of principal components; (C) Loading plot of principal components.

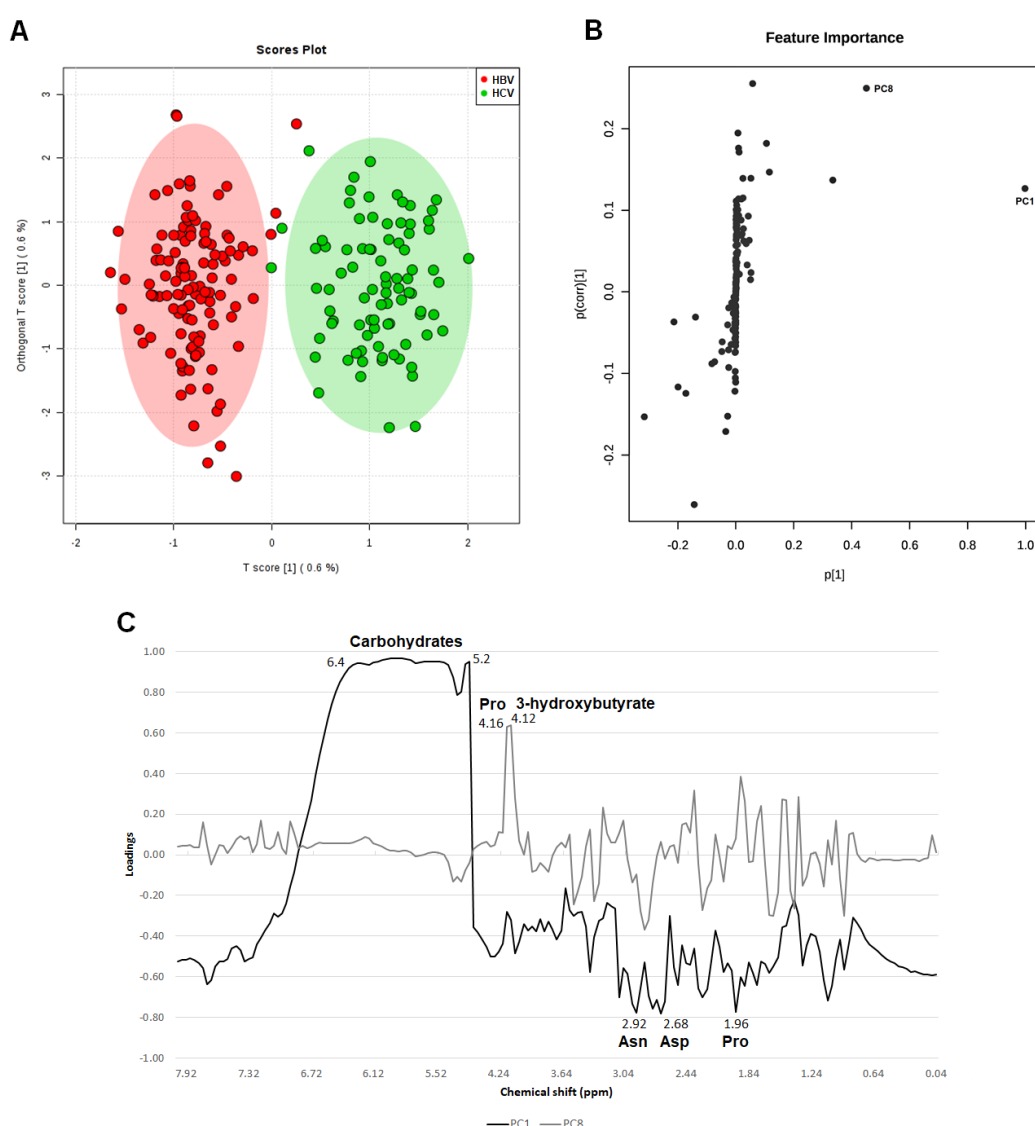


Legend: Cre: creatinine; Gluc: glucose, Glu: glutamate; Phe: phenylalanine.

The discrimination between the viral infection group and the control group (Figure 2A) was mainly based on PC1 and PC2 (Figure 2B). When analyzing the PCA loading plot (Figure 2C), PC1 showed a strong contribution of the region associated with carbohydrates and unsaturated species (δ 5.2 and 6.4 ppm), as for PC2, it was mainly the signals between δ 3.28 and 3.88 ppm, associated with phenylalanine and glucose, and also signals attributed to creatinine (δ 3.04 ppm) and glutamate (δ 2.36 ppm).

Whilst for the model comparing patients infected with HBV and HCV (Figure 3A), the discrimination was essentially based on PC1 and PC8 (Figure 3B). PC1 was strongly influenced by carbohydrates and unsaturated species (δ 5,2 e 6,4 ppm), and the signals δ 1,96, 2,68 e 2,96 ppm, associated with proline, aspartate and asparagine, while PC8 was determined by signals between δ 4,12-4,16 ppm, associated with proline and 3-hydroxybutyrate (Figure 3C).

Figure 3 – Results from OPLS-DA modeling comparing HBV versus HCV samples, in Recife/PE, from 2014 to 2016. (A) Two-dimensional score plot; (B) Feature significance plot of principal components; (C) Loading plot of principal components.



Legend: Asn: asparagine; Asp: aspartate; Pro: proline.

Table 2 shows the classification matrix of the OPLS-DA models. For the viral infection versus controls model this classification showed higher specificity (97.6%)

with Sn of 90.2%, LR+ and LR- values of 37.9 and 0.1, respectively, which indicates that the chance of the model to detect correctly the presence of HBV or HCV infection in those infected is 37.9 times higher than in the control group, with a likelihood of 97.4% of identifying post-test disease. Whereas, the HBV versus HCV model showed slightly higher sensitivity (93.4%), with Sp of 92.3%, LR+ of 12.4 and LR- of 0.05, which indicates that the chance of the model to detect correctly the presence of HCV infection in those infected is 12.4 times higher than in the HBV group, with a likelihood of 92.5% of identifying post-test disease.

DISCUSSION

Patients with HCV infection were older, and showed significantly higher liver enzymes activity levels (ALT, AST and GGT), total bilirubin, and glucose and lower levels of albumin, platelets, total cholesterol, LDL-c and triglycerides, when compared to HBV and control groups.

Although the increase in aminotransferase levels associated with hepatitis C infection tends to be more modest than that associated with hepatitis B (GIANNINI; TESTA; SAVARINO, 2005), most chronic HBV infected patients included in this study were in the HBeAg-negative phase, normal ALT and HBV-DNA concentration below 2000 IU/mL. In addition, among patients with chronic HCV infection, liver lesions are milder in those with normal serum ALT levels than those with abnormal ALT levels. However, some patients with chronic HBV or HCV infection and normal ALT activity levels may have advanced liver disease (DOR-MOHAMMADI et al., 2005; WONG et al., 2017).

Accordingly, chronic HCV infection is associated with hypolipidemia with decreased LDL, cholesterol and total cholesterol levels that increase following infection resolution (COREY et al., 2011). In the models built, even though the signals associated with HDL and LDL (δ 0.8 and δ 1.2 ppm) were not intense in the HCV *versus* control model, they were found to be higher in the control group. Embade et al. comparing patients with cirrhosis due to HCV infection and patients without fibrosis, in a NMR-based metabonomics study, observed reduced levels (85%) of cholesterol in cirrhotic patients (EMBADE et al., 2016). In addition, clinical evidence indicates that HCV infection is not only linked to the metabolism of lipids within the infected hepatocytes, but dysregulates circulating lipoprotein metabolism as well, since

circulating virions are physically associated with lipoproteins in complexes termed lipoviral particles (FELMLEE et al., 2013).

It is also reported that platelet counts decrease significantly in patients with chronic hepatitis C, advanced fibrosis and liver cirrhosis when compared with healthy controls, but not in patients with chronic hepatitis B. The platelet counts are considered a predictor of liver fibrosis and are correlated significantly with fibrotic stage, thus, platelet activation might be one of the causative factors of thrombocytopenia in patients with chronic viral hepatic diseases, especially in patients with chronic hepatitis C (FUSEGAWA et al., 2002; NIELSEN et al., 2017). In addition, liver fibrosis is reported to be significantly higher in chronic HCV infected patients than in HBV, which was showed in our study, since most HBV patients were in the HBeAg-negative phase.

The four OPLS-DA models built in our study were able to discriminate chronic HBV or HCV infected patients and to distinguish the infection according to the type of virus related. For the model comparing HBV and controls, we observed that samples from HBV patients presented negative scores, with PC1, PC2 and PC3 as the most important components for the observed discrimination. For PC2, the more relevant chemical shifts were in the region between δ 5.2 and 6.4 ppm, which was associated with carbohydrates and unsaturated species, while for PC3 was related to HDL and LDL (δ 0.8 and 1.2 ppm). In addition, PC1 was associated with aromatic and unsaturated species (δ 6.8-8.0 ppm).

Accordingly, increased concentrations of carbohydrates and unsaturated species resulted in lower PC2 scores, while elevated concentrations of HDL and LDL led to higher PC3 scores. Consequently, this produced positive OPLS-DA scores, and led the sample to be classified in the control group. However, increased concentrations of amino acids proline, asparagine and cystine resulted in higher PC2 scores, whereas elevated concentrations of unsaturated and aromatic species led to lower PC1 scores, leading to negative OPLS-DA scores and the sample to be classified in the HBV group.

This result corroborates the biochemical characteristics presented in table 1, since HBV infected patients showed lower HDL and LDL serum levels compared with the control group. Similar results were observed for glucose, where healthy volunteers presented higher serum levels than HBV infected patients. Even though these differences in table 1 did not show statistical significance, for the metabonomics model they were significant. Therefore, the metabonomics model indicated that HBV infected patients presented higher serum levels of amino acids, unsaturated and aromatic

species, and lower levels of HDL, LDL, carbohydrates and unsaturated species, when compared to the control group.

Similarly, Zheng et al. examined serum metabolic changes in chronic HBV patients and healthy individuals using an NMR-based metabolomics approach, and identified in the infected group the presence of higher levels of unsaturated lipid and amino acids histidine (δ 7.04) and phenylalanine (δ 7.32), related to the region of hydrogens bound to unsaturated or aromatic carbons. However, it was also reported a reduction in the serum levels of products of the metabolism of carbohydrates, n-acetylglycoprotein (δ 2.04) and acetone (δ 2.2) (ZHENG et al., 2017). Hou et al., also analyzing serum samples of HBV infected patients and healthy controls using gas chromatography mass spectrometry, identified a panel of metabolite markers composed of products of carbohydrates metabolism, such as citric acid and aconitic acid, and amino acids glutamine and N,N-dimethyl glycine as discriminant metabolites between groups (HOU et al., 2015).

Moreover, in these metabonomics studies evaluating patients with chronic HBV infection, the analysis of these metabolites that showed significant difference in the characterization of infection, which may provide some basis for discovering a pathogenic pathway and ideas for new targeted therapy (HOU; DUAN, 2016).

Regarding the HCV model, similar to HBV model, patients also presented negative scores. Group discrimination was associated with PC2, and the more relevant chemical shifts were signals between δ 3.28 and 3.88 ppm, which were associated with phenylalanine and glucose, and also the signals attributed to creatinine (δ 3.04 ppm), glutamate (δ 2.36 ppm), aromatic and unsaturated species (δ 6.8-8.0 ppm).

Accordingly, increased concentrations of phenylalanine, glucose, creatinine and glutamate resulted in higher PC2 score and, since they had positive loadings, it resulted in positive OPLS-DA scores, leading the sample to be classified as control group. However, elevated concentration of aromatic and unsaturated species led to lower PC1 score, since they showed negative loadings, and therefore, negative OPLS-DA scores. Thus, the HCV infected group showed higher serum levels of aromatic and unsaturated species and lower levels of amino acids, when compared with the control group.

Likewise, regarding the complications of chronic liver disease caused by HCV infection, Sands et al. observed the presence of perturbed amino acid and lipid metabolism analyzing plasma samples of chronic hepatitis C patients through 1H-

NMR-based metabonomics models. The authors reported higher levels of the aromatic amino acid tyrosine (δ 6.87) in patients with severe fibrosis, and reduced levels of alanine (δ 1.48), although, higher levels of phenylalanine (δ 7.32) and LDL (δ 0.82) were identified in patients with moderate fibrosis when compared with healthy controls (SANDS et al., 2015).

Embade et al., in addition to identifying changes in amino acid and lipids metabolism in plasma samples from patients with chronic HCV infection analyzed by ^1H -NMR spectroscopy, also found alterations in carbohydrates metabolism. Patients with HCV-induced cirrhosis presented reduced levels of acetoacetate (δ 2,30) and other carbohydrates, and amino acids glutamine (δ 2,46) and glutamate (δ 2,37). Whereas, different from our findings, the authors reported lower levels of choline (δ 3,22), and lipids, such as LDL (δ 0.84), while the control group, without fibrosis, showed increased levels of creatinine (δ 3,05) and creatine (δ 3,06) (EMBADE et al., 2016).

For the viral infection versus control model, PC1 and PC2 were the most important components, with the samples of viral infection group presenting positive OPLS-DA scores. The region assigned to carbohydrates and unsaturated species (δ 5.2 and 6.4 ppm) was very important for PC1, as for PC2, the more relevant signals were similar to HCV versus control model, showing signals associated with phenylalanine and glucose (δ 3.28 and 3.88 ppm), creatinine (δ 3.04 ppm) and glutamate (δ 2.36 ppm). Thus, patients with viral hepatitis B or C showed higher serum levels of carbohydrates and unsaturated species, amino acids and creatinine when compared with healthy subjects.

For the model comparing the two infections, PC1 and PC8 showed more importance, with the samples from HCV group showing positive OPLS-DA scores. Similar to the viral infection versus control model, the region assigned to carbohydrates and unsaturated species (δ 5.2 and 6.4 ppm) was very important for PC1, while the more relevant signals for PC8 were between δ 4,12-4,16 ppm, which were associated with proline and 3-hydroxybutyrate. In addition, PC1 was also associated with the signals related to amino acids proline (δ 1.96 ppm) aspartate (δ 2.68 ppm) and asparagine (δ 2.96 ppm), although with negative loadings.

Accordingly, increased concentrations of carbohydrates and unsaturated species contributed to higher PC1 scores, while elevated concentrations of proline and 3-hydroxybutyrate led to higher PC8 scores, and since they showed positive loadings, it resulted in positive OPLS-DA scores, and led the sample to be classified in the HCV

group. However, increased concentrations of amino acids resulted in lower PC1 scores, and since they showed negative loadings, it led to negative OPLS-DA scores and the sample to be classified in the HBV group. Therefore, HCV patients showed higher serum levels of carbohydrates and unsaturated species, proline and 3-hydroxybutyrate, while HBV patients showed higher levels of amino acids. This corroborates the data presented in the table 1, which shows that glucose levels are higher in HCV group.

Regarding the performance of the four OPLS-DA models, the viral infection versus controls model showed higher specificity (97.6%), whereas the HBV versus HCV model showed slightly higher sensitivity (93.4%) to discriminate the groups. In addition, when each viral infection was compared to the control group, it was observed a higher specificity for the HCV model (97.6%) and higher sensitivity (95.7%) for the HBV model.

Several metabonomics studies have been done to investigate metabolic changes during chronic HBV or HCV infection (GODOY et al., 2010; HOU; DUAN, 2016; YUE et al., 2016), HBV or HCV-related cirrhosis (WANG et al., 2012) and hepatocellular carcinoma (HCC) (LADEP et al., 2014). However, even though some researches tried to find new sensitive and specific biomarkers, mainly involving energy, protein and lipid metabolism, there are no uniform biomarkers determined, so it might be necessary to make larger number of clinical studies to evaluate these markers (SCHOEMAN et al., 2016; YU et al., 2017; ZHENG et al., 2017).

In addition, further studies using samples of patients from different regions of Brazil and the world would allow external validation and implementation of phases III and IV validation of diagnostic tests of the metabonomic models, in order to be widely applied in the diagnosis of hepatitis B and C in different populations.

Therefore, the metabonomics models built were able to diagnose chronic hepatitis B and C virus infection and to distinguish the infection according to the type of virus related (HBV or HCV), in a single serum sample, besides to indicate the class of compounds (metabolites) associated with the discrimination. Thus, the metabonomics strategy showed to be a promising complementary tool in clinical practice.

Acknowledgements

We would like to thank the Central Analítica laboratory of Universidade Federal de Pernambuco and the Central laboratory of Hospital das Clínicas, where the assays were performed and the scholarship funding agency CAPES.

REFERENCES

- BATISTA, A. D. et al. Proton nuclear magnetic resonance-based metabonomic models for non-invasive diagnosis of liver fibrosis in chronic hepatitis C: Optimizing the classification of intermediate fibrosis. **World Journal of Hepatology**, v. 10, n. 1, p. 105–115, 2018.
- BECKONERT, O. et al. Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. **Nature Protocols**, v. 2, n. 11, p. 2692–2703, jan. 2007.
- COREY, K. E. et al. Acute hepatitis C infection lowers serum lipid levels. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 18, n. 7, p. 1–13, 2011.
- DOR-MOHAMMADI, T. et al. Relationship between serum alanine aminotransferase levels and liver histology in chronic hepatitis C-infected patients. **Indian Journal of Gastroenterology**, v. 24, n. 2, p. 49–51, 2005.
- EASL. EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF THE LIVER. EASL recommendations on treatment of hepatitis C 2016. **Journal of Hepatology**, v. 66, n. 1, p. 153–194, 2016.
- EASL. EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF THE LIVER. EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection. **Journal of Hepatology**, v. 67, n. 0, p. 370–398, 2017.
- EMBADE, N. et al. Metabolic characterization of advanced liver fibrosis in HCV patients as studied by serum ¹H-NMR spectroscopy. **PLoS ONE**, v. 11, n. 5, p. 1–19, 2016.
- FELMLEE, D. J. et al. Hepatitis C virus, cholesterol and lipoproteins - Impact for the viral life cycle and pathogenesis of liver disease. **Viruses**, v. 5, n. 5, p. 1292–1324, 2013.
- FUSEGAWA, H. et al. Platelet activation in patients with chronic hepatitis C. **Tokai Journal of Experimental & Clinical Medicine**, v. 27, n. 4, p. 101–106, 2002.
- GIANNINI, E. G.; TESTA, R.; SAVARINO, V. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. **Canadian Medical Association Journal**, v. 172, n. 3, p. 367–379, 2005.
- GODOY, M. M. G. et al. Hepatitis C virus infection diagnosis using metabonomics. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 17, p. 854–858, dez. 2010.
- GOUVEIA, L. R. et al. Diagnosis of coinfection by schistosomiasis and viral hepatitis B or C using ¹H NMR-based metabonomics. **PloS ONE**, v. 12, n. 8, p. e0182196, 2017.

HOU, Q.; DUAN, Z. J. Metabonomic window into hepatitis B virus-related hepatic diseases. **World Journal of Hepatology**, v. 8, n. 1, p. 1–8, 2016.

HOU, Y. et al. [Exploration on serum metabolic biomarkers of hepatitis B virus infected patients based on gas chromatography-mass spectrometry]. **Se pu: Chinese Journal of Chromatography**, v. 33, n. 4, p. 383–388, 2015.

IRSHAD, M.; MANKOTIA, D. S.; IRSHAD, K. An insight into the diagnosis and pathogenesis of hepatitis C virus infection. **World Journal of Gastroenterology**, v. 19, n. 44, p. 7896–7909, 2013.

LADEP, N. G. et al. Discovery and validation of urinary metabotypes for the diagnosis of hepatocellular carcinoma in West Africans. **Hepatology**, v. 60, n. 4, p. 1291–1301, out. 2014.

LENZ, E. M.; WILSON, I. D. Analytical Strategies in Metabonomics. **Journal of Proteome Research**, v. 6, p. 443–458, 2007.

NICHOLSON, J. K. et al. Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function. **Nature Reviews**, v. 1, n. February, p. 153–161, 2002.

NIELSEN, N. S. et al. Impaired platelet aggregation and rebalanced hemostasis in patients with chronic hepatitis C virus infection. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 5, p. 1–13, 2017.

PEREIRA, L. M. M. B. et al. **Estudo de prevalência de base populacional das infecções pelos vírus das hepatites A, B e C nas capitais do Brasil**. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2010.

PEREIRA, L. M. M. B. et al. Prevalence and risk factors of Hepatitis C virus infection in Brazil, 2005 through 2009: a cross-sectional study. **BMC Infectious Diseases**, v. 13, n. 60, p. 1–12, 2013.

SACKETT, D. L.; HAYNES, R. B. Evidence base of clinical diagnosis: the architecture of diagnostic research. **British Medical Journal**, v. 324, n. March, p. 539–541, 2002.

SAEED, U.; WAHEED, Y.; ASHRAF, M. 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**, v. 4, n. 2, p. 88–96, 2014.

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

SCHOEMAN, J. C. et al. Metabolic characterization of the natural progression of chronic hepatitis B. **Genome Medicine**, v. 8, n. 64, p. 1–13, 2016.

VILLAR, L. M. et al. Update on hepatitis B and C virus diagnosis. **World Journal of Virology**, v. 4, n. 4, p. 323–342, 2015.

WANG, X. et al. Urinary metabolite variation is associated with pathological progression of the post-hepatitis B cirrhosis patients. **Journal of Proteome Research**, v. 11, n. 7, p. 3838–3847, 2012.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines on Hepatitis B and C Testing**. Geneva: World Health Organization, 2017.

WONG, R. J. et al. Significant Hepatic Fibrosis Among Treatment-Naive Chronic Hepatitis B Virus With Increased Hepatitis B Virus DNA and Normal Alanine Aminotransferase. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 16, n. 1, p. 146–148, 2017.

XIA, J.; WISHART, D. S. Using metaboanalyst 3.0 for comprehensive metabolomics data analysis. **Current Protocols in Bioinformatics**, v. 55, n. 14, p. 14.10.1-14.10.91, 2016.

YU, M. et al. Metabonomics Research Progress on Liver Diseases. **Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 2017, n. Article ID 8467192, p. 1–10, 2017.

YUE, D. et al. Hepatitis B virus X protein (HBx)-induced abnormalities of nucleic acid metabolism revealed by (1)H-NMR-based metabonomics. **Scientific Reports**, v. 6, n. 24430, p. 1–13, 2016.

ZHENG, H. et al. Metabolic characterization of hepatitis B virus-related liver cirrhosis using NMR-based serum metabolomics. **Metabolomics**, v. 13, n. 10, p. 1–9, 2017.

APÊNDICE C – Artigo 2 em inglês

THE USE OF METABONOMICS IN THE IDENTIFICATION OF LIVER ENZYMES ACTIVITY ALTERATIONS IN HBV OR HCV INFECTED PATIENTS

Joelma Carvalho Santos^{1*}; Liana Ribeiro Gouveia²; Andrea Dória Batista³; Tássia Brena Barroso Carneiro da Costa²; Izolda Maria Fernandes de Moura^{1,3}; Michele Maria Gonçalves de Godoy³; Ronaldo Dionísio Silva^{2,3}; Edmundo Pessoa de Almeida Lopes^{1,3}; Ricardo Oliveira Silva².

¹Postgraduate Program in Tropical Medicine, Center for Health Sciences, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco, Brazil.

²Postgraduate Program in Chemistry, Fundamental Chemistry Department, Center for Exact and Natural Sciences, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco, Brazil.

³Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco, Brazil.

*Corresponding author

Email: joelma.carvalho04@yahoo.com

ABSTRACT

Background and aims: The increasing use of omics strategy has shown a more complex importance of liver enzymes in the regulation of systemic metabolic function and assessment of chronic hepatitis B and C infection. The aim of this study was to discriminate patients with and without liver enzymes (ALT, AST and GGT) activity alterations due to HBV or HCV infection, in a single serum sample through ¹H-NMR-based metabonomics models (MMs). **Patients and methods:** The study included 117 monoinfected patients previously diagnosed with HBV and 86 with HCV. Liver function tests were carried out using a Wiener Lab® analyzer and ¹H-NMR spectra were measured on a Varian Unity Plus 300 MHz spectrometer. The MMs were based on Orthogonal Partial Least Squares – Discriminant Analysis (OPLS-DA) using MetaboAnalyst 3.6 data processing platform. **Results:** Three OPLS-DA MMs were initially built to discriminate patients with increased liver enzyme activity, regardless the type of virus related to the infection: (1) ALT; (2) AST; and (3) GGT. In the ALT model, we observed sensitivity (Sn) of 95.4%, specificity (Sp) of 93.9% with higher concentration of carbohydrates and lower levels of HDL and LDL, amino acids and

aromatic and unsaturated species in the higher ALT activity group. Similar values for the AST model with Sn of 95.5%, Sp of 96.5%, and higher AST activity were also associated with higher concentration of carbohydrates and lower levels of amino acids. In the GGT model we found Sn of 90.8%, Sp of 95.2%, however without statistical significance. As for the analysis of liver enzymes activity model, according to HBV or HCV infection, four more MMs were built: (1) ALT in HBV; (2) AST in HBV; (3) ALT in HCV; and (4) AST in HCV. It was observed a higher performance for the ALT model in HBV patients, with Sn of 96.1%, Sp 91.2%, whereas for HCV patients, the AST model showed higher performance with Sn of 95.2%, Sp of 100%. **Conclusion:** The MMs built could distinguish patients with and without AST and ALT activity alterations, and to identify the classes of compounds associated with each discrimination, using a single ^1H -NMR spectra, showing a further application of the metabolomics strategy, and for the assessment of liver function in these patients.

Keywords: Liver enzymes. Viral hepatitis. Metabolomics.

INTRODUCTION

High levels of liver enzymes alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and gamma-glutamyl transferase (GGT) are predictive of liver disease and can reflect liver injury, including a wide range of etiologies from viral hepatitis to fatty, alcoholic or toxic liver disease (SOOKOIAN et al., 2015; VAN BEEK et al., 2013) even in asymptomatic patients (VERSLYPE, 2004).

Accordingly, measurement of liver enzymes activity in circulation is still the most common test used in clinical practice to evaluate hepatocyte injury (SOOKOIAN et al., 2015), even with these assays not been able to discriminate among different causes (FORNACIARI et al., 2014; SOOKOIAN et al., 2015). In addition, the serum levels of liver enzymes are variable and might be sub estimated, since in the 70s, when a healthy population was recruited to establish the normal range, it could have included patients with subclinical liver disease, such as chronic hepatitis C or non-alcoholic fat liver disease (GIANNINI; TESTA; SAVARINO, 2005; LOPES et al., 2006).

In patients with chronic hepatitis B or C, monitoring liver enzymes activity levels is important to characterize the stage of liver disease, guide antiviral therapy decisions and need for surveillance, since the capacity to accurately estimate AST and ALT levels is essential to calculate non-invasive tests scores, such as the “AST-to-platelet

ratio index" (APRI) and the "fibrosis index based on four factors" FIB-4 index, as an alternative to exclude advanced fibrosis (WHO, 2015).

In addition, the "omics" strategy have changed the classical conception that aminotransferases are merely indicators of hepatocyte membrane disruption and have given way to a more complex view of the importance of these enzymes in the regulation of systemic metabolic function (SOOKOIAN et al., 2015). Therefore, there is a need for more accurate and sensitive diagnostic techniques, and metabonomics, as one of the well-established "omics" disciplines, works as a strategy to investigate diseases in humans (BALOG et al., 2011).

This strategy can be used when there is interest in classifying samples by their biochemical status, whether as a result of a disease or another factor that caused a change in the profile of endogenous metabolites (NICHOLSON et al., 2002). Metabonomics in combination with nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy and multivariate statistical analysis allows not only sample classification, but also an effective interpretation of the biochemical pathways and an identification of candidate biomarkers (BALOG et al., 2011). This technique offers a non-invasive analysis and with only one serum sample it would be possible to assess a range of infections, such as hepatitis C (GODOY et al., 2010), coinfection by schistosomiasis and hepatitis B or C (GOUVEIA et al., 2017), HIV (SITOLE; WILLIAMS; MEYER, 2012) and liver fibrosis (BATISTA et al., 2018; EMBADE et al., 2016; SANDS et al., 2015).

Therefore, the aim of this study was to identify liver enzymes (ALT, AST and GGT) activity alterations in chronic HBV or HCV patients, in a single serum sample through ¹H-NMR-based metabonomics models.

METHODS

Participants and sample collection

This cross-sectional phase I/II validation diagnostic study (SACKETT; HAYNES, 2002) included 203 adult patients, 104 women (51.2%) and 99 men (48.8%) aged between 18 and 83 years (46.9 ± 15.4), attending the Hepatology outpatient clinic at the Hospital das Clínicas of Universidade Federal de Pernambuco from October 2012 to September 2016. From these 203 patients, 117 (57.6%) were previously diagnosed with chronic HBV monoinfection (positive for both HBsAg and anti-HBc for over 6

months and serum HBV-DNA positive) and 86 (42.4%) with HCV (anti-HCV positivity for over 6 months and serum HCV-RNA positive).

Whole blood samples were immediately processed for serum. Part of the samples was stored at -20 °C until the NMR analysis was performed, and another part was used for laboratory tests.

Patients receiving any antiviral treatment, undergoing immunosuppressive therapy, HIV, HBV-HCV and/or schistosomiasis coinfection were excluded from the study.

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

Assessment of liver enzymes and other laboratory tests

Sera collected from all patients were analyzed and ALT, AST and GGT tests, and other liver evaluation tests, including albumin, bilirubin, as well as lipid profile tests (total cholesterol, HDL-C, LDL-C and triglycerides) were carried out using a Wiener Lab® kits in a Wiener Lab® autoanalyzer (Wiener Lab Group, Argentina), according to the manufacturer's instructions. Platelets quantification was performed using Pentra 120® automated hematology analyzer (Horiba ABX Diagnostics), and the determination of INR using ACL TOP 500® analyzer (Werfen company), according to manufacturer's instructions.

Enzyme activity levels were then transformed to approximate normality (enzyme level in U/L divided by the corresponding reference value), according to the manufacturer's instructions: for ALT < 41 U/L (males) and < 31 U/L (females), for AST < 38 U/L (males) and < 32 U/L (females), and for GGT < 50 U/L (males) and < 32 U/L (females). Afterwards, these patients were stratified in groups based on the upper limits of normal (ULN) (VERSLYPE, 2004) according to their higher liver enzymes activity levels (> 1 time the ULN) or normal levels ($\leq$ 1 time the ULN).

¹H-NMR analysis

For NMR analysis, aliquots of 400 μ L of serum samples were mixed with 200 μ L of D₂O (Deuterium oxide, D 99.9%, Cambridge Isotope Laboratories, Inc., Tewksbury, USA) using 5 mm NMR tubes. All ¹H-NMR spectra were measured on a

Varian Unity Plus 300 MHz spectrometer (Varian Inc., Palo Alto, USA), using lactate (δ 1.33 ppm) as the chemical shift reference. During the acquisition of the ^1H -NMR spectrum it was used a sequence of pulses with presaturation (PRESAT) of the water signal hyphenated to Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) pulse sequence, which was employed as T2 filter. It was used a spectral window of 4.8 kHz, a saturation delay of 2.0 s, an acquisition time of 1.704 s, a RF pulse of 90 °C, a temperature of 25 °C, 88 cycles, tau equal to 0.0004 s, bigtau equal to 0.07 s, 128 scans and a line broadening of 0.3 Hz. The phase and baseline corrections were corrected manually in the spectrometer. Using the Mestrenova 9.0 software, the region between δ 8.0 and 0.04 ppm was reduced to 183 bins with 0.04 ppm-wide bins, excluding the region between δ 5.16 and 4.52 ppm, to eliminate the water signal.

Statistical analysis

After the construction of the bins, a matrix containing 203 cases (rows) and 187 variables (columns) was built. These 187 variables are the 183 bins of the ^1H -NMR spectrum plus 1 column with the patient's condition (HBV or HCV), 3 columns about the situation of the enzymes ALT, AST and GGT (if they are high or normal). From this matrix was originated all the matrixes that were submitted to multivariate statistical analysis.

Thus, the matrices obtained were analyzed using MetaboAnalyst 3.6 data processing platform (XIA; WISHART, 2016). In the pre-processing step, SNV (Standard Normal Variate) was used in the samples, and after, a principal component analysis (PCA) was performed and the PCA's score matrix was used as input matrix for the orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA). The validation of the OPLS-DA model was based on the permutation test with 2000 permutations of the class label.

The OPLS-DA score plots were used to investigate the discrimination between samples. Afterwards, feature importance plots were projected in order to identify the variables (Principal Component) more relevant for discrimination. Once identified the most relevant PCs, loading plots were used to identify the most relevant spectral regions for these PCs. These regions were compared with findings in the literature and according to the Human Metabolome Database (HMDB) (WISHART et al., 2009), to identify the classes of compounds associated with observed discrimination.

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

Metabonomics model's performance analysis

For each OPLS-DA model, a 2x2 contingency table was used to calculate sensitivity (Sn), specificity (Sp), positive likelihood ratio (LR+), negative likelihood ratio (LR-), accuracy (A) and 95% confidence interval (95% IC) for each parameter.

Likelihood ratio analysis was applied instead of predictive values, since it does not depend on the prevalence of the outcome that the test is used for. The following parameters were used: an LR+ above 10 indicating an increased probability post-test that the alteration was present, and an LR- below 0, indicating a high probability of absence of the alteration post-test.

RESULTS

The serum levels of ALT of 88 (43.3%), AST of 89 (43.8%) and GGT of 98 (48.3%) patients with chronic hepatitis B or C, were elevated compared to the reference values of normality.

Table 1 shows the demographic characteristics, and biochemical and liver evaluation test of 203 patients with HBV or HCV infection according to higher serum levels versus normal for each enzyme. Significant differences ($p<0.05$) were found between the two groups of patients, except for gender, INR, triglycerides, HDL-c and total cholesterol levels.

In general, when one of the enzymes, ALT, AST or GGT, presented serum levels above the ULN, it was followed by some liver evaluation test alterations and glucose, according to Table 1.

In addition, ALT, AST and GGT activity levels were approximately 2.5 times higher in the altered enzymes group, and also with higher values for the variables age, total bilirubin and alkaline phosphatase (only for AST and GGT) and glucose. However, albumin levels in patients with higher AST and GGT activity, LDL-c (only for GGT) and

platelets count (only for ALT and AST) were slightly higher in the normal enzymes group.

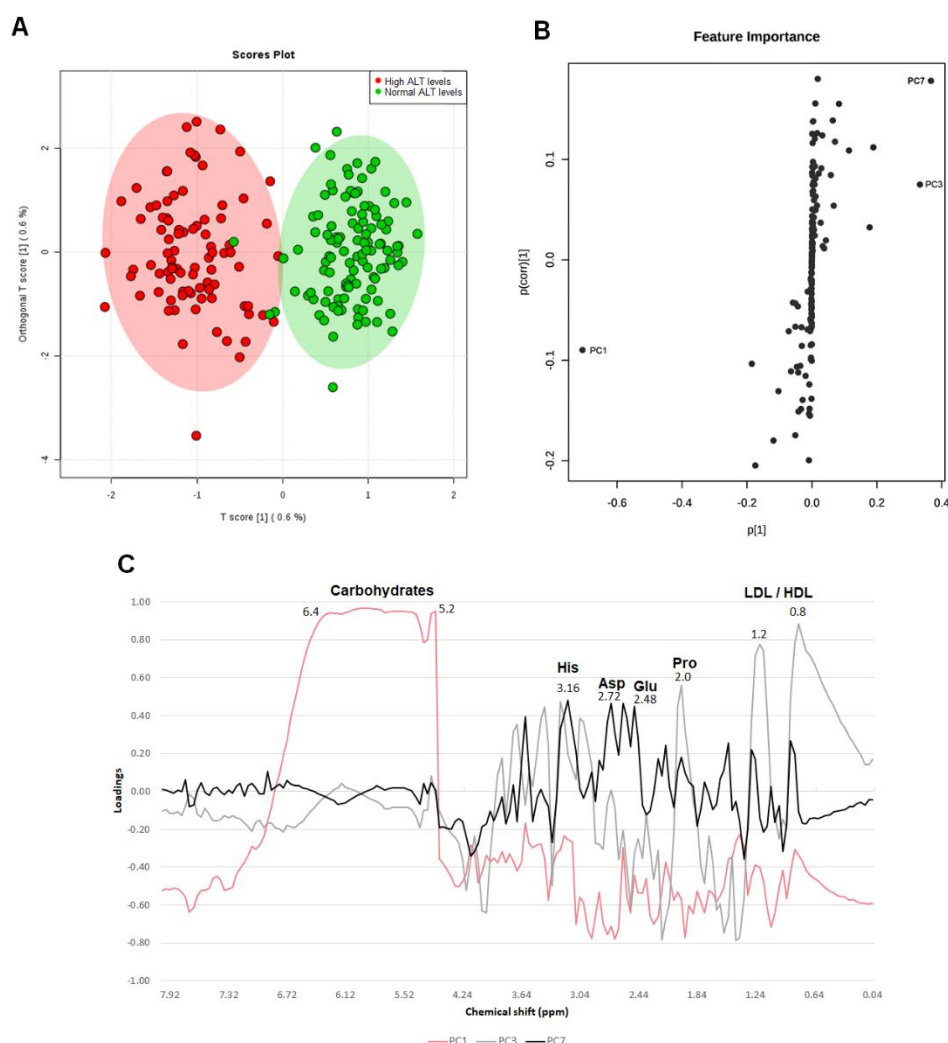
Table 1 – Demographic characteristics, and biochemical and liver evaluation tests of 203 patients with chronic HBV or HCV according to higher serum levels (>1x LSN) versus normals (≤1x LSN) of ALT, AST and GGT, in Recife/PE, from 2014 to 2016.

Characteristics	ALT >1x ULN (n=88)		ALT ≤1x ULN (n=115)		p
Gender (M/F, n, %)	45/88	(51.1/48.9)	54/61	(47/53)	0.035 ^a
Age (years)*	52	±15.2	43	±14.3	<0.001 ^b
ALT (/ULN)	1.74	(1.27-2.95)	0.65	(0.51-0.80)	<0.001 ^c
AST (/ULN)	1.74	(1.13-2.66)	0.69	(0.57-0.86)	<0.001 ^c
GGT(/ULN)	1.69	(0.96-2.97)	0.69	(0.50-1.10)	<0.001 ^c
ALP (/ULN)	1.25	(0.92-1.78)	1.18	(0.80-1.65)	0.213 ^c
TBil (mg/dL)	0.64	(0.50-0.90)	0.50	(0.40-0.80)	0.011 ^c
Albumin (g/dL)	4.2	(3.9-4.5)	4.3	(4.1-4.4)	0.430 ^c
Platelets (10 ⁹ /mm ³)*	199	±73	222	±71	0.030 ^b
INR	1.13	(1.00-1.16)	1.07	(1.03-1.13)	0.697 ^c
Glucose (mg/dL)	91	(82-102)	84	(76-98)	0.007 ^c
Total cholesterol (mg/dL)*	173.1	±40.7	173.9	±43.2	0.588 ^b
HDL-c (mg/dL)*	50.6	(41-60.5)	48.6	(42.3-59)	0.622 ^c
LDL-c (mg/dL)	96.5	±36.01	102	±37.4	0.743 ^b
Triglycerides (mg/dL)	99.5	(69.3-141.4)	116.8	(72-153)	0.994 ^c
	AST>1x ULN (n=89)		AST ≤1x ULN (n=114)		
Gender (M/F, n, %)	40/49	(44.9/55.1)	59/55	(51.8/48.2)	0.335 ^a
Age (years)*	54.8	±14.3	40.8	±13.2	<0.001 ^b
ALT (/ULN)	1.71	(1.11-2.86)	0.66	(0.51-0.86)	<0.001 ^c
AST (/ULN)	1.74	(1.24-2.59)	0.68	(0.57-0.81)	<0.001 ^c
GGT(/ULN)	1.69	(0.96-3.00)	0.67	(0.50-1.10)	<0.001 ^c
ALP (/ULN)	1.29	(0.98-1.87)	1.13	(0.80-1.48)	0.011 ^c
TBil (mg/dL)	0.60	(0.50-1.00)	0.50	(0.40-0.80)	0.009 ^c
Albumin (g/dL)	4.2	(3.8-4.4)	4.3	(4.1-4.5)	0.003 ^c
Platelets (10 ⁹ /mm ³)*	194	±74	226	±68	0.002 ^b
INR	1.06	(1.00-1.14)	1.08	(1.02-1.14)	0.412 ^c
Glucose (mg/dL)	91	(82-102)	85	(76,2-98)	0.027 ^c
Total cholesterol (mg/dL)*	171.6	±44.5	175.1	±40.04	0.591 ^b
HDL-c (mg/dL)*	50.6	(43.8-60.5)	47.7	(41-58.8)	0.138 ^c
LDL-c (mg/dL)	94.7	±37.25	103.6	±36.05	0.122 ^b
Triglycerides (mg/dL)	95.4	(68.1-141.4)	94.8	(72.6-153)	0.745 ^c
	GGT >1x ULN (n=98)		GGT ≤1x ULN (n=105)		
Gender (M/F, n, %)	43/55	(43.9/56.1)	56/105	(53.3/46.7)	0.144 ^a
Age (years)*	51	±15.1	43.1	±14.7	<0.001 ^b
ALT (/ULN)	1.32	(0.81-2.52)	0.72	(0.51-1.00)	<0.001 ^c
AST (/ULN)	1.29	(0.85-2.34)	0.73	(0.59-1.00)	<0.001 ^c
GGT(/ULN)	1.83	(1.32-3.00)	0.59	(0.48-0.79)	<0.001 ^c
ALP (/ULN)	1.34	(0.95-1.91)	1.13	(0.78-1.43)	0.007 ^c
TBil (mg/dL)	0.60	(0.50-0.80)	0.60	(0.40-0.80)	0.280 ^c
Albumin (g/dL)	4.2	(3.9-4.4)	4.3	(4.1-4.5)	0.002 ^c
Platelets (10 ⁹ /mm ³)*	204	±77	219	±67	0.147 ^b
INR	1.07	(1.00-1.14)	1.07	(1.02-1.13)	0.991 ^c
Glucose (mg/dL)	91	(81.4-101.5)	84.2	(76-96.2)	0.007 ^c
Total cholesterol (mg/dL)*	166.9	±44.8	179.4	±38.7	0.051 ^b
HDL-c (mg/dL)*	48	(40-60)	51	(42.8-59.5)	0.820 ^c
LDL-c (mg/dL)	91.5	±36.7	106.7	±35.5	0.008 ^b
Triglycerides (mg/dL)	104.5	(70.6-147.3)	91.8	(71.1-144.1)	0.378 ^c

^aChi-square test; ^bUnpaired *t* teste; ^cMann-Whitney test; ^dFisher's exact test. Data presented as median values (interquartile range in brackets) except those marked with an asterisk (*) which are presented as mean $\pm$ standard deviation. P values in bold denote the categories that differ significantly between groups. **ALP**: alkaline phosphatase; **ALT**: alanine aminotransferase; **AST**: aspartate aminotransferase; **GGT**: gamma-glutamyl transferase; **HDL-c**: high density lipoprotein cholesterol; **INR**: international normalized ratio; **LDL-c**: low density lipoprotein cholesterol; **TBil**: total bilirubin; **ULN**: upper limits of normal.

To assess liver enzymes activity, three OPLS-DA models (ALT, AST and GGT) were built from serum samples of HBV (n=117) or HCV (n=86) chronic monoinfected patients, regardless the type of virus related to the infection. Figure 1 presents the results from OPLS-DA modeling built to identify high ATL activity levels, whereas figure 2 shows the results from the model comparing samples of patients with increased and normal AST activity.

Figure 1 – Results from OPLS-DA modeling comparing samples of increased ALT activity levels versus normal in 203 HBV or HCV infected patients, in Recife/PE, from 2014 to 2016. (A) Two-dimensional score plot; (B) Feature significance plot of principal components; (C) Loading plot of principal components.



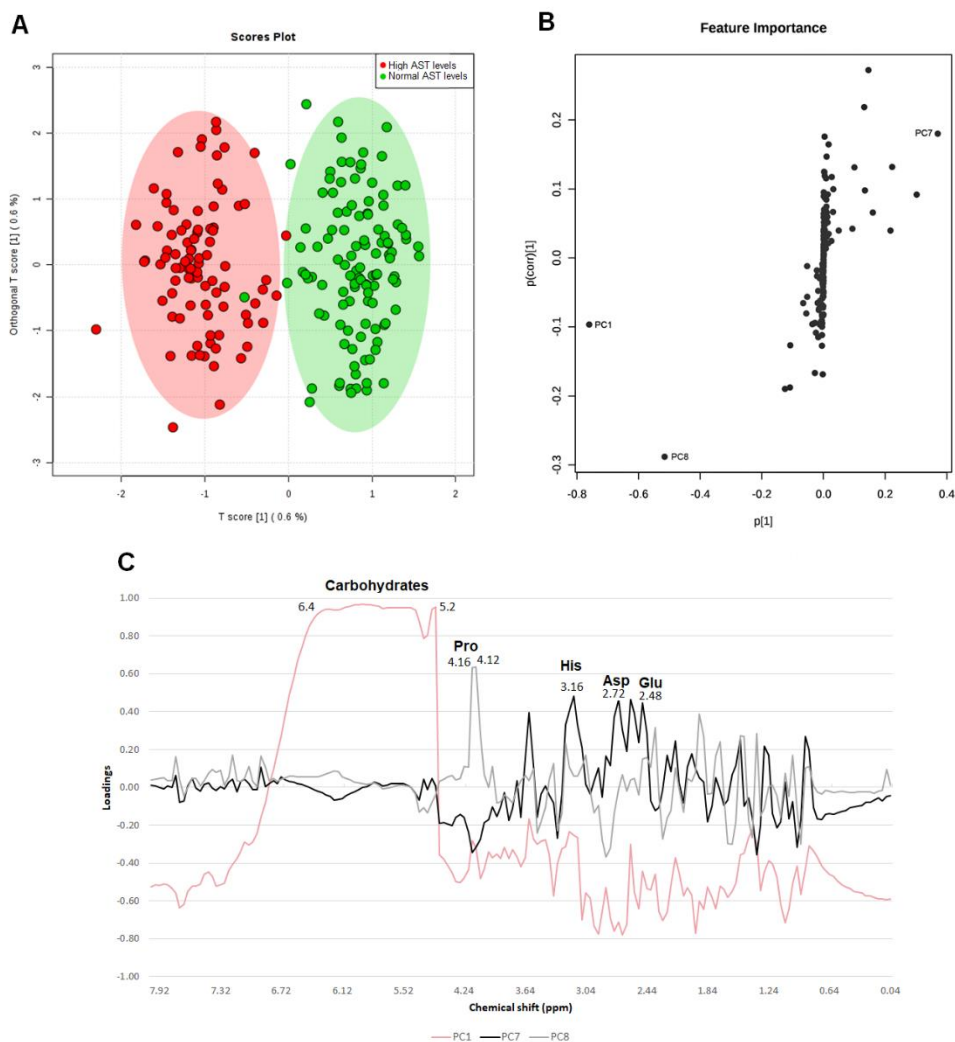
Legend: Asp: aspartate; Glu: glutamate; HDL: high density lipoprotein; His: Histidine; LDL-c: low density lipoprotein; Pro: proline.

OPLS-DA score plots for both models (Figure 1A and 2A) showed clear discrimination between groups (High ALT levels versus normal; high AST levels versus normal).

According to the feature importance plot that shows the importance of the variables for the discrimination, it was observed for the ALT model that the discrimination between groups were mainly based on PC1, PC3 and PC7 (Figure 1B). PC1 was strongly determined by the spectral region between δ 5.2 and 6.4 ppm, which is associated with carbohydrates and unsaturated species, while PC3 was strongly influenced by δ 0.8 and 1.2 ppm both associated with the alkyl chain of HDL and LDL and by δ 2.0 ppm associated with proline. For PC7, it was observed an influence of the signal δ 3.16 ppm associated with histidine and the region between δ 2.48 and 2.72 ppm related to glutamine and N-acetylaspartic acid, a derivative of aspartic acid (Figure 1C).

For the AST model, group discrimination was associated with PC1, PC7 and PC8 (Figure 2B). Similar to ALT model, it was observed a strong contribution of the region associated with carbohydrates and unsaturated species (δ 5.2 and 6.4 ppm) for PC1, and amino acids (δ 3.16 ppm, δ 2.48-2.72 ppm) for PC7. For PC8, signals between δ 4.12-4.16 were associated with proline and 3-hydroxybutyrate (Figure 2C). Regarding the GGT model (Appendix E, Figure 1), PC4, PC7 and PC8 were associated with discrimination, although the results were less satisfactory in the discrimination between both groups.

Figure 2 – Results from OPLS-DA modeling comparing samples of increased AST activity levels versus normal in 203 HBV or HCV infected patients, in Recife/PE, from 2014 to 2016. (A) Two-dimensional score plot; (B) Feature significance plot of principal components; (C) Loading plot of principal components.



Legend: Asp: aspartate; Glu: glutamate; His: Histidine; Pro: proline.

Table 2 shows the classification matrix of the OPLS-DA models. For the high versus normal liver enzymes activity model this classification showed higher performance for the AST model with a Sn of 95.5%, Sp of 96.5%, LR+ and LR- values of 27.2 and 0.05, respectively, which indicates that the chance of the model to detect higher AST correctly in those with AST alteration is 27.2 times higher than in the normal AST group, with a likelihood of 96,4% of identifying post-test alteration. Followed by the ALT model, with Sn of 95.4%, Sp 93.9%, LR+ of 15.7 and LR- of 0.05. The GGT model showed Sn of 90.8%, Sp 95.2%, LR+ 19.1 and LR- 0.09.

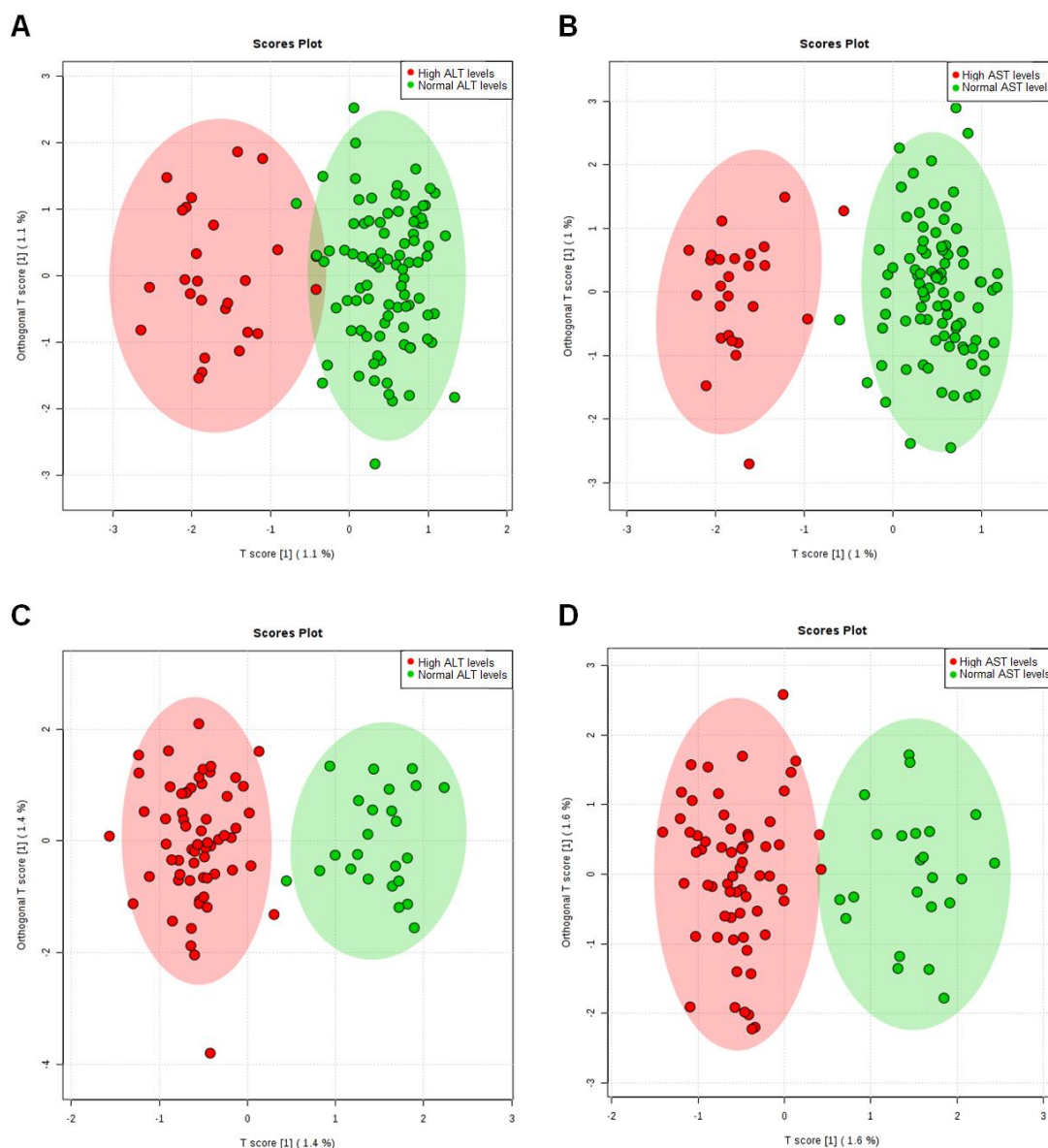
Table 2 – Performance of the OPLS-DA metabonomic models to identify elevated ALT, AST and GGT enzymes serum levels in patients with chronic HBV or HCV infection, in Recife/PE, from 2014 to 2016.

Enzymes levels												
Model (N=203)	ALT		<i>P</i> ^a	Sensitivity		Specificity		LR+		LR-		A
	>1.0	≤1.0		(%)	CI _{95%}	(%)	CI _{95%}	CI _{95%}	CI _{95%}	CI _{95%}	(%)	
>1.0	84	7	<0.001	95.4	88.8-98.8	93.9	87.9-97.5	15.7	7.6-32.2	0.05	0.02-0.13	94.6
≤1.0	4	108										
AST												
>1.0	85	4	<0.001	95.5	88.9-98.8	96.5	91.3-99	27.2	10.4-71.3	0.05	0.02-0.12	96.1
≤1.0	4	110										
GGT												
>1.0	89	5	<0.001	90.8	83.3-95.7	95.2	89.2-98.4	19.1	8.1-45	0.09	0.05-0.18	93.1
≤1.0	9	100										
Enzymes levels in HBV												
Model (N=117)	ALT		<i>P</i> ^a	Sensitivity		Specificity		LR+		LR-		A
	>1.0	≤1.0		(%)	CI _{95%}	(%)	CI _{95%}	CI _{95%}	CI _{95%}	CI _{95%}	(%)	
>1.0	25	8	<0.001	96.1	80.4-99.9	91.2	83.4-96.1	10.9	5.6-21.3	0.04	0.01-0.29	92.3
≤1.0	1	83										
AST												
>1.0	24	7	<0.001	92.3	74.9-99	92.3	84.8-96.9	12	5.8-24.7	0.08	0.02-0.32	92.3
≤1.0	2	84										
Enzymes levels in HCV												
Model (N=86)	ALT		<i>P</i> ^a	Sensitivity		Specificity		LR+		LR-		A
	>1.0	≤1.0		(%)	CI _{95%}	(%)	CI _{95%}	CI _{95%}	CI _{95%}	CI _{95%}	(%)	
>1.0	58	1	<0.001	93.6	84.3-98.2	95.8	78.9-99.9	22.4	3.3-153.1	0.07	0.03-0.17	94.2
≤1.0	4	23										
AST												
>1.0	60	0	<0.001	95.2	86.7-99.1	100	85.2-100	45.4 ⁺	2.9-705.1	0.06 ⁺	0.02-0.16	96.5
≤1.0	3	23										

^aFisher's exact test; *Estimated value; A: Accuracy; LR+: Positive Likelihood Ratio; LR-: Negative Likelihood Ratio

Since ALT and AST models displayed better results, they were applied to the analysis of enzymes activity model stratified by the type of virus related to the infection: (1) ALT in HBV; (2) AST in HBV; (3) ALT in HCV; (2) AST in HCV. Figure 3 presents the OPLS-DA score plots comparing high ALT and AST activity level model versus normal, according to the type of virus related to the infection (HBV or HCV), showing clear discrimination between groups.

Figure 3 – OPLS-DA two-dimensional score plots for high versus normal liver enzymes activity samples stratified by HBV or HCV infection, in Recife/PE, from 2014 to 2016. (A) ALT model and (B) AST model for 117 HBV chronic infected patients. (C) ALT model and (D) AST model for 86 HCV chronic infected patients.



Regarding the feature importance plot that shows the importance of the variables for the discrimination, it was observed for both ALT models in HBV (Appendix E, Figure 2) and HCV infected patients (Appendix E, Figure 3), that the discrimination between groups was mainly based on PC1, associated with carbohydrates and unsaturated species (δ 5.2 and 6.4 ppm). For the ALT model in HBV patients, PC1 was associated with the signals δ 1.96, 2.68 and 2.96 ppm related to proline, aspartate and asparagine. For the ALT model in HCV patients, a contribution of PC2 and PC4

was also observed. PC4 was influenced by the region between δ 4.24 and 4.48 ppm, associated with threonine. In the opposite direction, PC2 was influenced by the spectral region between δ 6.7 and 8.0 ppm, which was associated with unsaturated and aromatic species, while PC1 was influenced by δ signals 2.72 and 3.08 ppm, related cysteine and N-acetylaspartic acid.

For the AST model in HBV infected patients (Appendix E, Figure 4), the discrimination between groups was associated with PC1 and PC6. Likewise, for PC1, a strong contribution of the region associated with carbohydrates and unsaturated species, and for PC6, with the signals δ 2.48 and 3.8 ppm, related to glutamate and glucose, and in the opposite direction, with the signal δ 1.84 ppm, related to lysine. When analyzing the AST in HCV patients (Appendix E, Figure 5), PC1, PC4 and PC6 were the most important PCs, with PC1 strongly associated with carbohydrates and unsaturated species, PC4 with a region related to threonine (δ 4.24 and 4.48 ppm), and PC6 influenced by the signals δ 1.6, 2.24 and 2.84 ppm, related to the amino acids arginine, valine and aspartate, respectively.

As for the classification matrix of the OPLS-DA models for the high versus normal liver enzymes activity model stratified by HBV or HCV infection (Table 2), it was observed a higher performance for the ALT model in HBV patients, with Sn of 96.1%, Sp 91.2%, LR+ of 10.9 and LR- of 0.04, when compared to the AST model, which indicates that the chance of the model to detect higher ALT correctly in HBV infected patients is 10.9 times higher than in the normal ALT group, with a likelihood of 91.6% of identifying post-test alteration. Whereas for HCV patients, the AST model showed higher performance with Sn of 95.2%, Sp of 100%, LR+ of 45.4 and LR- of 0.06, which indicates that the chance of the model to detect higher AST correctly in HCV infected patients is 45.4 times higher than in the normal AST group, with a likelihood of 97.8% of identifying post-test alteration.

DISCUSSION

Patients with high ALT, AST and GGT activity serum levels were older, and in general, showed significantly higher levels of some liver evaluation tests and glucose when compared to the patients with normal enzyme activity.

Godoy et al. in a pilot study involving ^1H -NMR spectrometry on urine samples for the diagnosis of HCV infection registered alterations in the metabolic profile related to the liver aggression caused by the HCV infection with serum levels of the AST, ALT and GGT enzymes were higher in the disease group (GODOY et al., 2010).

The three OPLS-DA models initially built in our study were able to discriminate patients with higher liver enzymes, regardless the type of virus related to the infection, although, ALT and AST models displayed better results when compared to GGT models. Even though GGT is found in the liver and biliary epithelial cells, it is more of a sensitive marker of hepatobiliary disease and non-specific to its cause (PRATT; KAPLAN, 2000). In addition, GGT levels may be above the upper reference value in about 30% of patients with chronic HCV infection (GIANNINI; TESTA; SAVARINO, 2005) and there are a variety of GGT isoforms that differ in their carbohydrate content or structure (TARGHER, 2010) with differential specificity in the diagnosis of liver diseases (FORNACIARI et al., 2014).

For ALT and AST models, regardless and according to the type of virus related to the infection, we observed that samples from patients with increased liver enzyme activity presented negative scores, with PC1 as the most important component in the discrimination.

In addition, for the ALT model, regardless the type of virus related to the infection, PC3 and PC7 were also relevant, while PC2 and PC4 showed influence on the ALT model in HCV patients. For PC1, the most important chemical shifts were associated with carbohydrates and unsaturated species (δ 5.2 and 6.4 ppm), while for PC3, the signals centered at δ 0.8 and 1.2 ppm were assigned to lipids (HDL and LDL).

For the ALT model in HBV infected patients, PC1 also showed association with regions related to amino acids proline (δ 1.96 ppm), aspartate (δ 2.68 ppm) and asparagine (δ 2.96 ppm), while amino acids cysteine (3.08 ppm) and N-acetylaspartic acid (δ 2.72 ppm) were associated with the ALT model in HCV patients. Similarly, PC4 and PC7 were also associated with amino acid regions, with PC4 related to threonine (δ 4.24 ppm), and PC7 to histidine (δ 3.16 ppm), glutamine (δ 3.16 ppm), and to N-

acetylaspartic acid (δ 2.72 ppm). PC2, however, was associated with unsaturated and aromatic species (δ 6.7-8.0 ppm).

Accordingly, increased concentrations of carbohydrates and unsaturated species resulted in higher PC1 score and, consequently, negative OPLS-DA scores, leading the sample to be classified as high ALT activity group. However, increased concentrations of HDL, LDL, amino acids, unsaturated and aromatic species resulted in higher PC3, PC7 and PC2 scores and positive OPLS-DA scores, which led the sample to be classified in the normal ALT group.

Therefore, patients with higher ALT activity showed increased serum levels of carbohydrates and lower levels of HDL and LDL, amino acids, unsaturated and aromatic species, when compared to the group with normal ALT activity. This result corroborates the biochemical characteristics presented in Table 1, since patients with increased ALT activity showed an increase in glucose levels and lower levels of LDL. Although the LDL levels did not present significant difference, this difference was enough to be observed in the discrimination of the metabonomics models.

Regarding the AST model, regardless the type of virus related to the infection, PC7 and PC8 were also important in the discrimination. Similar to ALT model, PC1 was influenced by carbohydrates and unsaturated species (δ 5.2 and 6.4 ppm) in the higher AST activity group, and by the amino acids histidine (δ 3.16 ppm), glutamine (δ 3.16 ppm), and N-acetylaspartic acid (δ 2.72 ppm) at PC7.

Likewise, for the AST model, according to the type of virus related to the infection, besides PC1, PC6 showed importance for the HBV infected patients model, and PC4 and PC6 for HCV patients. In both models, associations with amino acid regions in PC6 were identified, with signals attributed to arginine (δ 1.6 ppm), valine (δ 2.24 ppm), and aspartate (δ 2.84 ppm) in the AST model in HBV infected patients, and to glutamate (δ 2.48 ppm) and lysine (δ 1.84 ppm) in patients HCV patients. For the AST model in HBV patients, it was observed a contribution of signals associated with lysine (δ 1.84 ppm) and glucose in PC6 (δ 2.48 ppm), whereas for HCV patients, a signal related to threonine (δ 4.24 ppm) in PC4 was identified.

Thus, similar to the ALT model, increased concentrations of carbohydrates and unsaturated species resulted in higher PC1 score and, consequently, negative OPLS-DA scores, leading the sample to be classified as high ALT activity group. In addition, both the increased concentrations of proline and 3-hydroxybutyrate in PC8, in the AST model regardless the type of virus related to the infection, and of threonine in PC4, and

of aspartate, valine and arginine in PC6, in the AST model in HCV patients, resulted in negative OPLS-DA scores, leading the sample to be classified in the group with increased AST activity. However, reduced concentrations of the amino acid lysine resulted in higher PC6 score, while elevated concentrations of histidine, glutamine and N-acetylaspartic acid resulted in increased in PC7 score, and consequently positive OPLS-DA scores, which led the sample to be classified in the normal AST group.

Therefore, patients with higher AST activity showed higher serum levels of carbohydrates and amino acids proline, aspartate, valine, arginine, and lower levels of amino acids histidine, glutamine and N-acetylaspartic acid, when compared to the group with normal AST activity. This result corroborates the biochemical characteristics presented in table 1, since patients with increased AST activity showed higher glucose levels.

Based on the performance, AST and ALT models were more adequate to differentiate patients with liver enzymes alteration. and HCV infection and were more sensitive to discriminate the groups. Moreover, when evaluated according to the type of virus related to the infection, a better performance was detected to detect higher ALT activity in the model built with samples from HBV infected patients, whereas higher AST activity was detected with better performance in the model in HCV patients.

It might be explained by the fact that there are two isoforms of human ALT and AST with divergent biological role in the context of acute or chronic liver disease pathogenesis. In the liver, ALT localizes mainly in the cytosol, and it is associated with milder damage in hepatocytes, which is the case of most chronic HBV infected patients evaluated in this study, who were in the HBeAg-negative phase, normal ALT and HBV-DNA concentration below 2000 IU/mL. AST, however, is mainly concentrated in the mitochondrial matrix, which suggest that it might reflect a more sever hepatocyte membrane disruption related to mitochondrial dysfunction, such as those with chronic HCV infection (BOTROS; SIKARIS, 2013; GLINGHAMMAR et al., 2009; SOOKOIAN, 2015).

Moreover, clinical trials of HBV treatment use ULNs for ALT to indicate treatment, and typically required ALT elevation 1.3-2.0 times ULNs for inclusion (TERRAULT et al., 2015). Although, even if high necroinflammatory activity and high ALT levels are associated with necrosis and regeneration, some studies showed that marked necroinflammation and fibrosis may not trigger ALT increase in many chronic HBV and HCV patients, who would not be eligible for antiviral treatment (DOR-

MOHAMMADI et al., 2005; WONG et al., 2017; ZHENG et al., 2017). Thus, the academic attribution of cause and “severity” of acute damage on the basis of the magnitude of enzyme elevation may sometimes be misleading, since there can be grey areas in which a range of causes overlap (GIANNINI; TESTA; SAVARINO, 2005).

However, even though some researches on chronic hepatitis B and HBV-induced cirrhosis tried to find new sensitive and specific biomarkers, mainly involving energy, protein and lipid metabolism, there are no uniform biomarkers determined, so it might be necessary to make larger number of clinical studies to evaluate these new markers (YU et al., 2017; ZHENG et al., 2017).

Yue et al. evaluated induced abnormalities of nucleic acid metabolism of hepatitis B virus X protein (HBx) by ^1H -NMR-based metabonomics. The results showed that HBx initially induces DNA damage, and then disrupts nucleic acid metabolism, which in turn blocks DNA repair and induces the occurrence of HCC (YUE et al., 2016). In the metabonomics studies of patients with chronic HBV infection, some metabolites with a significant difference were found, which may provide some basis for discovering a pathogenic pathway and ideas for new targeted therapy (HOU; DUAN, 2016).

Regarding the complications of chronic liver disease caused by these viruses, Sands et al. evaluated the metabolites related to the discrimination between samples of patients with moderate fibrosis due to HCV infection and healthy controls, using in NMR models. The authors observed that patients with moderate and severe fibrosis showed higher ALT and AST activity levels, and that increased severity of fibrosis was associated with higher levels of citrate, as a product of carbohydrates metabolism, and aromatic amino acids tyrosine and phenylalanine, and also of methionine, while lower levels of creatine, LDL, phosphatidylcholine, and N-acetyl- α 1-acid-glycoprotein were observed in these groups (SANDS et al., 2015). Similarly, in our study we identified higher levels of carbohydrates and lower levels of HDL and LDL cholesterol in patients with increased liver enzyme activity, although with lower levels of unsaturated and aromatic species in this group.

In addition, Embade et al., also demonstrated the suitability of ^1H -NMR spectroscopy for characterizing the metabolism of liver fibrosis induced by HCV to distinguish between cirrhotic and non-cirrhotic patients and identified changes in amino acid, lipids and carbohydrates metabolism (EMBADE et al., 2016). Patients with HCV-induced cirrhosis presented higher AST, ALT and GGT activity levels, and lower levels of choline, acetoacetate, LDL, glutamine/glutamate, carbohydrates and lipids, while

the control group showed increased levels of creatinine and creatine. In our study, lower levels of glutamine and lipids were also identified, however, with lower carbohydrate levels in this group.

Therefore, the metabonomics models built in this study were able to distinguish patients with and without AST and ALT serum activity alterations, using a single ^1H -NMR spectra. In addition, it was possible to indicate the class of compounds (metabolites) associated with the group discrimination, showing a further application of the metabonomics strategy, and allowing the assessment of liver disease in these patients.

In addition, further studies using samples of patients from different regions of Brazil and the world would allow external validation and implementation of phases III and IV validation of diagnostic tests of the metabonomic models, in order to be widely applied in the diagnosis of hepatitis B and C and evaluation of the activity of liver enzymes in different populations.

Acknowledgements

We would like to thank the Central Analítica laboratory of Universidade Federal de Pernambuco and the Central laboratory of Hospital das Clínicas, where the assays were performed and the scholarship funding agency CAPES.

REFERÊNCIAS

BALOG, C. I. A et al. Metabonomic investigation of human *Schistosoma mansoni* infection. **Molecular BioSystems**, v. 7, n. 5, p. 1473–1480, 2011.

BATISTA, A. D. et al. Proton nuclear magnetic resonance-based metabonomic models for non-invasive diagnosis of liver fibrosis in chronic hepatitis C: Optimizing the classification of intermediate fibrosis. **World Journal of Hepatology**, v. 10, n. 1, p. 105–115, 2018.

BOTROS, M.; SIKARIS, K. A. The De Ritis ratio: the test of time. **The Clinical biochemist Reviews**, v. 34, n. 3, p. 117–130, 2013.

DOR-MOHAMMADI, T. et al. Relationship between serum alanine aminotransferase levels and liver histology in chronic hepatitis C-infected patients. **Indian Journal of Gastroenterology**, v. 24, n. 2, p. 49–51, 2005.

EMBADE, N. et al. Metabolic characterization of advanced liver fibrosis in HCV patients as studied by serum ^1H -NMR spectroscopy. **PLoS ONE**, v. 11, n. 5, p. 1–19, 2016.

FORNACIARI, I. et al. Gamma-glutamyltransferase fractions in human plasma and bile: Characteristic and biogenesis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, p. 2–8, 2014.

GIANNINI, E. G.; TESTA, R.; SAVARINO, V. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. **Canadian Medical Association Journal**, v. 172, n. 3, p. 367–379, 2005.

GLINGHAMMAR, B. et al. Detection of the mitochondrial and catalytically active alanine aminotransferase in human tissues and plasma. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 23, n. 5, p. 621–631, 2009.

GODOY, M. M. G. et al. Hepatitis C virus infection diagnosis using metabonomics. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 17, p. 854–858, dez. 2010.

GOUVEIA, L. R. et al. Diagnosis of coinfection by schistosomiasis and viral hepatitis B or C using ¹H NMR-based metabonomics. **PloS ONE**, v. 12, n. 8, p. e0182196, 2017.

HOU, Q.; DUAN, Z. J. Metabonomic window into hepatitis B virus-related hepatic diseases. **World Journal of Hepatology**, v. 8, n. 1, p. 1–8, 2016.

LOPES, E. P. A. et al. Determination of the cut-off value of serum alanine aminotransferase in patients undergoing hemodialysis, to identify biochemical activity in patients with hepatitis C viremia. **Journal of Clinical Virology**, v. 35, n. 3, p. 298–302, mar. 2006.

NICHOLSON, J. K. et al. Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function. **Nature Reviews**, v. 1, n. February, p. 153–161, 2002.

PRATT, D. S.; KAPLAN, M. M. Evaluation of abnormal liver-enzyme results in asymptomatic patients. **The New England Journal of Medicine**, v. 342, n. 17, p. 1266–1271, 2000.

SACKETT, D. L.; HAYNES, R. B. Evidence base of clinical diagnosis: the architecture of diagnostic research. **British Medical Journal**, v. 324, n. March, p. 539–541, 2002.

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

SITOLE, L. J.; WILLIAMS, A. A.; MEYER, D. Metabonomic analysis of HIV-infected biofluids. **Molecular BioSystems**, v. 9, p. 18–28, 2012.

SOOKOIAN, S.; PIROLA, C. J. Liver enzymes, metabolomics and genome-wide association studies: From systems biology to the personalized medicine. **World Journal of Gastroenterology**, v. 21, n. 213, p. 711–725, 2015.

TARGHER, G. Elevated serum gamma-glutamyltransferase activity is associated with increased risk of mortality, incident type 2 diabetes, cardiovascular events, chronic kidney disease and cancer: a narrative review. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 48, n. 2, p. 147–157, 2010.

TERRAULT, N. A. et al. AASLD guidelines for treatment of chronic hepatitis B. **Hepatology**, v. 63, n. 1, p. 261–283, 2015.

VAN BEEK, J. H. D. A. et al. The genetic architecture of liver enzyme levels: GGT, ALT and AST. **Behavior Genetics**, v. 43, n. 4, p. 329–339, 2013.

VERSLYPE, C. Evaluation of abnormal liver-enzyme results in asymptomatic patients.

Acta Clinica Belgica, v. 59, n. 5, p. 285–289, 2004.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for the Prevention, Care and Treatment of Persons with Chronic Hepatitis B Infection**. Geneva: World Health Organization, 2015.

WONG, R. J. et al. Significant Hepatic Fibrosis Among Treatment-Naive Chronic Hepatitis B Virus With Increased Hepatitis B Virus DNA and Normal Alanine Aminotransferase. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 16, n. 1, p. 146–148, 2017.

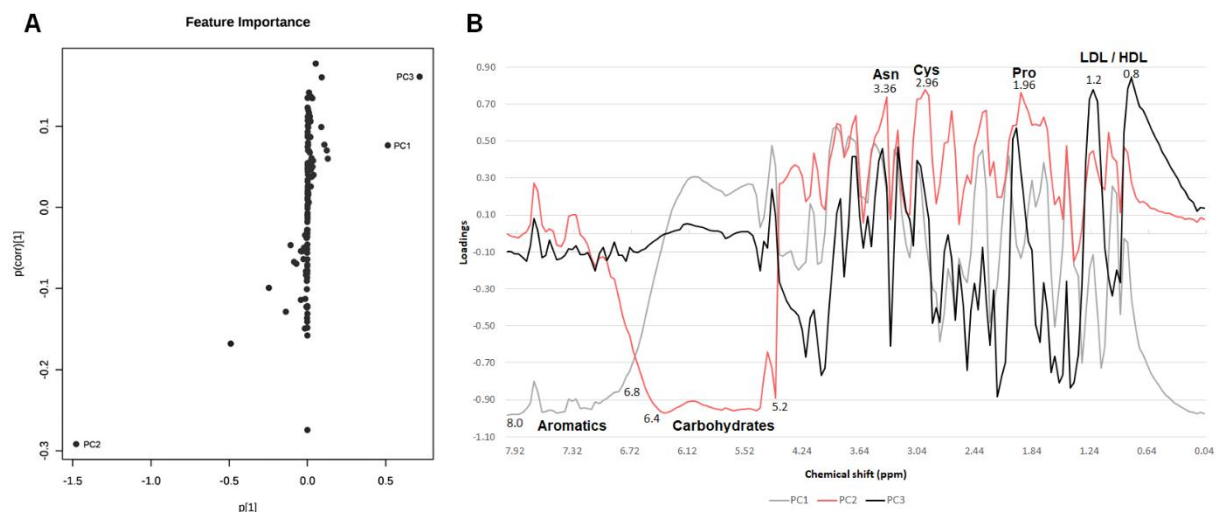
YU, M. et al. Metabonomics Research Progress on Liver Diseases. **Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 2017, n. Article ID 8467192, p. 1–10, 2017.

YUE, D. et al. Hepatitis B virus X protein (HBx)-induced abnormalities of nucleic acid metabolism revealed by (1)H-NMR-based metabonomics. **Scientific Reports**, v. 6, n. 24430, p. 1–13, 2016.

ZHENG, H. et al. Metabolic characterization of hepatitis B virus-related liver cirrhosis using NMR-based serum metabolomics. **Metabolomics**, v. 13, n. 10, p. 1–9, 2017.

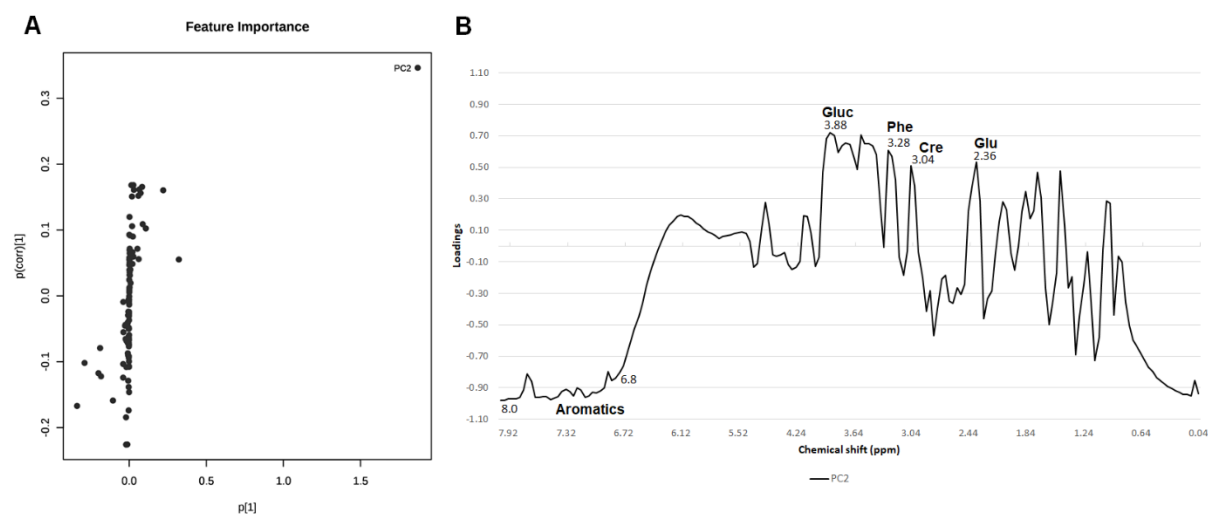
APÊNDICE D – Figuras dos resultados suplementares do Artigo 1

Figura 1 – Resultado do modelo OPLS-DA comparando pacientes infectados pelo HBV e controles, em Recife/PE, no período de 2014 a 2016. (A) Gráfico de importância das componentes principais; (B) Gráfico de *loadings* das componentes principais.



Legenda: Asn: asparagina; Cys: cisteína; HDL: lipoproteína de alta densidade; LDL-c: lipoproteína de baixa densidade; Pro: prolina.

Figura 2 – Resultado do modelo OPLS-DA comparando pacientes infectados pelo HCV e controles, em Recife/PE, no período de 2014 a 2016. (A) Gráfico de importância das componentes principais; (B) Gráfico de *loadings* das componentes principais.



Legenda: Cre: creatinina; Glu: glutamato; Gluc: glicose; Phe: fenilalanina.

APÊNDICE E – Figuras dos resultados suplementares do Artigo 2

Figura 1 – Resultado do modelo OPLS-DA comparando amostras de pacientes com a atividade da enzima GGT aumentada e normal, em infectados pelo HBV ou HCV, em Recife/PE, no período de 2014 a 2016. (A) Gráfico de escores bidimensional; (B) Gráfico de importância das componentes principais; (B) Gráfico de *loadings* das componentes principais.

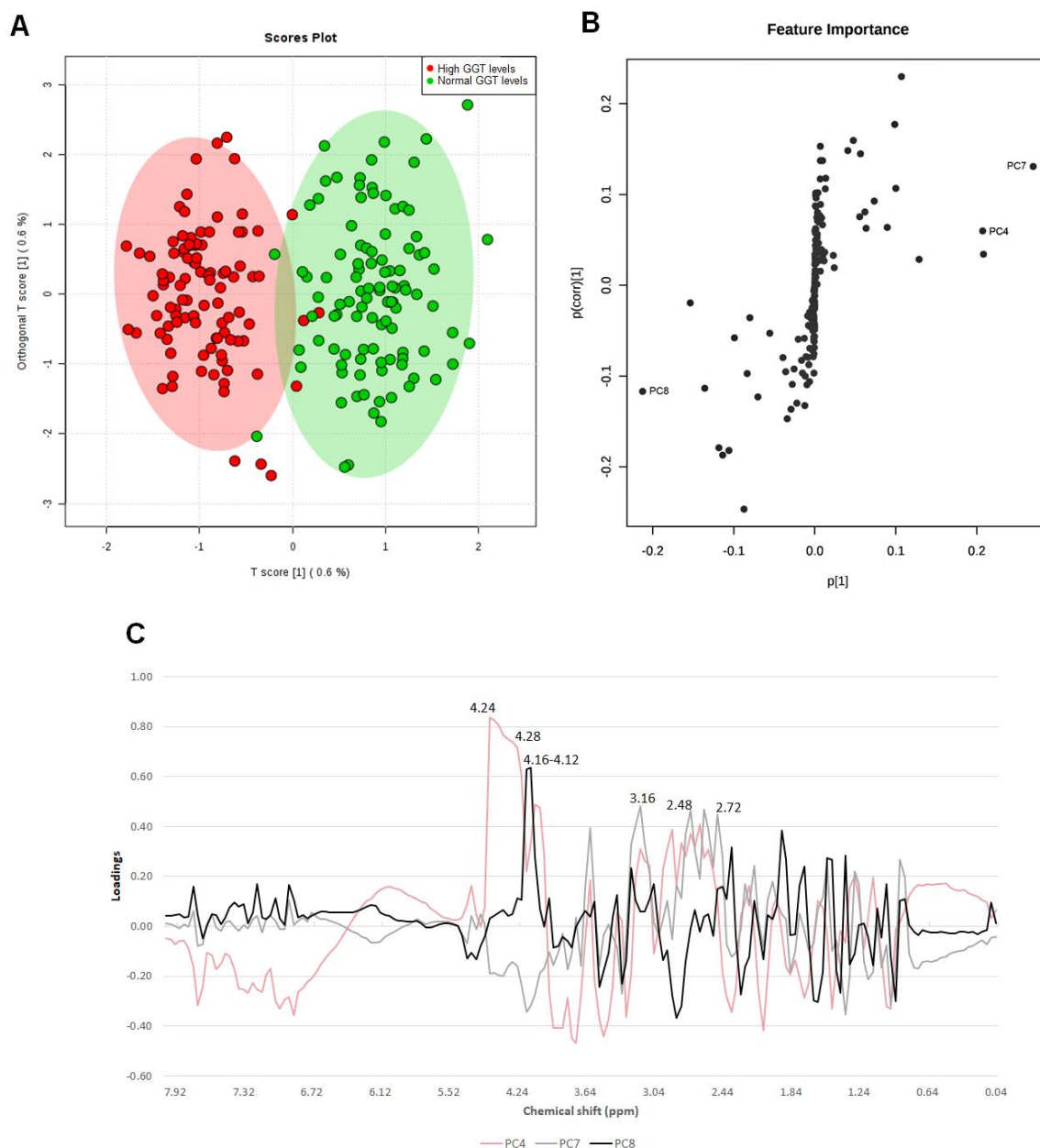


Figura 2 – Resultado do modelo OPLS-DA comparando a atividade da enzima ALT aumentada e normal, em pacientes infectados pelo HBV, em Recife/PE, no período de 2014 a 2016. (A) Gráfico de importância das componentes principais; (B) Gráfico de *loadings* das componentes principais.

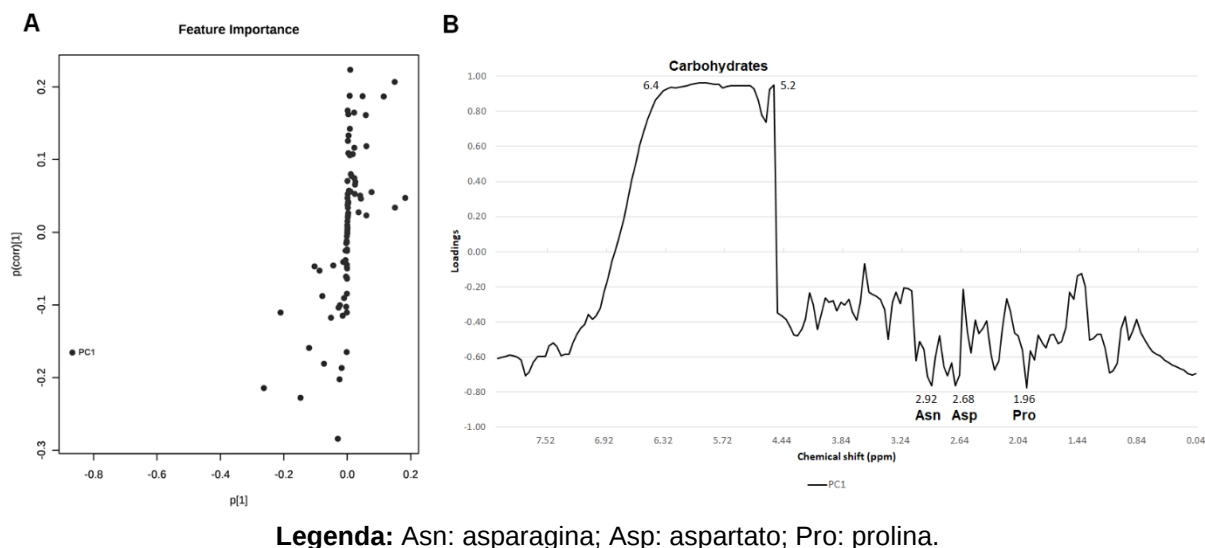


Figura 3 – Resultado do modelo OPLS-DA comparando a atividade da enzima AST aumentada e normal, em pacientes infectados pelo HBV, em Recife/PE, no período de 2014 a 2016. (A) Gráfico de importância das componentes principais; (B) Gráfico de *loadings* das componentes principais.

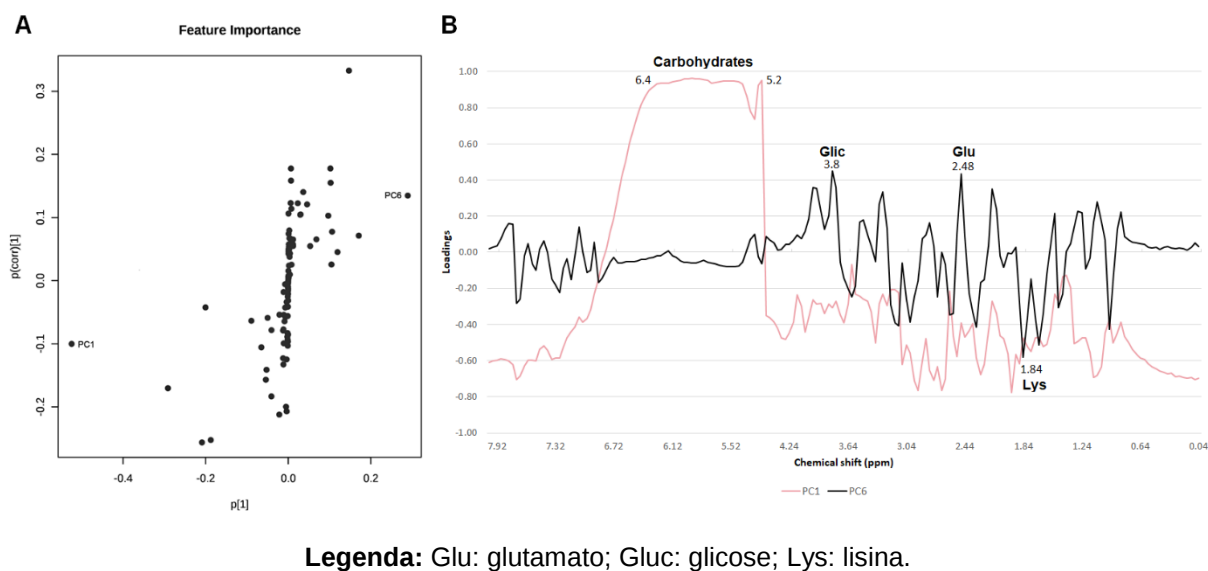
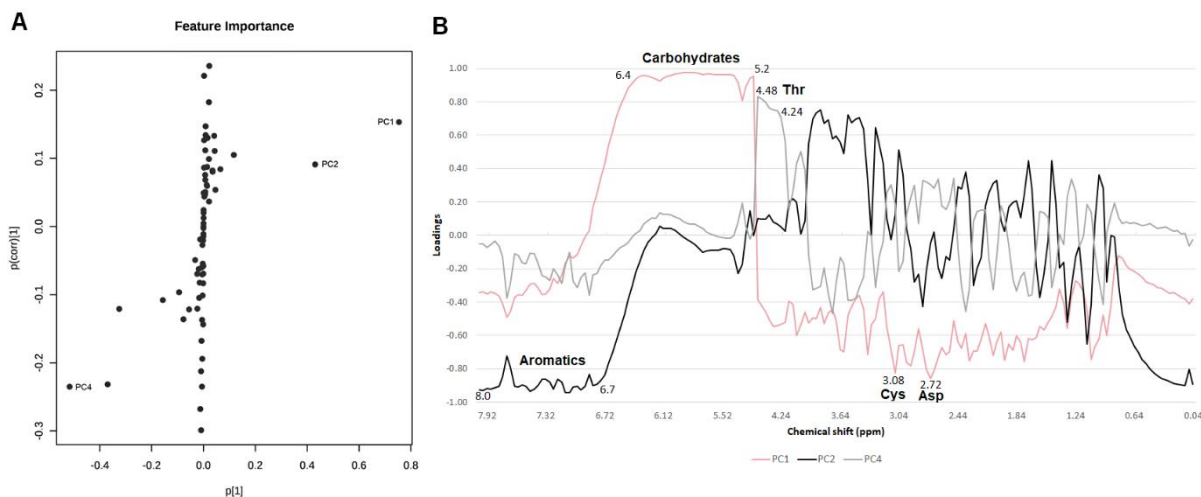
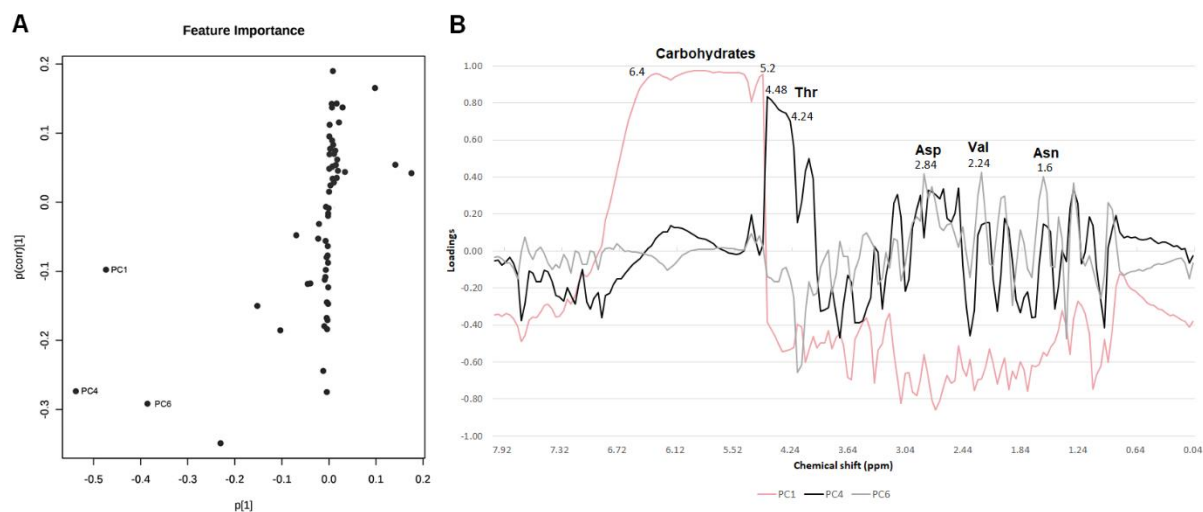


Figura 4 – Resultado do modelo OPLS-DA comparando a atividade da enzima ALT aumentada e normal, em pacientes infectados pelo HCV, em Recife/PE, no período de 2014 a 2016. (A) Gráfico de importância das componentes principais; (B) Gráfico de *loadings* das componentes principais.



Legenda: Asp: aspartato; Cys: cisteína; Thr: treonina.

Figura 5 – Resultado do modelo OPLS-DA comparando a atividade da enzima AST aumentada e normal, em pacientes infectados pelo HCV, em Recife/PE, no período de 2014 a 2016. (A) Gráfico de importância das componentes principais; (B) Gráfico de *loadings* das componentes principais.



Legenda: Asp: aspartato; Asn: asparagina; Thr: treonina; Val: valina.

ANEXOS

ANEXO A – Parecer consubstanciado do CEP

Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos	CEP - CCS - UFPE	UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-	
--	--------------------------------	--	---

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: 50.740-800
UF: PE	Município: RECIFE
Telefone: (81)2126-8588	E-mail: cepocs@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: 50.740-800

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2126-8588

E-mail: cepocs@ufpe.br

**Comitê de Ética
em Pesquisa
Envolvendo
Serres Humanos**

**CEP
- 019 - UFPE**

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



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

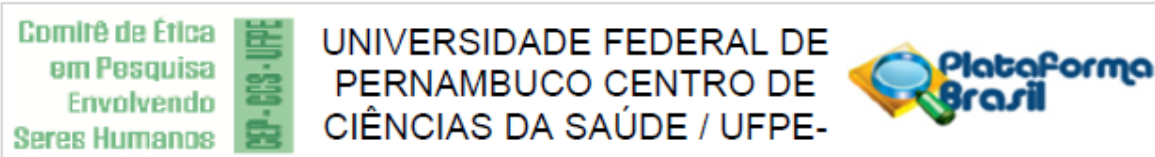
CEP: 50.740-600

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: 50.740-800

UF: PE Município: RECIFE

Telefone: (81)2126-8588

E-mail: cepocs@ufpe.br

**Comitê de Ética
em Pesquisa
Envolvendo
Serres Humanos**

CEP - CCS - UFPE

**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:** 50.740-800

UF: PE **Município:** RECIFE

Telefone: (81)2126-8588

E-mail: cepccs@ufpe.br