



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

MILENA LIMA RODRIGUES

**DISCRIMINAÇÃO DE PACIENTES COM FIBROSE PERIportal
ESQUISTOSSOMÓTICA POR METABONÔMICA**

Recife
2020

MILENA LIMA RODRIGUES

**DISCRIMINAÇÃO DE PACIENTES COM FIBROSE PERIportal
ESQUISTOSSOMÓTICA POR METABONÔMICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências Médicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial, para obtenção do título de Mestra em Medicina Tropical.

Área de Concentração: Medicina Tropical

Orientador: Prof. Dr. Edmundo Pessoa de Almeida Lopes

Co-orientador: Prof. Dr. Ricardo Oliveira da Silva

Recife

2020

M528a	<p>Rodrigues, Milena Lima</p> <p>Discriminação de pacientes com fibrose periportal esquistossomótica por metabonômica/ Milena Lima Rodrigues. – 2020.</p> <p>83 f.; il.</p> <p>Orientador: Edmundo Pessoa de Almeida Lopes.</p> <p>Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Médicas - CCM. Programa de pós-graduação em Medicina Tropical. Recife, 2020.</p> <p>Inclui referências, apêndice e anexo.</p> <p>1. Metabolômica. 2. <i>Schistosoma mansoni</i>. 3. Biomarcadores. 4. Fibrose periportal. I. Lopes, Edmundo Pessoa de Almeida (orientador). II. Título.</p>	616.988 CDD (23.ed.)	UFPE (CCS 2020 - 072)
-------	--	----------------------	-----------------------



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)

CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS (CCM)

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL (PPGMEDTROP)

MILENA LIMA RODRIGUES

**DISCRIMINAÇÃO DE PACIENTES COM FIBROSE PERIportal
ESQUISTOSSOMÓTICA POR METABONÔMICA**

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

Aprovada em: 28/02/2020.

BANCA EXAMINADORA:

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

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

Prof. Dr. Ronaldo Dionísio da Silva (Examinador Externo)
Instituto Federal de Pernambuco (IFPE)

AGRADECIMENTOS

O período do mestrado acadêmico é o tempo de o investigador gestar uma trajetória regada de conhecimentos, incertezas, desafios e solidariedade. Quero expressar a minha gratidão a todos os envolvidos nesta etapa da minha vida profissional que gera um fruto científico.

A Deus e aos meus guias espirituais pela luz divina e proteção plena.

Aos meus pais, Mima e Rodrigues, meu irmão Mailson, meu sobrinho Gustavo, minha avó Helena, pelo firmamento e amor incondicional.

Ao meu namorado Bruno, pelo amor, pela força e palavras de incentivo.

Aos meus orientadores Prof. Dr Edmundo Lopes e Prof. Dr Ricardo Oliveira, pelo conhecimento, confiança, paciência e acolhimento.

Aos amigos do GMEQ, pelo acolhimento amizade e aprendizados.

Aos médicos, pacientes e funcionários do setor de Gastroenterologia do HC/UFPE, em especial a Carolinne Louise, pela parceria, auxílio e amizade de sempre.

Aos funcionários, professores e colegas da Pós-Graduação em Medicina Tropical UFPE.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

A Amanda e Débora pelas partilhas diárias.

Aos amigos e familiares que vibraram positivamente comigo nesta jornada!

RESUMO

A classificação do padrão de fibrose periportal (FPP) é fundamental na avaliação prognóstica do paciente com esquistossomose mansônica. A ultrassonografia do abdômen (US) é o exame padrão ouro, para sua avaliação segundo o protocolo da Organização Nacional de Saúde (OMS) utilizando a classificação de Niaméy, mas nem sempre está disponível para áreas endêmicas. A metabonômica baseada em Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ^1H) vem sendo empregada para avaliar a fibrose hepática em algumas enfermidades. Este estudo objetivou criar modelos metabonômicos (MM), a partir de dados espectrais de RMN, que permitam classificar o padrão de FPP em pacientes com esquistossomose. Os ensaios foram realizados utilizando 41 amostras, sendo 10 de pacientes com FPP leve e 31 com FPP significativa, avaliados por US conforme a classificação de Niaméy. Foram obtidos espectros de RMN de ^1H de amostras de soro e os dados espectrais foram utilizados para a construção dos MM. Foram utilizados pacotes estatísticos para análise univariada dos dados demográficos e laboratoriais, bem como para a construção dos modelos metabonômicos. Os formalismos empregados foram: Análise de Componentes Principais (PCA), Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA), Análise Discriminante Ortogonal por Mínimos Quadrados Parciais (OPLS-DA). Nos dados laboratoriais foram encontradas diferenças ($p < 0,05$) entre os grupos, para os seguintes fatores: os pacientes com FPP significativa apresentaram níveis elevados de gama-glutamil transferase e trombocitopenia. Os MM PLS-DA e OPLS propiciaram clara separação entre os grupos com FPP leve e FPP significativa. PLS-DA apresentou *Leaving-one-out-cross-validation*(LOOCV) com acurácia igual a 0,85, R^2 igual a 0,80 e Q^2 igual a 0,38. OPLS apresentou valores de R^2 e Q^2 iguais a 0,717 e 0,417 respectivamente. Os formalismos PLS-DA e o OPLS-DA discriminaram regiões espectrais entre os grupos como segue: carboidratos e valina, mais concentrados nas amostras do grupo com FPP leve; N-Acetilglicosaminas, Alanina, Glicolaldeído mais concentrados nas amostras do grupo com FPP significativa. OPLS-DA apresentou exatidão, sensibilidade, especificidade, foram iguais a 92,7%, 90,3%, 100%, para o diagnóstico da FPP significativa. Os MM construídos foram capazes de discriminar FPP leve da significativa em pacientes com esquistossomose com boa acurácia.

Palavras-chave: Metabolômica. *Schistosoma mansoni*. Biomarcadores. Fibrose periportal.

ABSTRACT

The definition of the pattern of periportal fibrosis (PPF) is essential in the prognostic assessment of patients with schistosomiasis mansoni. Ultrasound of the abdomen (US) is the gold standard exam, for its evaluation according to the protocol of the National Health Organization (WHO) using the Niamey classification, but it is not always available for endemic areas. Metabonomics based on Nuclear Magnetic Resonance of Hydrogen-1 (^1H NMR) has been used to assess liver fibrosis in some diseases. This study aimed to create metabolic models (MM), using NMR spectral data, which allow the classification of the FPP pattern in patients with schistosomiasis. The tests were performed with 41 samples, 10 of which were from patients with mild PPF and 31 significant PPF, made by US, according to the Niamey classification. ^1H NMR spectral were obtained from serum samples and spectral data were used to construct the MM. Statistical packages were used for univariate analysis of demographic and laboratory data, as well as for the construction of MM. The formalisms used for the construction of these models were: Principal Component Analysis (PCA), Partial Least Squares—Discriminant Analysis (PLS-DA), Orthogonal Projections to Latent Structures Discriminant Analysis (OPLS-DA). In the laboratory data, significant differences ($p < 0.05$) were found between the groups, for the following factors: high levels of GGT and thrombocytopenia, in the significant PPF group. The PLS-DA and OPLS formalisms obtained a clear separation between Mild and Significant PPF groups. PLS-DA and OPLS showed values with an accuracy, R^2 and Q^2 equals to 0.85; 0.80; 0.38 and 0.717; 0.417 respectively. The PLS-DA and OPLS-DA formalisms discriminated spectral regions between groups as follows: Carbohydrates and Valine, more concentrated in the samples of the mild PPF group; N-Acetylglycosamines, Alanine, Glycolaldehyde which have higher samples from the significant PPF group. The values of the OPLSDA model for accuracy, sensitivity, specificity, were 92.7%, 90.3%, 100% respectively. The constructed MMs were able to discriminate between mild and significant FPP in patients with schistosomiasis with good accuracy.

Keywords: Metabolomics. *Schistosoma mansoni*. Biomarkers. Periportal Fibrosis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição da esquistossomose, de acordo com positividade do <i>S. mansoni</i> , por município, Brasil, 2010- 2015.....	15
Figura 2 - Característica da FPP esquistossomótica ao US.....	18
Figura 3 - Classificação ultrassonográfica de FPP de Niamey	23
Figura 4 - Composição de um espectrômetro de RMN	26
Figura 5 - Espectro típico de RMN de ^1H (CPMG, 400 MHz) de soro	26
Figura 6 - Trabalhos publicados em metabonômica, utilizando espectroscopia por RMN ^1H , na busca e identificação de biomarcadores, por tipo de doença e ano de publicação.....	30
Figura 7 - Fluxo de trabalho para metabonômica	36
Figura 8 - Aquisição do espectro de amostras de soro após a sequência de pulsos (A) CPMG e (B) PRESAT.....	37
Figura 9 - Matriz de bins para construção dos modelos metabonômicos.....	39

Artigo

Figura - 1 Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (400 MHz, D_2O , presat-CPMG) de uma amostra de soro de uma paciente com esquistossomose mansônica, Pernambuco, Brasil, 2020.	46
Figura - 2 Resultados do MM para predição de FPP significativa por PLS-DA, usando amostras de 41 pacientes com esquistossomose mansônica, Pernambuco, Brasil, 2020. A) Gráfico de escores e B) Desempenho do modelo, em função do número de variáveis latentes utilizadas na PLS-DA – FPP significativa (vermelho).....	47
Figura - 3 Resultados da PLS-DA, usando amostras de 41 pacientes com esquistossomose mansônica, Pernambuco, Brasil, 2020. A) Gráfico com escores VIP. B) Teste de permutação com 2000 permutações $p = 0,0245$	47
Figura - 4 Resultado da OPLSDA, usando amostras de 41 pacientes com esquistossomose mansônica, Pernambuco, Brasil, 2020. A) Gráfico de Escores – FPP significativa (vermelho) e FPP leve (verde). B) Teste de permutação.	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características demográficas e laboratoriais de 41 pacientes com esquistossomose mansônica, Pernambuco, Brasil, 2020.	45
Tabela 2 - Metabólitos responsáveis pela discriminação entre pacientes com FPP Leve e FPP Significativa, a partir dos modelos metabonômicos construídos.....	49
Tabela 3 - Tabela de contingência para o modelo FPP leve versus FPP significativa, usando amostras de 41 pacientes com esquistossomose mansônica, Pernambuco, Brasil, 2020 (Formalismo OPLS-DA).	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AH	Ácido hialurônico
ALT	Alanina Aminotransferase
APRI	Índice de relação aspartato aminotransferase e plaquetas
AST	Aspartato Aminotransferase
DTN	Doenças tropicais negligenciadas
EHE	Esquistossomose hepatoesplênica
EHI	Esquistossomose hepatointestinal
EM	Espectrometria de Massas
FAL	Fosfatase Alcalina
FIB-4	Índice de Fibrose baseado em 4 fatores
FPP	Fibrose periportal
HDL	Lipoproteínas de alta densidade
HSCs	Células estreladas hepáticas
GGT	Gamaglutamiltransferase
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade
LOOCV	Leaving-one-out-cross-validation
MEC	Matriz extracelular
MMPs	Metaloproteinases da matriz
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPLS-DA	Análise discriminante ortogonal por mínimos quadrados parciais
PC	Componente Principal
PCA	Análise de Componentes Principais
PLS-DA	Análise discriminante por Mínimos Quadrados Parciais
POP	Procedimentos Operacionais Padrão
RMN de ^1H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio-1
US	Ultrassonografia
VIP	Variables Important for Projection
VPN	Valor Preditivo Negativo
VPP	Valor Preditivo Positivo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1	EPIDEMIOLOGIA	14
2.2	PATOGENIA E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS NA ESQUISTOSSOMOSE	16
2.3	FIBROSE NA ESQUISTOSSOMOSE.....	17
2.4	MARCADORES BIOLÓGICOS.....	20
2.5	FERRAMENTAS DE DIAGNÓSTICO DA FPP	21
2.6	METABONÔMICA	24
2.7	ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDROGÊNIO.....	25
2.8	QUIMIOMETRIA	28
3	OBJETIVOS	32
3.1	OBJETIVO GERAL.....	32
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
4	METODOLOGIA.....	33
4.1	DESENHO DO ESTUDO.....	33
4.2	POPULAÇÃO DE ESTUDO.....	33
4.4	CRITÉRIO DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO.....	34
4.5	CATEGORIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS.....	34
4.6	ULTRASSONOGRAFIA ABDOMINAL.....	35
4.7	PROCESSAMENTO E ARMAZENAMENTO DO SORO	35
4.8	ANÁLISE DOS MARCADORES SÉRICOS E PLAQUETAS	36
4.9	RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDROGÊNIO- 1	36
4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
4.10.1	Análise estatística descritiva e univariada.....	37
4.10.2	Análise estatística multivariada dos dados espectrais.....	38
4.11	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	39
5	RESULTADOS	40
5.1	ARTIGO: ASSESSMENT OF PERIportal FIBROSIS IN SCHISTOSOMIASIS MANSONI PATIENTS BY ¹ H NMR-BASED METABONOMICS	40

6	CONCLUSÃO.....	58
	REFERÊNCIAS	59
	APÊNDICE A- ARTICLE SEND FOR TROPICAL MEDICINE & HYGIENE.....	65
	ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP.....	86

1 INTRODUÇÃO

A esquistossomose é uma doença tropical negligenciada relacionada às coleções hídricas, constituindo um risco para as populações de áreas rurais e urbanas, onde o tratamento da água e o saneamento básico são precários. Cerca de 779 milhões de pessoas estão em risco da infecção e aproximadamente 252 milhões de pessoas estão atualmente infectadas (SILVA-MORAES et al., 2019).

No Brasil, apesar da redução do número de casos aos longos dos anos a esquistossomose continua sendo um problema de saúde pública. A prevalência nacional é de 1% de indivíduos infectados e 20 milhões moram em áreas de risco, concentrando principalmente nas regiões Nordeste e Sudeste (KATZ, 2018; SILVA-MORAES et al., 2019).

O fígado é o principal órgão acometido na infecção crônica pelo *Schistosoma mansoni*. Após a eliminação dos ovos nas veias mesentéricas, esses são transportados pela corrente sanguínea para o sistema porta hepático, depositados em pequenas vênulas do fígado, gerando respostas imunológicas com a formação de granulomas (BARRETO et al., 2017).

A contínua deposição de ovos promove a formação de novos granulomas e a inflamação crônica estimula a deposição de componentes da matriz extracelular, provocando a fibrose periportal (FPP) que por sua vez promove indução a alterações hemodinâmicas do sistema porta (ELBAZ; ESMAT, 2013).

O excesso de tecido fibrótico, diminui a elasticidade das veias e contribui para a obstrução do fluxo sanguíneo portal, ocasionando hipertensão portal, com consequente formação de varizes esofágicas, que pode ocasionar hemorragia digestiva (PEARCE et al., 2002; DOMINGUES et al., 2011; BARRETO et al., 2017).

Como a hipertensão portal está diretamente relacionada com a quantidade de FPP e suas alterações no sistema venoso com consequente formação de varizes esofágicas, a mensuração da intensidade desta fibrose é primordial na avaliação da morbidade da esquistossomose mansoni (SANTOS et al., 2007).

A Ultrassonografia (US) é considerada o método padrão ouro para identificação e monitoramento FPP utilizando a classificação de Níamey como forma de identificar o grau de acometimento da fibrose (NIAMEY WORKING GROUP, 2000; SANTOS et al., 2007; BARRETO et al., 2017). Nos últimos anos, além da US, tem sido utilizado a elastografia

hepática, contagem de plaquetas e marcadores bioquímicos, como as transaminases Aspartato Aminotransferase (AST), Alanina Aminotransferase (ALT), Fosfatase Alcalina (FAL) e Gamaglutamiltransferase (GGT) (MEDEIROS et al., 2014; BARRETO et al., 2017)

As propriedades de um marcador ideal para fibrose hepática incluem técnicas minimamente invasivas, de boa reprodutibilidade e a facilidade na execução (SILVA et al., 2011).

Estudos metabonômicos vêm sendo empregados na investigação de alterações moleculares induzidas por perturbações na homeostase, em biofluidos, inclusive em doenças hepáticas principalmente pela utilização de espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ^1H), associada à ferramentas de estatística multivariada (GODOY et al, 2010; BATISTA et al., 2018; SONG et al., 2018).

Essa abordagem é capaz de identificar modificações no ambiente bioquímico induzido drogas ou agentes externos, revelando uma “impressão digital metabólica” do biofluido. O emprego de formalismos de estatística multivariada serve para identificação de padrões e também como ferramenta de validação dos dados espectrais, além de promover a identificação dos metabolitos endógenos responsáveis pela discriminação dos indivíduos com e sem a alteração estudada (WANG et al., 2004).

A metabonômica rastreia e identifica metabolitos endógenos através dos sinais químicos encontrados. Os avanços relevantes das técnicas metabólicas baseadas em espectroscopia são promissores, como resposta alternativa às limitações das técnicas de análises convencionais (SONG et al., 2018). Ela tem sido utilizada com êxito no estudo de várias doenças infecciosas, como em modelos de animais infectados por *Schistosoma mansoni* (WANG et al., 2004), diagnóstico da hepatite viral C (GODOY et al., 2010), na mensuração da fibrose hepática na hepatite crônica pelo vírus C (BATISTA et al., 2018), câncer (DUARTE; GIL, 2012), discriminação entre osteopenia e osteoporose (PONTES et al., 2019), entre outros.

Este estudo tem como objetivo desenvolver modelos metabonômicos para o diagnóstico e a classificação da FPP em pacientes com esquistossomose mansônica, tendo como padrão-ouro a classificação de Niamey avaliada pelo US. No futuro, esses modelos metabonômicos poderão ser inseridos na prática médica, facilitando o acesso ao diagnóstico e avaliação da gravidade da fibrose hepática na Esquistossomose mansoni.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 EPIDEMIOLOGIA

As doenças tropicais negligenciadas (DTN) são descritas como um conjunto de doenças infecciosas, que afetam principalmente populações vulneráveis em países de baixa renda. Com a intensificação dos fluxos migratórios, instabilidades econômicas e climáticas as DTN também vêm atingindo centros urbanos e países desenvolvidos (HOTEZ, P; Lo, N.C 2020).

A OMS classifica 17 DTN entre as quais estão: a esquistossomose, leishmanioses, filariose, entre outras. Além de acometerem milhares de pessoas no mundo, causam impacto produtivo nos trabalhadores principalmente em locais de baixa renda (HOTEZ, P; Lo, N.C 2020).

Das seis espécies de *Schistosoma* que parasitam o homem, somente a espécie *Schistosoma mansoni* está presente no Brasil. Atinge cerca de 75 países e 240 milhões de pessoas em todo mundo. Somente o *S. mansoni* está presente nas Américas, sendo as regiões de destaque: Caribe, Venezuela e Brasil (HOTEZ; FUJIWARA, 2014; NELWAN, 2019).

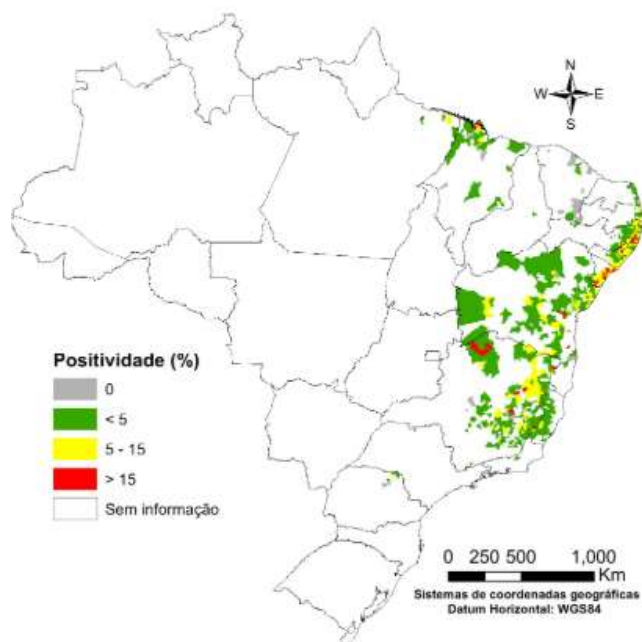
Popularmente conhecida como “doença do caramujo”; “barriga d’água”; “febre Katayama”. Em 1908 na Bahia, Pirajá da Silva descreveu as características e o ciclo biológico do parasita, através de exames microscópicos e necroscópicos de pacientes brasileiros (SANTOS, I.B 2008).

. Com o tráfico de escravos africanos, que eram portadores do parasita, a presença do hospedeiro intermediário (caramujo do gênero *Biomphalaria*), as condições socioambientais favoreceram a instalação e propagação da esquistossomose e a disseminação da doença em todo território nacional (KATZ, N, 2008; HENRIQUE et al., 2017).

No Brasil, estima-se que cerca de 20 milhões de pessoas vivem em áreas de risco, sendo às regiões Nordeste e Sudeste as mais afetadas, o que está diretamente relacionado à presença dos moluscos transmissores próximos às áreas de risco. Atualmente a doença é

detectada em todas as regiões do país, sendo categorizado por áreas endêmicas e não endêmicas (Figura 1) (BRASIL, 2014).

Figura 1 -Distribuição da esquistossomose, de acordo com positividade do *S. mansoni*, por município, Brasil, 2010- 2015.



Fonte: Ministério da Saúde (2017).

Em Pernambuco, a esquistossomose é considerada endêmica estando presente em 102 dos 186 municípios, sobretudo nas regiões metropolitana e zona da mata (DOMINGUES et al., 2011; GOMES et al., 2016).

A média de internamentos por esquistossomose no estado de Pernambuco foi de 39 pacientes ao ano, com maior incidência na faixa etária de 65 anos e mais, correspondendo ao percentual de 37,8% dos internamentos durante o período de 2013 a 2017. Com uma média de 150 óbitos por ano, a maior taxa de mortalidade—da Região Nordeste e do Brasil (PERNAMBUCO, 2018).

Apesar da redução do número de casos no Brasil, o país ainda possui áreas endêmicas. Como medida de combate, o tratamento em massa da população reduziu a intensidade da infecção, entretanto exibindo infecções de menor intensidade, com baixa carga parasitária. Esse perfil é observado em exposições em áreas turísticas e litorâneas e nos centros urbanos (GOMES et al., 2016; SILVA-MORAES et al., 2019; HOTEZ, P; Lo,N.C 2020).

Um plano de ação para eliminação das doenças infecciosas e negligenciadas foi estabelecido pela OMS, apresentando propostas de atividades inovadoras para redução da morbimortalidade, e transmissão das doenças entre os seres humanos até 2022. O plano aborda ações de manejo, controle e vigilância de 13 doenças, incluindo a esquistossomose. O Brasil é tido como um dos países principais nesse acordo pela presença de focos atuais de transmissão em várias regiões brasileiras (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2016).

2.2 PATOGENIA E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS NA ESQUISTOSSOMOSE

Os vermes adultos possuem tropismo pelas vênulas tributárias do sistema porta. Após a fase de maturação deslocam-se do fígado para a veia porta e as tributárias mesentéricas (SOUZA et al., 2011). Cerca de 50% dos ovos são eliminados pelas fezes, a outra metade fica contida na região intestinal podendo migrar para outras partes do corpo (GRYSEELS, 2012).

O homem infectado pode liberar ovos viáveis a partir de 5 semanas após a infecção, podendo chegar até mais de 20 anos. A resposta imune do hospedeiro desencadeia uma reação granulomatosa em torno dos ovos, sendo esta a principal resposta imunopatológica gerada pela doença (VERONESI, R; FOCACCIA, R. 2015).

As formas clínicas da esquistossomose dependem da resposta imunológica do hospedeiro, como também os fatores intrínsecos do indivíduo: idade, estado nutricional, hábitos de higiene, podendo desenvolver-se de forma aguda e crônica e manifestar-se inicialmente de modo assintomático (VERONESI, R; FOCACCIA, R 2015).

As manifestações clínicas agudas são decorrentes da penetração das formas imaturas do parasita, apresentadas de forma inespecífica: dermatite cercariana com prurido transitório, mal-estar, cefaleia, mialgia, prostração, linfadenopatia, tosse seca, febre, discreto aumento do fígado e baço que podem ser apresentados no exame físico (COURA et al., 1970; SOUZA et al., 2011).

Os sinais e sintomas clínicos da fase aguda normalmente acometem indivíduos que não residem em áreas endêmicas, como turistas e emigrantes que primariamente se expõem a locais de águas contaminadas. Os relatos de exposição às áreas endêmicas contribuem para o diagnóstico clínico epidemiológico. (GUIMARÃES, C.M; NETO; M.A; PERALTA, J.M, 2015).

Em situações em que o indivíduo tem contínuas exposições gerando quadro de reinfecção ou em casos agudos não tratados, a doença pode evoluir para a fase crônica com

manifestação clínica em diversos órgãos e níveis crescente de gravidade. A esquistossomose mansoni é classificada em 3 formas clínicas: hepatointestinal, hepática e hepatoesplênica (BRASIL, 2014).

A esquistossomose hepatointestinal (EHI) apresenta sinais e sintomas inespecíficos: náuseas, vômitos, dor epigástrica, constipação intestinal, podendo ocorrer surtos diarreicos. O diagnóstico é dado pela presença de ovos viáveis do *Schistosoma mansoni* nas fezes. No exame físico, pode-se observar um leve aumento do volume no fígado e em casos mais avançados a presença de fibrose nos espaços intra-hepáticos do sistema porta visualizado no exame de US (SOUZA et al., 2011).

Na forma hepática, as lesões se tornam mais graves, resultado do aumento da pressão sanguínea no sistema porta hepático, consequentemente gerando a FPP moderada a intensa. Com a progressão da FPP, ocasionando obstrução portal, desenvolve-se o quadro de esquistossomose hepatoesplênica (EHE). A EHE é caracterizada por um quadro de FPP e esplenomegalia, com presença moderada a acentuada de fibrose em torno do sistema porta (MAIA et al., 2007; SOUZA et al., 2011).

Em casos mais avançados, a forma EHE evolui para a forma descompensada, podendo evoluir para fibrose do parênquima hepático, cirrose e ascite na fase final da doença, em decorrência, pelo menos em parte, de episódios transitórios de repetição, secundários à hemorragia digestiva alta (HDA) (LEITE et al., 2013).

2.3 FIBROSE NA ESQUISTOSSOMOSE

A fibrose hepática decorre do acúmulo de tecido fibrótico gerado por fatores inflamatórios e degenerativos, induzidos por agentes infecciosos, álcool, gordura e doenças autoimunes (ANDRADE, 2009; EBRAHIMI; NADERIAN; SOHRABPOUR, 2016).

O produto da patologia associada à esquistossomose resulta da resposta imunológica do hospedeiro contra a invasão dos parasitas e seus ovos. Na fase inicial da doença, há uma resposta aguda contra a resposta migratória do verme e uma resposta crônica contra os ovos presos no tecido hepático, gerando a formação de granulomas para a espécie *S. mansoni* (CARSON et al., 2018).

Os granulomas formam-se após a resposta imunológica induzida por citocinas e quimiocinas, liberadas por linfócitos T e células hepáticas, incluindo as células hepáticas estreladas (CHE). A formação do granuloma inicia-se com o recrutamento de leucócitos

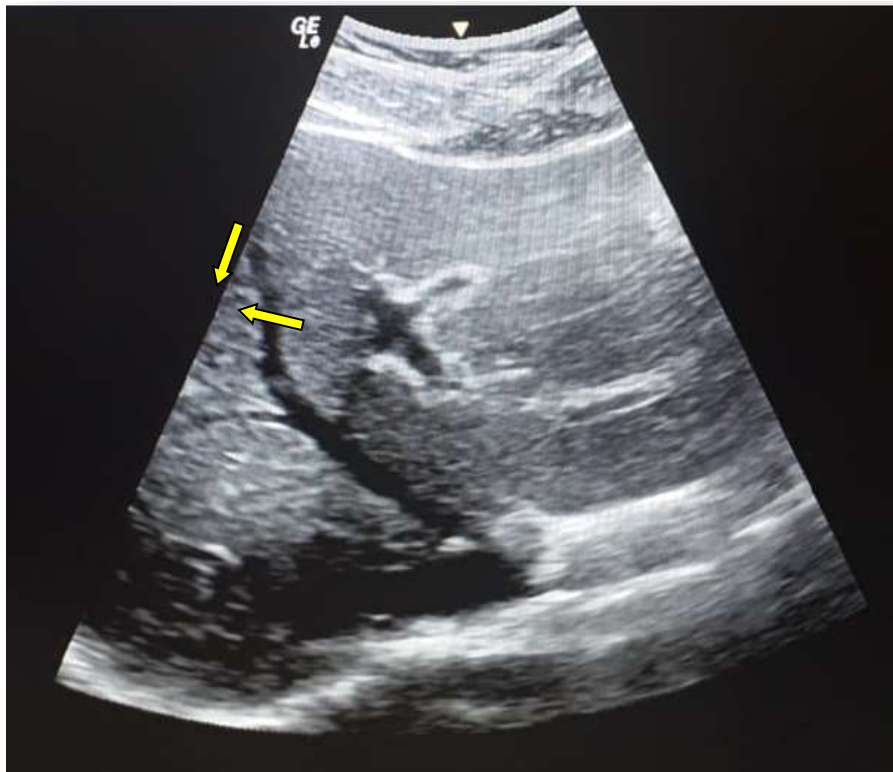
(macrófagos, eosinófilos e neutrófilos), induzindo resposta inflamatória contra os ovos do parasita (CARSON et al., 2018).

As CHE e miofibroblastos depositam um anel de colágeno para encapsular o núcleo e o espaço periférico do granuloma como medida de proteção. As CHE têm a função de deposição do colágeno, fibronectina, elastina, proteoglicanos entre outros na matriz extracelular (MEC). O desequilíbrio entre a síntese e degradação da MEC resulta na formação da fibrose no fígado. Nas fases mais avançadas a quantidade de material da MEC é bastante elevada em relação a fase inicial da doença. (EBRAHIMI; NADERIAN; SOHRABPOUR, 2016).

A FPP na esquistossomose apresenta-se como uma faixa ecogênica ao redor dos vasos portais, vista ao US, com a preservação do parênquima hepático. Em casos mais avançados, pode-se apresentar pseudonódulos devido ao processo cicatricial e retração do tecido fibroso (SILVA et al., 2011).

No início da infecção, há um predomínio da resposta granulomatosa, sem alterações no parênquima hepático ou esplenomegalia. Os sinais apresentados podem ser estabilizados após tratamento. A cronicidade da doença resulta na deposição de colágeno nos espaços periportais, a fibrose periportal ou fibrose de *Symmers* (CAVALCANTI; DE ARAUJO-NETO; PERALTA, 2015). Na Figura 2 observa-se a preservação da arquitetura hepática. A FPP pode acometer o tronco da veia porta e seus ramos primários, caracterizando uma FPP central, como pode se estender para os ramos intra-hepáticos atingindo até os pequenos vasos periféricos, sendo descrita como FPP periférica. Na imagem é possível visualizar FPP nos ramos hepáticos (setas).

Figura 2- Característica da FPP esquissomótica ao US



Fonte: Ambulatório de Gastroenterologia/ Hospital das Clínicas/UFPE

As metaloproteinases da matriz (MMPs) e os inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) são essenciais para a relação de equilíbrio do reparo tecidual, das ações de síntese (fibrogênese) e degradação (fibrólise), fundamental na avaliação do estágio de fibrose e arquitetura hepática (ANDRADE, 2008; BRANDT et al., 2010; EBRAHIMI et al., 2016).

Na esquistossomose, há um processo inflamatório e fibrótico na área que delimita o espaço periportal, no entanto não invadindo os lóbulos hepáticos. Portanto, não ocorre comprometimento do parênquima hepático e há preservação do funcionamento dos hepatócitos. (GOUVEIA, 2017)

A deposição de ovos e aumento do tecido fibroso periportal culmina em distúrbios vasculares do sistema porta, consequentemente dando origem aos sinais e sintomas clínicos: esplenomegalia, varizes esofágicas, gastropatia hipertensiva, sangramentos e HDA (VITORINO R; GOMES A, 2011).

Quando há progressão da fibrose com ou sem infecção ativa, episódios contínuos de sangramento podem levar ao desfecho fatal. O quadro de coinfeções associadas a esquistossomose, como hepatites virais, podem aumentar o dano tecidual e

consequentemente a progressão da doença (CAVALCANTI; DE ARAUJO-NETO; PERALTA, 2015).

Por muito tempo, prevaleceu a hipótese de que o processo de fibrose era algo irreversível. Estudos sobre a fibrose hepática em associação com a esquistossomose foram pioneiros e demonstraram a reversão da fibrose do ponto de vista morfológico e funcional (ANDRADE, 2005; ANDRADE, 2008; ANDRADE, 2009).

A regressão da FPP pode variar de indivíduo a indivíduo. Ocorre desde uma regressão espontânea com ou sem tratamento observado, até casos persistentes de fibrose por anos de tratamento, mesmo sem reinfecções. Os fatores que podem relacionar-se ao quadro esquistossomótico é o padrão genético do indivíduo, idade, tempo de exposição, carga parasitária e intensidade da fibrose (DOMINGUES, 2008).

O diagnóstico e o monitoramento da FPP são fundamentais para avaliação das estratégias de rastreamento de complicações, que podem ser geradas em pacientes na forma descompensada hepatoesplênica, sendo esta a principal causa de morte associada a esquistossomose (BARSOUM, R.S; ESMAT, G; EL-BAZ, T, 2013).

2.4 MARCADORES BIOLÓGICOS

A utilização de medidas estratégicas para avaliar o grau de fibrose hepática na esquistossomose é fundamental no acompanhamento evolutivo, sobretudo nos pacientes com doença hepática crônica com risco de desenvolver complicações. Mesmo após o tratamento da parasitose e a eliminação do parasita do organismo, a marca da infecção (fibrose) apresenta importância clínica. Mesmo após a erradicação, nas formas mais avançadas com hipertensão portal, ainda podem ocorrer sangramentos (WANG et al., 2004; BALOG et al., 2011;).

A FPP pode ser classificada através de diversas, ferramentas, incluindo os métodos de imagem, como a US e elastografias, ou biológicos, como os marcadores séricos. Esse tipo de rastreamento tem papel importante avaliação das doenças hepáticas, pois durante os estágios iniciais das doenças os sinais e sintomas são inespecíficos e a doença cursa de maneira silenciosa (SCOTT; GUHA, 2014).

Diversos biomarcadores (hepáticos, interleucinas, plaquetas e proteínas) têm sido investigados e relacionado com o processo de FPP (RICARD-BLUM et al., 1999; SILVA et al., 2011; LEITE et al., 2013; KUMAR et al., 2015; VASCONCELLOS et al., 2018; SCHWARTZ et al., 2019).

O ácido hialurônico (AH) é uma macromolécula fundamental da matriz extracelular presente nos tecidos conjuntivos. Considerado um bom marcador, é capaz de avaliar a gravidade da FPP na esquistossomose (RICARD-BLUM et al., 1999; KOPKE-AGUIAR et al., 2002; SILVA et al., 2011).

Estudos correlacionam a diminuição da contagem de plaquetas com a gravidade da FPP medida pela US, sendo considerado um marcador não invasivo para avaliar intensidade de FPP. Quando associado com outros marcadores constitui uma boa ferramenta de avaliação, favorável pelo baixo custo e fácil acesso. No entanto, ainda necessita de estudos de comparação e validação de teste (CORREIA et al., 2009; EBRAHIMI; NADERIAN; SOHRABPOUR, 2016; MEDEIROS et al., 2014).

Foram realizados estudos pioneiros, utilizando a impressão metabólica e reconhecimento de padrão de classes relacionado ao diagnóstico da esquistossomose. São apresentadas alterações no ciclo do ácido tri-carboxílico, incluindo redução de citrato, succinato e 2- oxoglutarato e elevação dos níveis de piruvato, lactato, alanina, creatina e glicina, sugerindo estímulo da glicólise, o que depende da gravidade do quadro clínico e estado nutricional do hospedeiro. Apesar do parasita não estar mais presente na maioria dos pacientes tratados, esses possuem resíduos da infecção, o que muda o funcionamento normal do fígado (WANG et al., 2004; BALOG et al., 2011; WU et al., 2010).

Contudo, estudos de novas metodologias aplicadas ao diagnóstico em pacientes com esquistossomose são escassos, quando comparado a hepatopatias de outras etiologias, apresentando um campo promissor de desenvolvimento de métodos não invasivos para classificação da FPP (BARRETO et al., 2017).

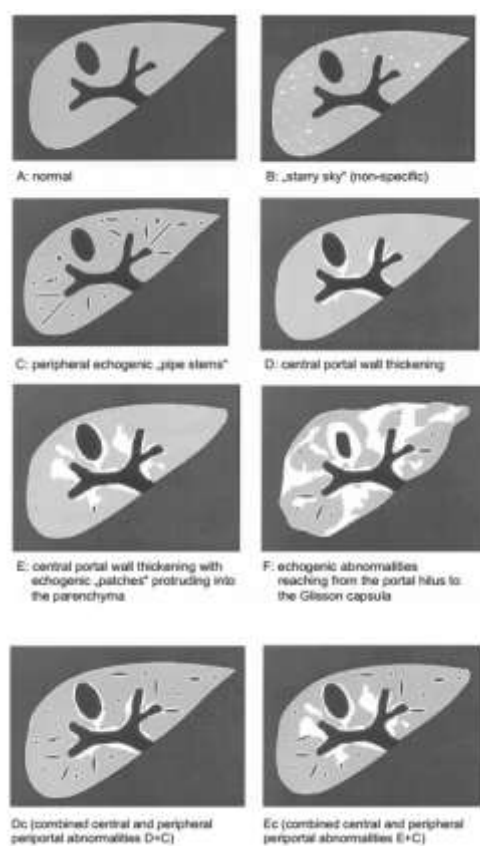
2.5 FERRAMENTAS DE DIAGNÓSTICO DA FPP

Na avaliação da fibrose esquistossomótica, a biópsia já foi utilizada como método padrão-ouro. Por ser tratar de um método invasivo, comumente inadequado para acompanhamento à longo prazo, foi sendo substituído por técnicas menos invasivas. As técnicas de imagem e análises laboratoriais têm se mostrado efetivas para avaliação da morbidade hepática, isoladamente ou em associação, através de índices ou escores. (MAIA et al., 2007; DOMINGUES; MEDEIROS; LOPES, 2011; BARRETO, et al., 2017; SANTOS et al., 2018).

A US é considerado ferramenta empregada na avaliação da FPP e da morbidade vinculada à infecção pelo *S. mansoni*. O US pode aferir a FPP em torno dos espaços periportais, o diâmetro hepático, esplênico e a presença de circulação colateral (CAVALCANTI; DE ARAUJO-NETO; PERALTA, 2015; SANTOS et al., 2018).

Para avaliação da FPP através do US, utiliza-se o protocolo padronizado da OMS-Niamey- Belo Horizonte (NIAMEY WORKING GROUP,2000) considerado adequado e composto por uma análise de classificação da FPP. Qualitativamente, a FPP é classificada em 6 padrões: A – ausência de fibrose; B – fibrose duvidosa; C- fibrose periférica; D- fibrose central; E – fibrose avançada; F- fibrose muito avançada. Além disto, em alguns casos existe uma combinação de padrões que refletem anormalidades periféricas e centrais, sendo possíveis as combinações dos padrões: (Dc/ Ec) (Figura 3) (EL SCHEICH et al., 2014; RICHTER et al., 2016).

Figura 3- Classificação ultrassonográfica de FPP de Niamey



Fonte: EL SCHEICH ET AL. (2014).

Apesar do uso generalizado do US para diagnosticar e monitorar as alterações induzidas pela FPP, seu uso tem algumas limitações, como o fato do aparelho de US não estar disponível em alguns locais, sua baixa sensibilidade nas formas iniciais da doença, além da variação interobservador e necessidade de examinador muito experiente (DOMINGUES, 2008; BARRETO, et al., 2017).

Métodos de elastografia hepática tem sido utilizado nos últimos anos, sendo uma ferramenta não invasiva que avalia a capacidade do tecido resistir à deformação através de uma força aplicada e o retorno da sua forma original quando a força é eliminada. Essa força pode ser mecânica (FibroScan) ou acústica (pSWE e 2D SWE).Aplicam-se fórmulas para calcular a rigidez do tecido, que incluem variáveis de elasticidade, densidade e velocidade de onda. (SANTOS et al., 2018; PATERNOSTRO; REIBERGUER; BUCSICS et., 2019).

Os métodos de elastografia tem sido promissores na aplicação da avaliação de fibrose hepática, como na hepatite B e para avaliação da FPP induzida pelo *S. mansoni*. No entanto, possui elevado custo(SANTOS et al., 2018).

Do ponto de vista bioquímico, são utilizados marcadores para sinalizar alterações sorológicas dos pacientes infectados pelo *S. mansoni*. O aumento dos níveis de enzimas hepáticas circulantes (GGT, AST, ALT, ALP) ou a diminuição da contagem de plaquetas e a presença de proteínas circulantes como o AH são observadas nos pacientes com FPP (DA SILVA et al., 2018). Acredita-se que as alterações da hemodinâmica hepática desencadeadas pela obstrução pelos ovos nos ramos terminais da veia porta e o hiperfluxo portal nos pacientes com FPP significativa provoquem o aumento das enzimas hepáticas (ALVES et al., 2003; LEITE et al., 2015).

Nos últimos anos, marcadores séricos não invasivos têm sido utilizados para criação de índices sorológicos, que sejam capazes de avaliar a fibrose de algumas doenças hepáticas crônicas, como aquelas induzidas pelo vírus da hepatite C (HCV). Entre estes índices destacam-se o FIB-4 e o APRI, bastante empregados na prática clínica (WAY et al., 2003).

No estudo da esquistossomose mansônica, foi desenvolvido o Índice Coutinho para mensurar a FPP, utilizando a contagem de plaquetas e a dosagem sérica da FAL. O índice apresenta vantagens, como seu fácil acesso e baixo custo, sendo útil para locais de áreas endêmicas. No entanto, necessita de mais estudos que contribuam para validação do método e assim possa ser utilizado na prática clínica, principalmente para áreas endêmicas de difícil acesso. (BARRETO et al., 2017).

2.6 METABONÔMICA

O mecanismo de reação de um organismo vivo que sofre alguma ação externa, seja por invasão de um microrganismo, drogas ou toxinas é desencadeado por uma série de eventos capazes de restaurar a homeostase do sistema, causando mudanças nas concentrações de metabólitos endógenos. Essas alterações presentes nos biofluidos podem ser avaliadas através de espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ^1H), que é capaz de fornecer uma “impressão digital” específica do biofluido associado à uma perturbação bioquímica (GODOY 2010; ARAUJO et al., 2017).

O termo metabonômica do grego *-meta*=mudança e *nomos*=regras ou *leis*, foi definido em 1999 por Jeremy Nicholson, Elaine Holmes e John Lindon como a resposta quantitativa metabólica dinâmica e multiparamétrica, que visa auxiliar na identificação de perturbações metabólicas decorrentes de estímulos fisiopatológicos ou mutações genéticas, usando

ferramentas de estatística multivariada na construção e validação dos modelos (NICHOLSON; LINDON; HOLMES, 1999).

É muito comum encontrar na literatura os termos metabonômica e metabolômica sendo considerados como sinônimos. Porém, possuem algumas distinções de definições que resultam no emprego de diferentes estratégias analíticas. A Metabonômica analisa e associa o perfil de metabólitos endógenos com o status bioquímico do biofluido, sem a separação dos componentes, realizando uma varredura da amostra, utilizando, por exemplo, a espectroscopia de RMN de ^1H . A Metabolômica utiliza técnicas de separação de misturas, como a cromatografia em fase líquida associada a um sistema de alta sensibilidade, como a espectrometria de massas (EM), que é capaz de quantificar e identificar os metabolitos presentes no biofluido, permitindo associá-los ao status específicos da doença (NICHOLSON, J; LINDON, J, 2007;GODOY, 2010; YU et al., 2017).

A espectroscopia de RMN é uma ferramenta capaz de explorar as propriedades dos núcleos atômicos inseridos em um campo magnético externo, utilizando ondas de radiofrequência para alcançar informações estruturais dos compostos, através de sinais espectrais. A impressão metabólica pode ser gerada através de fluidos biológicos como urina, soro, plasma ou líquido. A intensidade do sinal está diretamente relacionada com a concentração do metabólito (KOKOVA et al., 2017;BATISTA et al., 2018).

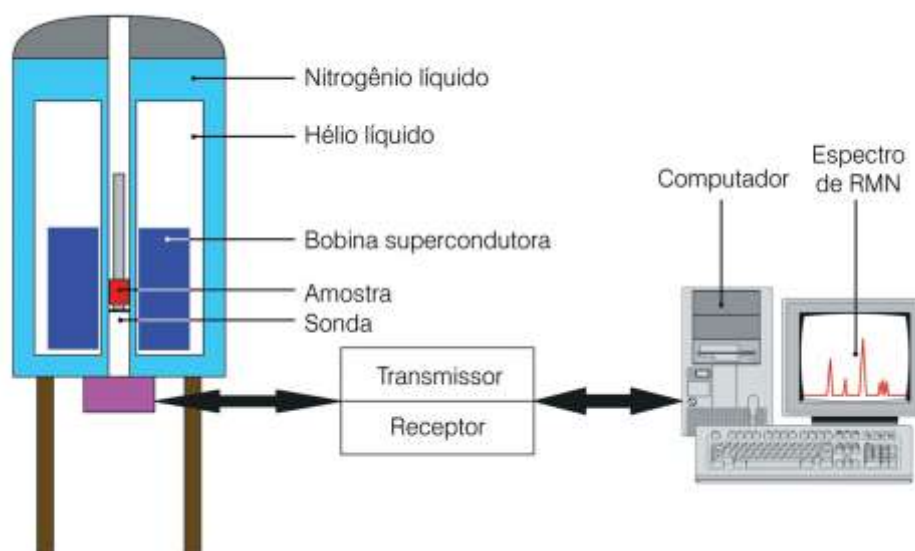
A estratégia metabonômica é uma abordagem que auxilia na identificação sistemática de perturbações metabólicas, num dado biofluido, quando um indivíduo sofre algum estímulo fisiopatológico ou genético, usando formalismos de estatística multivariada, a fim de identificar os metabólitos associados à discriminação dos grupos. Com a ampliação do emprego de tecnologias “ômicas”, o número de ferramentas para construção de modelos e identificação dos metabólitos cresceu significativamente na última década, facilitando a aquisição de dados mais confiáveis e válidos (YU et al., 2017; SONG et al., 2018; ZHANG et al., 2018).

2.7 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDROGÊNIO

O fenômeno Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foi descoberto em 1946 por Purcell e Bloch, sendo definido como uma técnica baseada na interação da radiação eletromagnética e a matéria, que promove, na presença de um campo magnético, a distribuição dos spins nucleares em níveis de energia distintos. Nessa situação, quando é aplicado um pulso seletivo de radiofrequência (RF), cuja energia corresponde à diferença

entre os estados de spin, ocorre a promoção de spins nucleares que estão no menor estado de energia para o estado de maior energia (Figura 4) (SILVERTEIN et al., 2005).

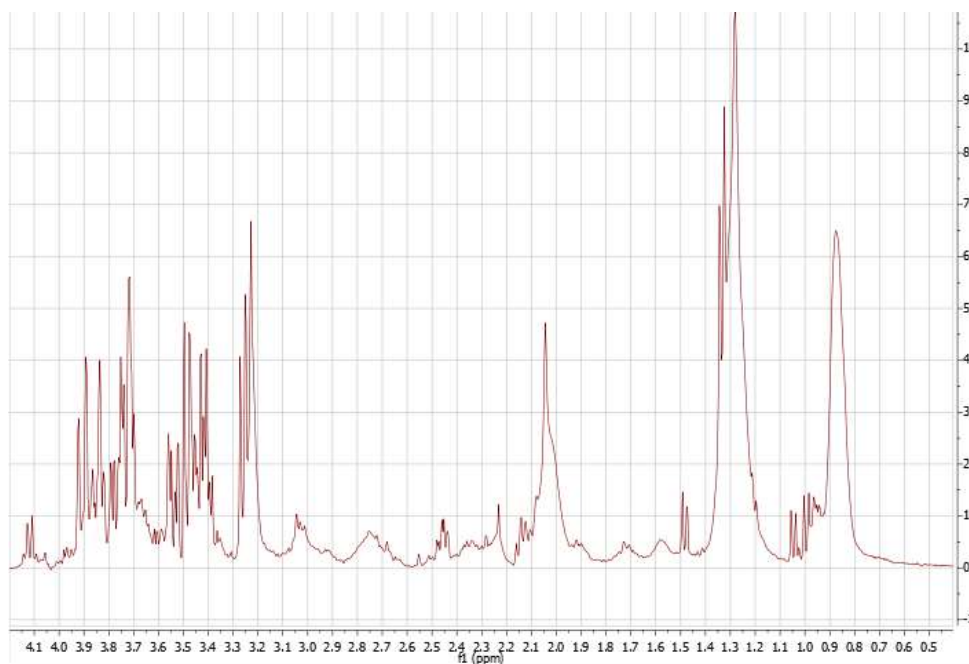
Figura 4-Composição de um espectrômetro de RMN



Fonte: VALENTE; ALMEIDA; COLNAGO, (2002).

Quando o pulso de RF é desligado, o sistema tende a voltar à condição inicial, com emissão de energia cuja frequência depende da diferença de energia entre os estados de spin nuclear. Esses sinais são detectados pelo espectrômetro de RMN e são apresentados como um registro da frequência do sinal versus a intensidade do sinal diretamente relacionado com concentração dos metabólitos (Figura 5) (BATISTA et al., 2018; KOKOVA; MAYBORODA 2019).

Figura 5-Espectro típico de RMN de ^1H (CPMG, 400 MHz) de soro



Fonte: a autora, 2020.

A RMN de ^1H se adequa ao princípio da metabonômica por ser rápida, não destrutiva, não seletiva e com intervenções mínimas para o preparo da amostra. De outra forma, a EM normalmente está associada a uma técnica cromatográfica, sendo indicada para isolamento, identificação e quantificação de metabólitos, sendo uma técnica mais sensível, utilizada na metabolômica (KEUN, 2006; PEDRINI et al., 2019).

A primeira aplicabilidade biológica da espectroscopia de RMN sucedeu na década de 1950, no estudo das propriedades de hidratação do ácido desoxirribonucleico (DNA). Hoje a metabonômica utiliza uma associação de técnicas analíticas avançadas, capazes de detectar simultaneamente diversos compostos, e algoritmos de modelagem multivariada ou de aprendizagem de máquina que disponibilizam uma fonte alternativa à experimentação bioquímica convencional (JACOBSON; ANDERSON; ARNOLD, 1954; KOSTIDIS et al., 2017).

O hidrogênio é um o elemento mais abundante nos biofluidos e seu isótopo de número de massa 1 (^1H) possui alta abundância (~99%) e excelente sensibilidade magnética, sendo assim a escolha para gerar espectros de fluidos biológicos. Entretanto, outros isótopos, como o ^{13}C , também podem ser utilizados. Por outro lado, a água é o principal constituinte das amostras biológicas, sendo necessário diminuir a intensidade do seu sinal para visualizar as estruturas de interesse clínico. Uma vez suprimido esse sinal, um grande número de metabólitos será visualizado (LENZ; WILSON, 2007; SANTOS, 2018).

Material biológico como o soro, contém bastante água, com o intuito de eliminar a sua intensidade, utiliza-se a Sequência de Pulsos para a Saturação do Sinal da Água (PRESAT) (LENZ; WILSON, 2007). Essa sequência de pulsos é utilizada em amostras aquosas ou aquelas que possuem o sinal do solvente intenso (GOUVEIA et al., 2017). O PRESAT possui dois pulsos de RF e um tempo de espera (delay) para estabelecer o equilíbrio do campo: Um primeiro pulso seletivo, para saturar seletivamente a frequência específica do sinal da água, sendo longo e de baixa potência, seguido de um segundo pulso não seletivo de 45° ou 90° para adquirir o espectro propriamente dito (GOUVEIA et al., 2017).

Outra sequência de pulso utilizada é a CPMG (Carr-Pucell-Meiboom-Gill), que consiste na aplicação de um pulso de 90° e sucessivos pulsos de 180° com intervalos de tempo bem definido entre eles (LENZ; WILSON, 2007). Essa sequência é utilizada como filtro de T2 e visa eliminar (ou diminuir a intensidade) os sinais de espécies mais pesadas, como os atribuídos as Lipoproteínas de alta densidade (HDL) e Lipoproteínas de baixa densidade (LDL), que têm valores baixos de T2 e se apresentam no espectro de forma alargada, dificultando a visualização dos sinais atribuídos aos compostos de baixa massa molar (YU et al., 2017; SONG et al., 2018).

2.8 QUIMIOMETRIA

A Quimiometria é a área do conhecimento que utiliza dados estatísticos para extrair informações químicas. Ela se divide em três subáreas: Planejamento de experimentos; Calibração multivariada; e Reconhecimento de padrões. O Reconhecimento de Padrões para construção dos modelos metabonômicos que são capazes de extrair informações de dados complexos, como os espectros de RMN, permitindo que os padrões de classe sejam identificados mais facilmente do que os sinais observados nos espectros originais. Os métodos de estatística multivariada para esse fim podem ser classificados como supervisionados e não supervisionados. As técnicas não supervisionadas são utilizadas para identificar se existe algum agrupamento natural dentro do conjunto de dados ou para identificar amostras anômalas (*outliers*). Esses métodos mapeiam as amostras de acordo com suas propriedades, sem o conhecimento prévio de associação das classes. Uma das técnicas mais utilizadas nos estudos metabonômicos é a análise de componentes principais (PCA) (WORLEY; POWERS, 2012).

A PCA busca encontrar padrões naturais de agrupamento entre as amostras. As variáveis construídas são chamadas de componentes principais (PCs) e são eixos

ortogonais entre si, que buscam explicar a variância contida no conjunto de dados. As PCs são apresentadas em ordem decrescente, em função do que explicam a variância, ou seja, a primeira componente principal (PC1) é a que mais explica a variância contida no conjunto de dados; PC2 é a segunda mais importante e assim por diante. Afirmar que elas são ortogonais, significa dizer que a variância explicada por uma PC não tem relação com a variância explicada por outra PC. Isso é importante, pois reduz a dimensionalidade da matriz. (GROMSKI et al., 2015).

Por outro lado, os métodos supervisionados utilizam a informação de classe das amostras e são capazes de prever a que classe uma amostra desconhecida pertence. Um exemplo é a Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) e Análise discriminante ortogonal por mínimos quadrados parciais (OPLS-DA), que são os formalismos usados com maior frequência na metabonômica (NICHOLSON et al., 2007; WORLEY; POWERS, 2012).

Como medida para avaliar a representatividade dos dados utilizados na construção dos modelos e a sua capacidade de verificar o sobreajuste, é utilizado o método de validação dos modelos.

A validação cruzada (LOOCV), é utilizada para calcular a acurácia utilizando um número n de amostras – 1. Este processo é repetido para todas as amostras do conjunto, sendo extraído uma amostra por teste ($n - 1$). LOOCV também é utilizada para avaliar o número de variáveis latentes para o modelo PLS-DA, utilizando os valores do Coeficiente de Determinação (R^2) e a Capacidade Preditiva (Q^2), que medem a acurácia e a predição de cada modelo respectivamente. A acurácia mede a proximidade de um resultado com o seu valor real. A predição expressa o possível resultado próximo ao valor real (GROMSKI et al., 2015).

No método de PLS-DA também é empregado o *Variable Importance Projection* (VIP), através desse score podemos avaliar quais são as variáveis de maior ou menor peso para a discriminação das amostras de classe (GOUVEIA et al., 2017).

Outro método de validação consiste no teste de permutação, que se baseia na verificação da precisão do modelo permutado com o modelo construído definindo um número fixo de permutações que variam de 20 a 2000 permutações (PONTES et al., 2019).

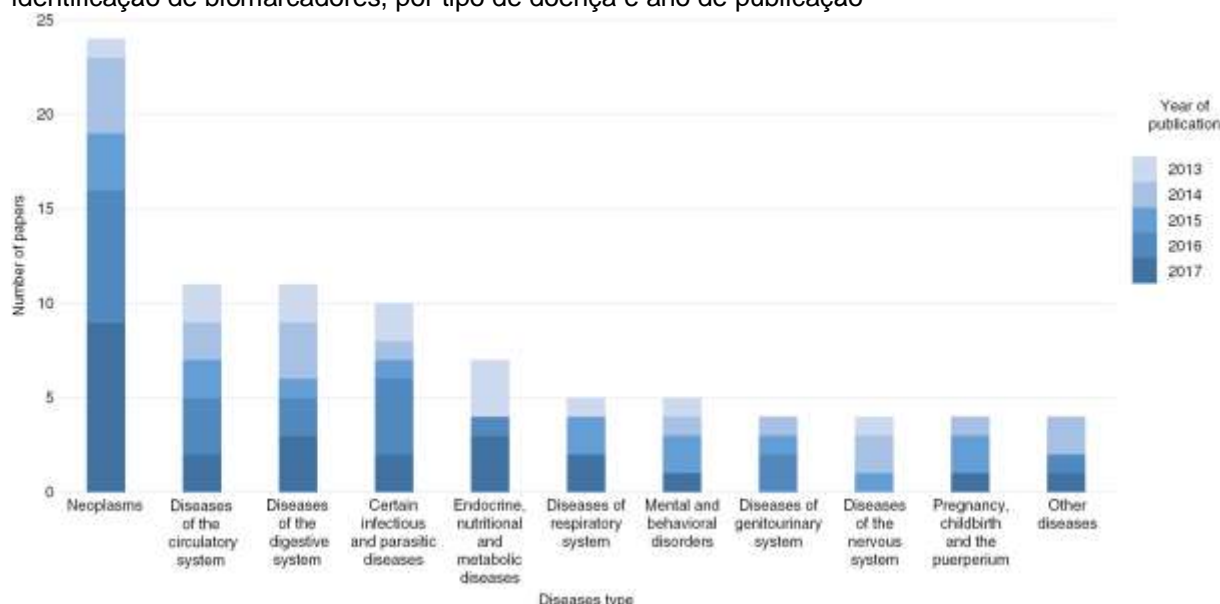
Os avanços relevantes das técnicas metabólicas baseadas em espectroscopia são promissores como resposta alternativa às limitações das técnicas convencionais. A

metabonômica tem sido utilizada com êxito no estudo de várias doenças infecciosas (SONG et al., 2018).

O número de estudos científicos empregando as técnicas *ômicas* vem aumentando a cada ano, pois eles têm demonstrado potencial na investigação do diagnóstico das doenças e nas descobertas de novos biomarcadores das vias metabólicas. A Figura 6 apresenta o quantitativo de trabalhos publicados de 2013 a 2017 sobre metabonômica utilizando RMN de ^1H na busca e identificação de biomarcadores em relação ao tipo da doença (SONG et al., 2018).

Os trabalhos utilizando RMN em infecções parasitárias estão em desenvolvimento, necessitando de um maior número de estudos de validação (SONG et al., 2018).

Figura 6 - Trabalhos publicados em metabonômica, utilizando espectroscopia por RMN ^1H , na busca e identificação de biomarcadores, por tipo de doença e ano de publicação



Fonte: SONG et al. (2018).

A aplicação da estratégia metabonômica representa um modelo que contrapõe o caminho das análises clínicas, que visa à determinação dos valores absolutos, marcadores específicos, para um modelo no qual busca-se inicialmente a discriminação das amostras e identificação de quais variáveis são importantes para essa discriminação. Só então, essas variáveis são atribuídas a diferenciação dos metabólitos (GOUVEIA et al., 2017).

A modificação do perfil de metabólitos no ambiente bioquímico intra e extracelular nos pacientes com esquistossomose expressa os diferentes estágios de fibrose hepática. Portanto, o modelo metabonômico pode ser útil para avaliar os estágios de FPP (BALOG et al., 2011).

A pesquisa das parasitoses na metabonômica deve ser comparada e integrada com rotinas padronizadas que são utilizadas rotineiramente em laboratório de análises. No campo científico da metabonômica, pode-se mencionar uma tendência na padronização de fluxos de trabalhos como uma forma de tornar os dados acessíveis, de forma que, no futuro, a técnica possa ser empregada nas rotinas das análises clínicas (KOKOVA et al., 2017).

Ainda que os estudos científicos utilizando a metabonômica na avaliação das doenças estejam em ascensão, as alterações causadas pela esquistossomose necessitam ser melhor esclarecidas para desenvolver melhores ferramentas de monitoramento da morbidade, interação parasita-hospedeiro e novas compreensões da imunopatogênese e tratamento.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Construir modelos metabonômicos, a partir dos espectros de RMN de ^1H , que permitam discriminar o padrão da fibrose periportal, tendo como padrão-ouro a classificação ultrassonográfica de Niamey, em pacientes que tiveram esquistossomose mansônica.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever as características demográficas e laboratoriais dos pacientes esquistossomóticos com FPP leve (padrão C de Niamey) e FPP significativa (padrões D, E e F de Niamey)
- Obter espectros de RMN de ^1H das amostras de soro de pacientes com fibrose periportal por esquistossomose.
- Construir modelos metabonômicos, a partir dos espectros de RMN de ^1H , que permitam diferenciar os padrões estabelecidos pela classificação de Niamey durante ultrassonografia.
- Identificar a concentração relativa, em cada classe (FPP leve x FPP significativa), dos metabólitos responsáveis pela discriminação.

4 METODOLOGIA

4.1 DESENHO DO ESTUDO

Trata-se de estudo transversal, prospectivo, por amostra de conveniência. Estudo de validação de teste diagnóstico de fase II (SACKETT, 2002). Na primeira etapa do estudo, foram construídos modelos metabonômicos para diferenciar os indivíduos com FPP leve e FPP significativa. Na segunda etapa foi realizado a análise do desempenho dos MMs para predição de FPP significativa, utilizando o US como padrão de referência. Na terceira etapa, a descrição dos principais metabólitos presentes em cada grupo de FPP e a sua relação com os marcadores séricos.

4.2 POPULAÇÃO DE ESTUDO

A população alvo deste estudo foi composta por pacientes residentes no estado de Pernambuco entre 18 e 80 anos infectados pelo *Schistosoma mansoni* com FPP evidente, recrutados durante exame de US no período de março a novembro de 2019.

Os pacientes foram estratificados em dois grupos: FPP leve (padrão C) e pacientes com FPP significativa (padrões D, E, F e Dc).

Definição dos grupos de estudo:

- I) FPP leve – Constituído por pacientes com diagnóstico parasitológico positivo ou histórico epidemiológico de esquistossomose e com FPP padrão C de Niamey na US;
- II) FPP significativa – Constituído por pacientes com diagnóstico parasitológico positivo ou histórico epidemiológico de esquistossomose e com FPP padrões D, E, F e Dc de Niamey na US.

4.3 LOCAL DE ESTUDO

Os pacientes foram recrutados no Serviço de Esquistossomose do Hospital das Clínicas/ Universidade Federal de Pernambuco (HC/UFPE), cujo ambulatório recebe pacientes de todo o estado de Pernambuco. O material biológico utilizado foi coletado através de punção de veia periférica, no momento do US, centrifugação e obtenção do soro.

Os exames laboratoriais foram realizados no Laboratório Central de Análises Clínicas do HC/UFPE como parte do *checklist* de exames de rotina do ambulatório de esquistossomose, e os espectros de RMN de ^1H foram obtidos no laboratório da Central Analítica do Departamento de Química Fundamental (DQF/UFPE).

4.4 CRITÉRIO DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Os critérios de inclusão foram: pacientes com diagnóstico de esquistossomose mansônica, de ambos os sexos, com idade igual ou maior que 18 anos. O diagnóstico de esquistossomose foi baseado na história clínica de contato com fontes de água em áreas endêmicas, relatos de tratamento prévio com praziquantel, juntamente com os achados no US de FPP.

Os critérios de exclusão foram: pacientes esplenectomizados, doença hepática gordurosa, cirrose, carcinoma hepatocelular, trombose de veia porta, pacientes com marcadores dos vírus HIV ou das hepatites B ou C, ou outras doenças hepáticas, histórico de lesão hepática induzida por drogas ou de abuso de álcool.

4.5 CATEGORIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS

VARIÁVEL DEPENDENTE

Variável	Definição	Categorização
Espectro de RMN	Deslocamentos químicos obtidos dos espectros de RMN de ^1H .	Variável numérica contínua: Área de integração de cada bin

VARIÁVEIS INDEPENDENTES

Variável	Definição	Categorização
Sexo	Refere-se ao sexo do paciente.	Variável categórica dicotômica: Masculino; Feminino.
Idade	Intervalo entre a data de nascimento e o recrutamento do paciente ao estudo (em anos).	Variável numérica discreta.
Análises laboratoriais	Análises bioquímicas em soro (Glicose, Colesterol, AST,ALT, ALP e GGT)	Variável numérica contínua: Colesterol e Glicose em (mg/dl);
	Quantificação de plaquetas em plasma com EDTA	Plaquetas em mm ³ ; AST, ALT, ALP e GGT em U/L.
Classificação da Fibrose Periportal	Exame de ultrassonografia abdominal utilizando a classificação de Niamey como referência	FPP leve (Padrão C) FPP acentuada (Padrões C, D E, F e D/C)

4.6 ULTRASSONOGRAFIA ABDOMINAL

Os pacientes incluídos neste estudo foram submetidos à US após jejum noturno, utilizando o equipamento Siemens Acuson S2000 (Siemens Medical Solutions, Mountain View, CA, EUA) com um Transdutor de 6C1 MHz para US. A US foi realizada sempre pelo mesmo operador experiente utilizando a classificação de Niamey para classificação da FPP, sendo: padrão C (periférico), D (central), E (avançado) e F (muito avançado).

4.7 PROCESSAMENTO E ARMAZENAMENTO DO SORO

A metodologia utilizada com os fluidos biológicos durante o fluxo de trabalho até a aquisição dos espectros interfere na preservação da composição química e concentração dos metabolitos. Um correto fluxo de trabalho é composto pela fase pré-analítica, incluindo etapas de coleta e armazenamento da amostra e a fase analítica, que segue com a preparação da amostra, nesse caso, de acordo com a RMN (Figura 7). Nos últimos anos a literatura levou ao desenvolvimento de Procedimentos Operacionais Padrão (POPs) para biofluidos utilizando as aplicações de modelos metabonômicos (BERNINI et al., 2011; GHINI et al., 2019).

Figura 7 -Fluxo de trabalho para metabonômica



Fonte: GHINI et al., (2019), adaptado.

Após a coleta em veia periférica o material biológico foi encaminhado ao Setor de Bioquímica e Hematologia do Laboratório Central HC/UFPE, onde foram centrifugados, como parte da rotina *check-up* ambulatorial. Uma alíquota do soro obtido foi encaminhado ao DQF/ UFPE onde foi armazenado a -40°C no banco de soro para posteriormente obter os espectros por RMN de ^1H no Laboratório da Central Analítica do DQF/UFPE.

4.8 ANÁLISE DOS MARCADORES SÉRICOS E PLAQUETAS

Os exames laboratoriais realizados fazem parte da rotina da solicitação médica dos pacientes atendidos no serviço de Esquistossomose do HC/UFPE. As análises bioquímicas (Colesterol total e frações, Glicose, AST, ALT, FAL e GGT) foram realizados pelo método cinético automatizado (kits Wiener Lab®) em equipamento de automação Wiener Lab® (Wiener Lab Group), conforme o fabricante.

A contagem de plaquetas foi realizada através do equipamento de automação para hematologia Pentra 120® (Horiba ABX Diagnostics).

4.9 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDROGÊNIO- 1

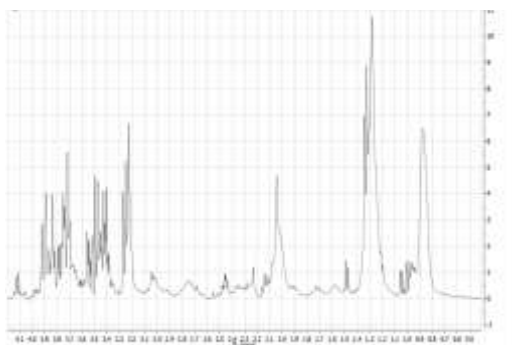
O soro armazenado a - 40°C foi descongelado em temperatura ambiente, após o descongelamento foi submetido ao agitador vortex por 1 minuto para homogeneização do material. Em seguida, foram adicionados 400µL de soro a 200 µL de água deuterada (D₂O, D 99.9%, Cambridge Isotope Laboratories, Inc., Tewksbury, USA) em um tubo de RMN de 5 mm. Os espectros de RMN de ^1H foram adquiridos na Central Analítica do DQF/UFPE, utilizando o espectrômetro Varian Unity Plus operando a 400 MHz utilizando o lactato como referência interna de deslocamento químico (δ 1,33 ppm).

Utilizou-se o ajuste de fase do canal de hidrogênio, verificação de temperatura e spin (27° C/ 20 Hz), homogeneização de campo com um número de scan = 1 e um ajuste de fase em torno de 3-5 ppm.

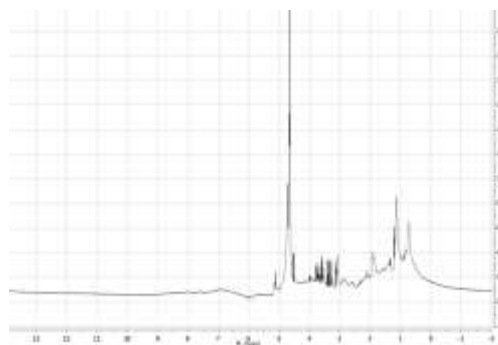
Durante a aquisição do espectro de RMN de ^1H para supressão do sinal da água, utilizou-se a sequência de pulsos com pré-saturação (PRESAT) (Figura 8A) e uma sequência CPMG utilizando um filtro de T2, para melhor visualização das moléculas de baixo peso molecular e melhor resolução espectral (Figura 8B).

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

A)



B)



Fonte: A autora, 2020.

Foram utilizados os seguintes parâmetros: janela espectral de 6410.3 kHz, tempo de saturação de 2,0 s, tempo de aquisição de 2,556 s, pulso de RF de 90°, temperatura de 27°C, 88 ciclos, tau igual a 0,0004 s, bigtau igual a 0,07 s e 128 repetições. Os espectros foram processados usando *line broadening* igual a 0,3 Hz. A linha de base e a fase foram corrigidas manualmente, usando o software Mestre Nova 12.0.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

4.10.1 Análise estatística descritiva e univariada

Para investigar a distribuição dos dados demográficos e laboratoriais entre os grupos, foram realizados testes univariados usando o *software* GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA). As variáveis qualitativas foram apresentadas com frequências absolutas e relativas. Os dados quantitativos foram apresentados por valores da média e

desvio padrão. O teste exato de Fisher foi utilizado para variáveis categóricas. O teste Mann-Whitney e o teste T foram utilizados para análise contínuas não paramétricas e paramétricas, respectivamente. Um valor de $p < 0,05$ foi definido como o nível de significância estatística a 95% de confiança

4.10.2 Análise estatística multivariada dos dados espectrais

Para análise estatística multivariada foi utilizado o software Mestre Nova 12.0. Foram corrigidos manualmente a linha de base e de fase. Foi utilizado o método de binagem, permitindo o alinhamento do espectro e a filtragem de ruídos a 0,004 ppm. A região entre δ 4,004-0,774 ppm foi dividida em bins de 0,004 ppm, resultando em 808 variáveis (bins). Foi construída uma matriz contendo 41 linhas (amostras) e 809 variáveis (808 bins mais a variável de classe), sendo esta matriz submetida à análise multivariada (Figura 9).

Os dados foram pré-processados na linha (normalização pela média) e na coluna (autoescalamento), utilizando a plataforma online MetaboAnalyst versão 4.0. Após o pré-processamento, os dados foram submetidos aos formalismos: PCA, PLS-DA e OPLS-DA. Os modelos metabonômicos foram validados por meio do teste de permutação, com 2000 permutações e por meio da validação cruzada *Leaving-One-Out* (LOOCV). Os resultados dos modelos são apresentados nos gráficos de escores e VIP (*variables important for projection*), na PLS-DA, enquanto para o formalismo OPLS-DA, foram identificadas as variáveis (bins) mais importantes para a discriminação, em função dos pesos (Apêndice 1).

Os metabólitos endógenos associados a esses bins foram atribuídos utilizando metabólitos já identificados pela literatura (PONTES et al., 2019; WANG et al., 2004; LI et al., 2011) e a plataforma *The Human Metabolome Database* (HMDB). Para o modelo OPLS-DA, uma tabela de contingência 2x2 foi utilizada para cálculo da sensibilidade (S), especificidade (E), valor preditivo positivo (VPN), valor preditivo negativo (VFN) e acurácia (A).

Figura 9- Matriz de bins para construção dos modelos metabonômicos

[illegible]

Fonte: Fonte: A autora, 2020.

CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital das Clínicas da UFPE/ EBSERH, sob o protocolo de número 3.222.710 (ANEXO A).

5 RESULTADOS

5.1 ARTIGO: ASSESSMENT OF PERIportal FIBROSIS IN SCHISTOSOMIASIS MANSONI PATIENTS BY ¹H NMR-BASED METABONOMICS

1. INTRODUÇÃO

A esquistossomose é uma doença tropical provocada por vermes do gênero *Schistosoma*, que permanece vigente no mundo. Aproximadamente 779 milhões de pessoas estão em risco de infecção e aproximadamente 252 milhões de pessoas estão infectadas. No Brasil a única espécie presente nas regiões endêmicas é o *Schistosoma mansoni* [1]. Em Pernambuco, é considerada endêmica estando presente em 102 dos 186 municípios [2], [3].

A fibrose periportal (FPP), induzida pelo ovo do helminto, acomete o tronco da veia porta e seus ramos podendo estender-se para os ramos intra-hepáticos periféricos, sem promover destruição dos hepatócitos [4].

Para o diagnóstico e mensuração da FPP, através de métodos de imagem, utiliza-se a ultrassonografia (US) com o protocolo padronizado da OMS: Niamey-Belo Horizonte. Esse protocolo classifica 6 padrões de intensidade da FPP de A (ausência de FPP) ao F (FPP muito avançada). Além de padrões mistos, sendo permissíveis à combinação: D/C e E/C [5], [6].

Apesar da US possibilitar o diagnóstico e a mensuração da FPP, seu emprego tem limitações, como a indisponibilidade do aparelho em alguns locais, sua baixa sensibilidade nas formas iniciais da doença, além da variação inter-observador e necessidade de examinador experiente [4], [7].

Em virtude destas dificuldades para o emprego rotineiro da US, outras ferramentas vêm sendo utilizadas como os biomarcadores séricos, isoladamente ou em associação, através de índices ou escores. Dados da literatura evidenciam relação inversa entre o número de plaquetas e o padrão de FPP, bem como relação direta entre os níveis séricos de enzimas hepáticas e o padrão de FPP [8].

Recentemente, a estratégia metabonômica foi empregada na avaliação da fibrose em doenças hepáticas crônicas [9], [10]. O termo metabonômica do grego = *meta*, mudança e *nomos* = *regras* ou *leis*, foi definido em 1999, por Jeremy Nicholson, Elaine Homes e John

Lindon, como sendo modelos quimiométricos que visam a identificação de padrões, a partir de mudanças metabólicas, como função de um agente externo. A metabonômica analisa e associa o perfil de metabólitos endógenos com o status bioquímico do biofluido, sem a separação física dos componentes, como um *screening* da amostra, utilizando, por exemplo, a espectroscopia de RMN de ^1H [11].

A espectroscopia de RMN de ^1H é uma ferramenta capaz de explorar as propriedades dos núcleos atômicos inseridos em um campo magnético externo, utilizando ondas de radiofrequência para alcançar informações, através de sinais espectrais. A intensidade do sinal emitido está diretamente relacionada com a concentração dos compostos presentes no meio [10], [12]. A RMN de ^1H se adequa ao princípio da metabonômica por ser rápida, não destrutiva, não seletiva e com intervenções mínimas para o preparo da amostra e utiliza o núcleo de ^1H por ter alta abundância isotópica, sensibilidade magnética e estar presente nos principais metabólitos endógenos [9].

A Quimiometria é a área do conhecimento que utiliza dados multivariados para extrair informações químicas. Neste estudo, foi utilizado o Reconhecimento de Padrões para construção dos modelos metabonômicos que foram capazes de extrair informações do conjunto de dados espectrais, permitindo que os padrões de classe fossem identificados mais facilmente do que os sinais observados nos espectros originais. Os métodos de estatística multivariada para esse fim podem ser classificados como supervisionados e não supervisionados [11], [13]. As técnicas não supervisionadas são utilizadas para identificar se existe algum agrupamento natural dentro do conjunto de dados ou para identificar amostras anômalas (*outliers*). Esses métodos mapeiam as amostras de acordo com suas propriedades, sem o conhecimento prévio de associação das classes. Uma das técnicas mais utilizadas nos estudos metabonômicos é a análise de componentes principais (PCA) [13]. Por outro lado, os métodos supervisionados utilizam a informação de classe das amostras e são capazes de prever a que classe uma amostra desconhecida pertence. A Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) e Análise discriminante ortogonal por mínimos quadrados parciais (OPLS-DA) são os formalismos usados com mais frequência em estudos metabonômicos [11], [13].

Por fim, em decorrência das dificuldades do emprego do exame de US e a possibilidade de se utilizar um método objetivo para mensurar a FPP, através de uma amostra de soro, este estudo tem como objetivo criar modelos metabonômicos, a partir de dados espectrais de RMN, que permitam classificar o padrão de FPP em pacientes com

esquistossomose mansônica e identificar as concentrações de metabólitos em cada padrão da FPP.

2. PACIENTES E MÉTODO

Trata-se de estudo analítico do tipo transversal, prospectivo, realizado em pacientes adultos com esquistossomose mansônica, para avaliar o padrão de FPP através de modelos metabonômicos, a partir de dados espectrais de RMN.

2.1. PACIENTES

A seleção dos pacientes foi realizada no ambulatório de Esquistossomose do Serviço de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC/UFPE), em Recife, no período de março a dezembro de 2019. Após análise do prontuário de cada paciente com a verificação dos dados epidemiológicos, clínicos e laboratoriais, o paciente foi selecionado. O estudo foi explicado ao participante de acordo com a Declaração de Helsinque, aderindo às diretrizes de boas práticas em estudos com seres humanos. Após a leitura ou escuta do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) com todas as informações sobre o estudo expostas de forma clara e em linguagem acessível, todos os pacientes concordaram em participar voluntariamente e assinaram o termo. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) envolvendo seres humanos do Hospital das Clínicas da UFPE/ EBSERH, sob o protocolo de número 3.222.710.

Os critérios de inclusão foram: pacientes com diagnóstico de esquistossomose mansônica, de ambos os sexos, com idade igual ou maior que 18 anos. O diagnóstico de esquistossomose foi baseado na história clínica de contato com fontes de água em áreas endêmicas, relatos de tratamento prévio com praziquantel, juntamente com os achados na US de FPP. Os critérios de exclusão foram: pacientes esplenectomizados, doença hepática gordurosa, cirrose, carcinoma hepatocelular, trombose de veia porta, pacientes com marcadores dos vírus HIV ou das hepatites B ou C, ou outras doenças hepáticas, histórico de lesão hepática induzida por drogas ou de abuso de álcool.

2.2. ULTRASSONOGRAFIA ABDOMINAL

Todos os pacientes realizaram US de abdome superior, após jejum noturno de cerca de 8 horas, sendo examinados pelo mesmo operador experiente (ALCD). No exame de US, foi avaliado o padrão da FPP, pela classificação de Níamey, que permite estratificar o padrão de FPP de acordo com a localização no parênquima hepático: padrão C (fibrose periférica), D (central), E (avançado) e F (muito avançado) [14]. Não foram selecionados para o estudo pacientes que não apresentavam ou que apresentavam FPP duvidosa (padrões do tipo A ou B). Foi utilizado o equipamento de US Siemens Acuson S2000 (Siemens Medical Solutions, Mountain View, CA, EUA) com um transdutor de 6C1 MHz para US.

Análise laboratorial

Os pacientes tiveram amostras de sangue coletadas, a partir de veia periférica, que foram centrifugadas, no equipamento Centurion–Labor Line, com 3250 rpm, em seguida os soros foram alíquotados em duas amostras. Uma amostra foi armazenada a -20°C no Laboratório Central do HC-UFPE e, posteriormente, os soros foram analisados usando kits Wiener Lab® em um analisador automático Wiener Lab® (Wiener Lab Group, Argentina), de acordo com as instruções do fabricante para os testes de função hepática, incluindo alanina e aspartato aminotransferase (ALT e AST), gama-glutamil transferase (GGT), fosfatase alcalina (FAL), perfil lipídico (colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL) e glicemia.

Análise estatística

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

Análise de RMN e Modelos Metabonômicos

A segunda alíquota foi enviada à Central analítica do Departamento de Química Fundamental da UFPE, onde foram armazenadas a -40°C até que a análise por RMN fosse realizada. Após descongelamento, até temperatura ambiente, e homogeneização, foram adicionados 400 μL de soro a 200 μL 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 adquiridos, utilizando o espectrômetro VNMRSYS400 operando a 400 MHz, utilizando o sinal atribuído ao grupo metil do lactato como referência interna de

deslocamento químico (δ 1,33 ppm). Os espectros de RMN de ^1H foram adquiridos usando uma sequência de pulsos CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill), com pré-saturação (PRESAT) do sinal de água. Foram utilizados os seguintes parâmetros: janela espectral de 6410,3 kHz, tempo de saturação de 2,0 s, tempo de aquisição de 2,556 s, pulso de RF de 90° , temperatura de 27°C , 88 ciclos, tau igual a 0,0004 s, bigtau igual a 0,07 s e 128 repetições. Os espectros foram processados usando *line broadening* igual a 0,3 Hz. A linha de base e a fase foram corrigidas manualmente, usando o software MestreNova 12.0. A região entre δ 4,004-0,774 ppm foi dividida em bins de 0,004 ppm, resultando em 808 variáveis (bins). Foi construída uma matriz contendo 41 linhas (amostras) e 809 variáveis (808 bins mais a variável de classe), sendo esta matriz submetida à análise multivariada. Os dados foram pré-processados na linha (normalização pela média) e na coluna (autoescalamento), utilizando a plataforma online MetaboAnalyst versão 4.0[15]. Após o pré-processamento, os dados foram submetidos aos formalismos: PCA, PLS-DA e OPLS-DA. Os modelos metabonômicos foram validados por meio do teste de permutação, com 2000 permutações e por meio da validação cruzada *Leaving-One-Out* (LOOCV). Os resultados dos modelos são apresentados nos gráficos de escores e VIP (*variable important for projection*), na PLS-DA; enquanto, para o formalismo OPLS-DA, são identificadas as variáveis (bins) mais importantes para a discriminação, em função dos pesos. É apresentada uma tabela de contingência, de onde são extraídos os valores de sensibilidade e especificidade do modelo. Os metabólitos endógenos associados a esses bins foram atribuídos utilizando dados da literatura [16], [17], [18] e a plataforma *The Human Metabolome Database* (HMDB).

3. RESULTADOS

Foram incluídos no estudo 44 pacientes, sendo que 3 foram excluídos porque suas amostras se apresentaram como *outliers* (fora dos padrões), restando 41 pacientes, cujos dados demográficos e laboratoriais encontram-se na Tabela 1. Após a realização do exame de US, 10 pacientes apresentavam FPP padrão C, 1 padrão D, 17 padrões E, 2 padrões F e 11 padrões D/C de acordo com a classificação de Niamey. Os pacientes foram divididos em dois grupos: (25%) com FPP leve (padrão C) e (75%) com FPP significativa (padrões D/E/F/Dc) [14].

A Tabela 1 mostra as características demográficas e laboratoriais dos dois grupos (FPP leve e FPP significativa). Houve diferença significativa ($p < 0,05$) pelos níveis séricos

mais elevados de GGT ($p = 0,0013$) e a contagem de plaquetas mais baixas ($p < 0,0001$) nos pacientes com FPP significativa.

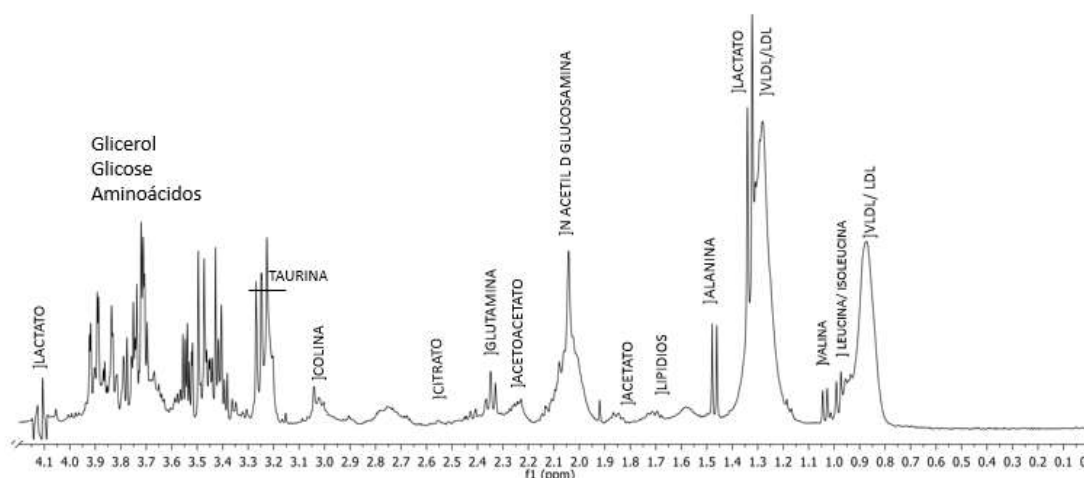
Tabela 1-Características demográficas e laboratoriais de 41 pacientes com esquistossomose mansônica, Pernambuco, Brasil, 2020.

Características	Total	FPP leve (padrão C)	FPP significativa (padrão D/E/F)	<i>p</i>
N	41	10	31	
Idade (anos)*	57 (18-80)	48,1 (18–75)	57,2 (25-80)	0,0865 ^a
Sexo Mas (n, %)*	17 (41%)	5 (40%)	12 (39%)	0,4820 ^b
Fem (n, %)*	24 (59%)	5 (50%)	19 (61%)	
AST (U/L)	29,0 ± 2,6	24,3 ± 1,9	30,0 ± 2,9	0,3328 ^c
ALT (U/L)	29,0 ± 2,2	26,2 ± 4,5	30,0 ± 3,2	0,4584 ^c
ALP (U/L)	262 ± 33	329 ± 113	238 ± 22	0,6379 ^c
GGT (/LSN)	62 ± 12	35 ± 16	71,2 ± 14,0	0,0013^c
Plaquetas (/mm ³)	131 ± 12	218 ± 15	102 ± 11	0,0001^c
Colesterol total (mg/dL)	169,0 ± 4,6	174,0 ± 7,2	167,8 ± 5,6	0,4626 ^c
HDL (mg/dL)	45,7 ± 2,0	49 ± 5,7	44,6 ± 2,0	0,4863 ^c
LDL (mg/dL)	105,0 ± 3,8	108 ± 4,7	104 ± 4,8	0,3760 ^c
Glicose (mg/dL)	93,6 ± 5,2	97 ± 14	92 ± 5,1	0,9451 ^c

^a Teste t de *Student* não pareado; ^b Teste exato de Fisher; ^c Teste de Mann-Whitney. Os dados marcados em (*) foram apresentados com a média percentual, os demais apresentam valores da mediana ± desvio padrão.

A Figura 1 ilustra um típico espectro de RMN de ¹H de soro, obtido a partir de uma das amostras de um dos pacientes. São apresentadas as atribuições de alguns sinais encontrados nas amostras dos pacientes com FPP esquistossomótica.

Figura- 1 Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (400 MHz, D_2O , presat-CPMG) de uma amostra de soro de uma paciente com esquistossomose mansônica, Pernambuco, Brasil, 2020.



A análise exploratória foi realizada utilizando o formalismo PCA. Porém não houve tendência de separação entre as classes (dados não apresentados). Os modelos metabonômicos foram construídos usando método supervisionado baseado no formalismo PLS-DA e OPLS-DA.

A Figura 2A mostra uma evidente separação entre os grupos. Esse modelo foi validado por LOOCV (*leave-one-out-cross validation*), enquanto a Figura 2B apresenta o desempenho do modelo, em função do número de variáveis latentes usadas na modelagem. Quanto à acurácia (classificações corretas), o melhor desempenho foi alcançado quando quatro variáveis latentes foram utilizadas. Nesse caso, foi observada exatidão igual a 0,85, R^2 igual a 0,80 e Q^2 igual a 0,38.

A Figura 3 apresenta o gráfico VIP (*Variable Importance for Projection*) e o resultado do teste de permutação, usando 2000 permutações, apresentou valor de $p = 0,0245$ (Figura 3B). No gráfico de escores VIP (Figura 3A), é observada uma região espectral, de δ 1,975 até δ 2,011 ppm, que discrimina os grupos estudados. Essa região é atribuída a grupos metilas de N-acetilglicosaminas.

Figura- 2 Resultados do MM para predição de FPP significativa por PLS-DA, usando amostras de 41 pacientes com esquistossomose mansônica, Pernambuco, Brasil, 2020. A) Gráfico de escores e B) Desempenho do modelo, em função do número de variáveis latentes utilizadas na PLS-DA – FPP significativa (vermelho)

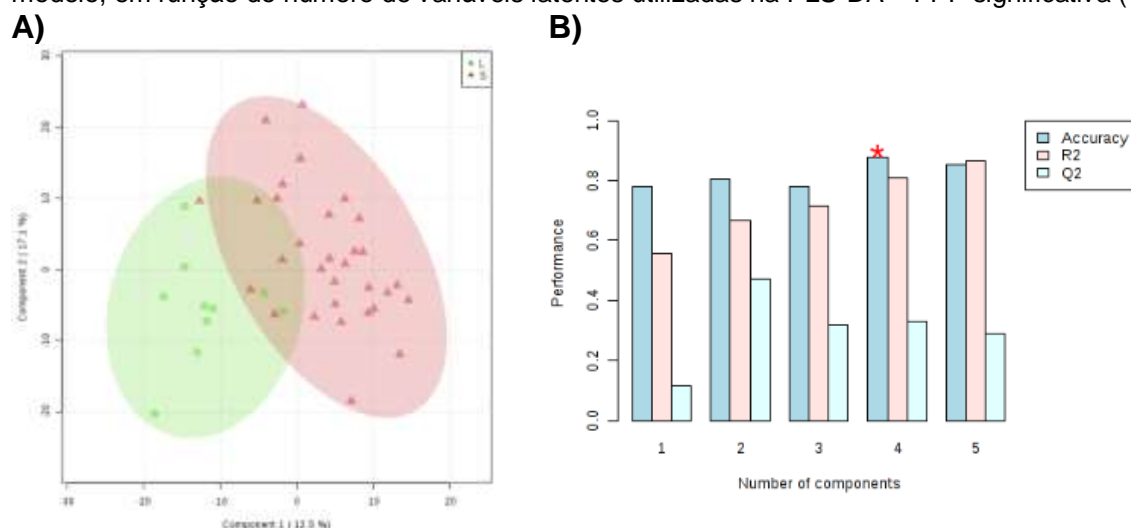
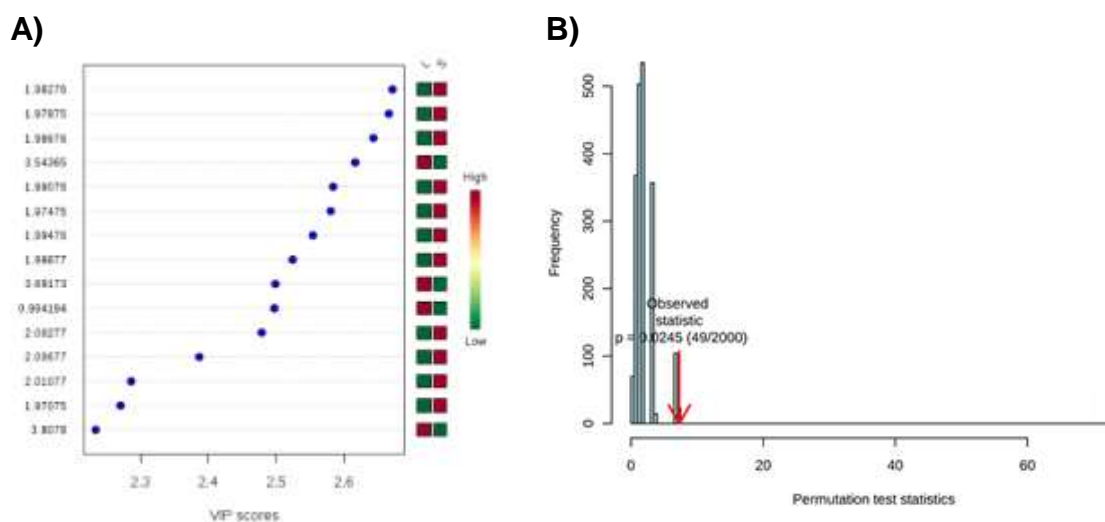


Figura- 3 Resultados da PLS-DA, usando amostras de 41 pacientes com esquistossomose mansônica, Pernambuco, Brasil, 2020. A) Gráfico com escores VIP. B) Teste de permutação com 2000 permutações $p = 0,0245$.

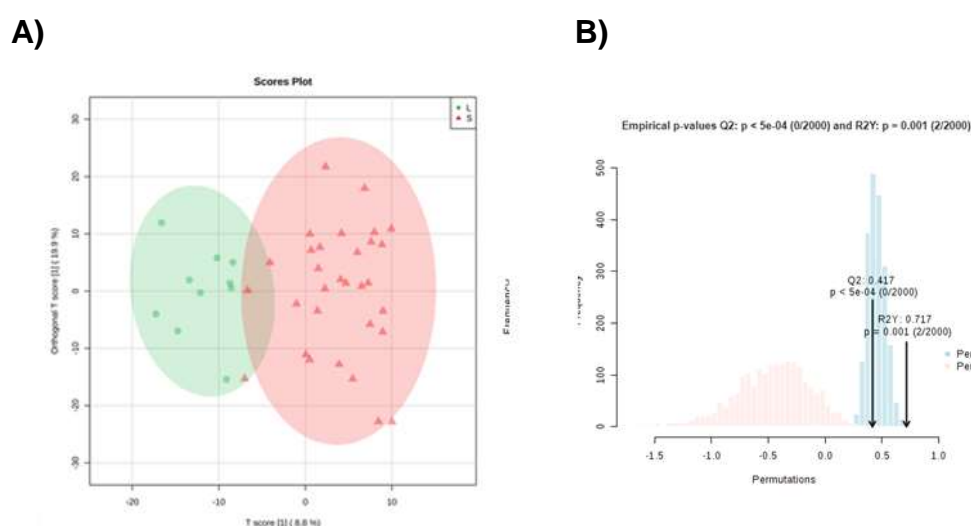


Observa-se ainda que as N-acetilglicosaminas se apresentam mais concentradas nas amostras do grupo de FPP significativa (Figura 3A). Além dessa região, são observados mais três bins discriminantes – δ 3,544; 3,692; e 3,808 ppm, que foram atribuídos a carboidratos. De acordo com o gráfico de escores VIP, há maior concentração desses carboidratos no grupo de pacientes com FPP leve. A tabela completa de escores VIP

também apresenta outros bins relevantes para a discriminação, como os bins centrados em δ 1,502 ppm (escore VIP = 1,98) e δ 3,492 ppm (escore VIP = 1,83), que foram atribuídos à alanina e ao glicolaldeído, respectivamente. Ambos estão mais concentrados em amostras do grupo FPP significativa (Apêndice A).

A Figura 4 apresenta o resultado da modelagem, usando o formalismo OPLS-DA. São apresentados o gráfico de escores e o resultado do teste de permutação, com 2000 permutações de classe.

Figura- 4 Resultado da OPLSDA, usando amostras de 41 pacientes com esquistossomose mansônica, Pernambuco, Brasil, 2020. A) Gráfico de Escores – FPP significativa (vermelho) e FPP leve (verde). B) Teste de permutação.



Assim como no modelo usando PLS-DA, há uma forte tendência de separação entre as amostras e o teste de permutação indica que o modelo tem significância estatística, com valores de $p < 0,001$. A regressão OPLS apresentou valores de R2 e Q2 iguais a 0,717 e 0,417, respectivamente. No gráfico de pesos (Apêndice A), são identificados quatro bins importantes para a discriminação, como segue: δ 1,030 ppm, atribuído à valina; δ 1,046 ppm, não atribuído; δ 1,446 ppm atribuído à alanina; e δ 3,692 ppm, atribuído a carboidratos. Os níveis séricos de valina, de carboidratos e do metabólito não identificado estão mais elevados no grupo com FPP leve. Enquanto o nível sérico de alanina mostrou-se mais elevado no grupo com FPP significativa.

A Tabela 2 apresenta, de forma resumida, os metabólitos responsáveis pela discriminação entre os grupos estudados, bem como o formalismo metabonômico utilizado,

o deslocamento químico (δ) atribuído aos metabólitos e o grupo no qual esses metabólitos se apresentam com nível sérico mais elevado.

Tabela 2 Metabólitos responsáveis pela discriminação entre pacientes com FPP Leve e FPP Significativa, a partir dos modelos metabonômicos construídos.

Metabólito	Deslocamento químico (δ /ppm)	Formalismo metabonômico	Grupo com maior nível sérico do metabólito
Valina	1,030	OPLS-DA	FPP Leve
Não identificado	1,046	OPLS-DA	FPP Leve
Alanina	1,446 e 1,502	PLS-DA e OPLS-DA	FPP Significativo
N-acetilglicosaminas	1,975 até 2,011	PLS-DA	FPP Significativa
Carboidratos	3,544; 3,692; e 3,808	PLS-DA e OPLS-DA	FPP Leve
Glicolaldeído	3,492	PLS-DA	FPP Significativo

A Tabela 3 apresenta a matriz de contingência após validação do modelo supervisionado OPLS-DA.

De acordo com a tabela de contingência, os valores de Acurácia (A), sensibilidade (S), especificidade (E), Valor Preditivo Positivo (VPP) e Valor Preditivo Negativo (VPN) iguais a 92,7%, 90,3%, 100%, 100% e 76,9%, respectivamente.

Tabela 3 Tabela de contingência para o modelo FPP leve versus FPP significativa, usando amostras de 41 pacientes com esquistossomose mansônica, Pernambuco, Brasil, 2020 (Formalismo OPLS-DA).

Modelo Metabonômico	Classificação por US		
		FPP Significativa	FPP Leve
			p^a
	FPP Significativa	28	0
	FPP Leve	3	10

A= 92,7%; S= 90,3%; E= 100%; VPP= 100% VPN= 76,9% ^a Teste de Fisher

4. DISCUSSÃO

A FPP é uma marca da doença hepática pelo *S. mansoni*, que apresenta fundamental importância na morbidade e, conseqüentemente, no prognóstico da enfermidade, exigindo um monitoramento periódico [19]. Nos últimos anos, alguns marcadores, incluindo os de imagem, como a ultrassonografia e a elastografia, ou os biológicos, como os biomarcadores ou marcadores séricos, vêm sendo utilizados na avaliação da FPP em pacientes com esquistossomose [2, 20]. Entre os marcadores séricos para a avaliação da FPP em

pacientes com esquistossomose, destacam-se os níveis das enzimas hepáticas, a contagem de plaquetas de forma isolada ou em associação com a fosfatase alcalina, como se utiliza no índice Coutinho [2,7,8]

Os dados laboratoriais observados neste estudo indicam níveis séricos mais elevados das enzimas hepáticas, em especial da GGT, e menor número de plaquetas nos pacientes com FPP significativa. Outros autores também observaram maiores níveis séricos de GGT nos casos com FPP mais avançada [8,22]. A redução do número de plaquetas também vem sendo descrita por diversos autores nos casos mais graves, inclusive uma relação inversa entre o número de plaquetas e o tamanho do baço em pacientes com esquistossomose mansoni [7,23,24]. A FPP mais grave na esquistossomose ocorre tanto pela maior carga parasitária ou por reinfecções repetidas, como pela resposta imunológica exacerbada do hospedeiro [25]. A presença dos vermes adultos nos vasos mesentérico/portais e a eliminação dos seus ovos promovem estímulo imunológico suficiente para induzir FPP e esplenomegalia (primária) pela hiperplasia do sistema retículo-endotelial, o que proporciona a plaquetopenia por hiperesplenismo [14,23]. A esplenomegalia provoca também o hiperfluxo na veia esplênica, o que contribui para a hipertensão portal do tipo pré-sinusoidal [26]. Em adição, acredita-se que as alterações da hemodinâmica hepática desencadeadas pelo hiperfluxo portal nos pacientes com FPP significativa provoquem o aumento das enzimas hepáticas, como foi observado neste estudo [27,28].

Quanto ao estudo metabonômico, a análise exploratória não demonstrou boa separação das classes, observando-se sobreposição das amostras de grupos distintos, o que originou a necessidade de utilizar formalismos supervisionados para melhorar a discriminação. Os modelos que usaram Análise Discriminante promoveram boa separação entre os grupos, identificando os principais metabólitos associados à discriminação.

As alterações do fluxo portal na esquistossomose podem desencadear distúrbios do metabolismo dos aminoácidos nos hepatócitos [18]. Com efeito, neste estudo, os modelos metabonômicos que empregaram Análise Discriminante, demonstraram, nos espectros, níveis séricos de alguns aminoácidos, como valina, mais elevado no grupo de FPP leve; e alanina, mais elevado no grupo de FPP significativa. Estas alterações foram importantes para discriminar os grupos, nos dois formalismos empregados. Esses achados corroboram com estudos que correlacionam alteração nos níveis séricos desses aminoácidos em resposta às lesões hepáticas causada por esquistossomose em camundongos [29]. Diversos autores relataram alterações dos níveis séricos de valina e alanina, bem como sua relação

com o quadro clínico dos pacientes [30] e camundongos [17,29]. Provavelmente, as alterações nos níveis séricos desses metabólitos estejam associadas a distúrbios no metabolismo dos aminoácidos, decorrentes de maiores alterações do fluxo sanguíneo hepático mais associada à FPP significativa, vista nos pacientes mais graves.

Foram observados aumento no nível sérico de N-acetilglicosaminas, no grupo com FPP significativa, e de carboidratos, no grupo com FPP leve. A glicosamina é um produto do metabolismo da glicose, capaz de suprimir a produção de metaloproteinases, sendo fundamental para o controle do reparo tecidual e da arquitetura hepática [31]. Isso explica o aumento no nível sérico de N-acetilglicosaminas observado nas amostras dos pacientes cuja forma clínica é mais grave.

As limitações do estudo foram observadas em relação ao tamanho da amostra e a desproporcionalidade entre os padrões de FPP. Visto que, no ambulatório de esquistossomose do HC/UFPE o maior quantitativo de pacientes em acompanhamento possui FPP significativa, na medida em que este nosocômio é de referência na região para pacientes mais graves.

Enfim, estas alterações metabólicas foram responsáveis pela criação dos modelos metabonômicos, a partir de dados espectrais de RMN obtidos nos pacientes com esquistossomose mansoni. Os modelos construídos utilizando os formalismos PLS-DA e OPLS-DA mostraram-se eficientes para discriminar, de forma minimamente invasiva e não-operador-dependente, pacientes com FPP leve daqueles com FPP significativa.

As assinaturas metabólicas encontradas estão relacionadas principalmente ao metabolismo energético, à função hepática e ao controle do reparo tecidual e arquitetura hepática, em concordância com estudos anteriores. Esses achados são fundamentais no seguimento desses pacientes, principalmente nas regiões endêmicas, onde se pode coletar uma amostra de sangue e dispensar a necessidade de aparelhos *in loco*, e examinadores experientes. A metabonômica baseada em RMN forneceu uma “impressão digital metabólica” capaz de obter informações sistêmicas dos pacientes e identificar aqueles com as formas mais graves da esquistossomose. Isso nos permitirá avançar no entendimento dos mecanismos de evolução da doença e ser uma alternativa aos métodos convencionais de avaliação da FPP em pacientes com esquistossomose.

5. CONCLUSÃO

Este estudo criou modelos metabonômicos, a partir de dados espectrais de RMN, capazes de discriminar pacientes com esquistossomose mansônica e FPP significativa daqueles com FPP leve, com elevada acurácia, em decorrência de alterações no perfil de alguns metabólitos através dos formalismos PLS-DA e OPLS-DA.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Central Analítica do Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), onde foram obtidos os dados espectrais, e ao Hospital das Clínicas (UFPE), onde os participantes foram selecionados.

Também agradecem à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco – FACEPE, pelo apoio ao projeto, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pelas bolsas de mestrado concedida à Milena Lima Rodrigues e à Tatiane Priscila Santos Rodrigues Luz.

DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

ORCID

Milena Lima Rodrigues <https://orcid.org/0000-0003-1419-3088>

REFERÊNCIAS

1. Silva-Moraes V, Shollenberger LM, Maria L, Siqueira V, Castro-borges W, Harn DA, et al. Diagnosis of *Schistosoma mansoni* infections: what are the choices in Brazilian low-endemic areas? *Rev Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio Janeiro. 2019;114:1–12.
2. Domingues ALC, Medeiros TB de, Lopes EP de A. Ultrasound versus biological markers in the evaluation of periportal fibrosis in human *Schistosoma mansoni*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011;106(7):802–7.
3. Oliveira WJ, Magalhães F do C, Elias AMS, de Castro VN, Favero V, Lindholz CG, et al. Evaluation of diagnostic methods for the detection of intestinal schistosomiasis in endemic areas with low parasite loads: Saline gradient, Helmintex, Kato-Katz and rapid urine test. van Lieshout L, editor. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018 Feb 22;12(2):e0006232.
4. Domingues C. Parte V - Diagnóstico 32 -. In: *Diagnóstico por imagem*. 2008th ed. Rio de Janeiro; 2008.
5. el Scheich T, Holtfreter MC, Ekamp H, Singh DD, Mota R, Hatz C, et al. The WHO ultrasonography protocol for assessing hepatic morbidity due to *Schistosoma mansoni*. Acceptance and evolution over 12 years. *Parasitol Res*. 2014;113(11):3915–25.
6. Santos GT, Sales DM, Ribeiro A, Leão DS, Eduardo J, Santos M, et al. Reprodutibilidade da classificação ultra-sonográfica de Niamey na avaliação da fibrose periportal na esquistossomose mansônica. *Radiol Bras*. 2007;40(6):377–81.
7. Barreto AVMS, Alecrim VM, Medeiros TB de, Domingues ALC, Lopes EP, Martins JRM, et al. New index for the diagnosis of liver fibrosis in *Schistosomiasis mansoni*. 2017;(1):51–6.
8. Leite AC, Domingues ALC, Lopes EP, De Cássia R, et al. Relationship between splenomegaly and hematologic findings in patients with hepatosplenic schistosomiasis. *Orig Artic 332 Rev Bras Hematol Hemoter*. 2013 ;35(5):332–8.
9. Gouveia LR, Santos JC, Silva RD, Batista AD, Domingues ALC, Lopes EP de A, et al. Diagnosis of coinfection by schistosomiasis and viral hepatitis B or C using ¹H NMR-based metabonomics. *PLoS One*. 2017;12(8):e0182196.
10. Batista AD, Barros CJP, Costa TBBC, Godoy MMG de, Silva RD, Santos JC, 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 J Hepatol [Internet]*. 2018 Jan 27 10(1):105–15.
11. Nicholson JK, Lindon JC. System Biology: Metabolomics. *FEBS J*. 2007;274(5):1140–51.
12. Kokova D, Mayboroda OA. Twenty Years on: Metabolomics in Helminth Research. *Trends Parasitol*. 2019;35(4):282–8.
13. Worley B, Powers R. Multivariate Analysis in Metabolomics. *Curr Metabolomics* . 2012 ;1(1):92–107.
14. Carvalho Santos J, Dória Batista A, Maria Mola Vasconcelos C, Souza Lemos R, Romão

- de Souza Junior V, Dessein A, et al. Liver ultrasound elastography for the evaluation of periportal fibrosis in schistosomiasis mansoni: A cross-sectional study. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018;12(11):e0006868.
15. Chong J, Wishart DS, Xia J. Using MetaboAnalyst 4.0 for Comprehensive and Integrative Metabolomics Data Analysis. *Curr Protoc Bioinforma*. 2019;68(1):1–128.
 16. Pontes TA, Barbosa AD, Silva RD, Melo-Junior MR, Silva RO. Osteopenia-osteoporosis discrimination in postmenopausal women by ¹H NMR-based metabolomics. Monleon D, editor. *PLoS One*. 2019;14(5):e0217348.
 17. Wang Y, Holmes E, Nicholson JK, Cloarec O, Chollet J, Tanner M, et al. Metabonomic investigations in mice infected with *Schistosoma mansoni*: An approach for biomarker identification. *Proc Natl Acad Sci*. 2004;101(34):12676–81.
 18. Li J V, Saric J, Wang Y, Keiser J, Utzinger J, Holmes E. Chemometric analysis of biofluids from mice experimentally infected with *Schistosoma mansoni*. *Parasit Vectors* [Internet]. 2011;4(1):179.
 19. Elbaz T, Esmat G. Hepatic and Intestinal Schistosomiasis: Review. Vol. 4, *Journal of Advanced Research*. 2013. p. 445–52.
 20. Strimbu K, Tavel JA. What are Biomarkers? *NIH Public Access*. 2010;5(6):463-6.
 21. Richter J, Botelho MC, Holtfreter MC, Akpata R, El Scheich T, Neumayr A, et al. Ultrasound assessment of schistosomiasis. *Z Gastroenterol*. 2016;54(7):653–60.
 22. Köpke-Aguiar L, Martins JR, Passerotti C, Toledo C, Nader H, Borges DR. Serum hyaluronic acid as a comprehensive marker to assess severity of liver disease in schistosomiasis. *Acta Trop*. 2002. 84(2):117–26.
 23. Medeiros TB, Domingues ALC, Luna CF, Lopes EP, et al. Correlation between platelet count and both liver fibrosis and spleen diameter in patients with schistosomiasis mansoni. *Arq Gastroenterol*. 2014. 51(1):34–8.
 24. Lambertucci JR, Lambertucci JR. Revisiting the concept of hepatosplenic schistosomiasis and its challenges using traditional and new tools. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2014.47(2):130–6.
 25. Barbosa VS, E Guimarães RJ de PS, Loyo RM, Barbosa CS. Modelling of the distribution of *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria straminea* in the metropolitan region of Recife, Pernambuco, Brazil. *Geospat Health*. 2016;11(3):490.
 26. Coutinho, AD. 1968. Hemodynamic studies of portal hypertension in schistosomiasis. *Am. J. Med*. 44, 547–556.
 27. Alves A, Fontes DA, De Melo VA, Machado MCC, Cruz JF, Santos EAS. Hipertensão portal esquistossomótica: Influência do fluxo sanguíneo portal nos níveis séricos das enzimas hepáticas. *Arq Gastroenterol*. 2003, 40(4):203-8.
 28. Leite LAC, Filho AAP, Ferreira RCS, Fonseca CSM, Santos BS, Lopes EPA, Coutinho ALC. Splenectomy improves hemostatic and liver functions in hepatosplenic schistosomiasis mansoni. *PLoS One*. 2015;10(8):1–10.

29. Wu J, Xu W, Ming Z, Dong H, Tang H, Wang Y. Metabolic changes reveal the development of schistosomiasis in mice. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(8).
30. Balog CIA, Meissner A, Göröler S, Bladergroen MR, Vennervald BJ, Mayboroda OA, et al. Metabonomic investigation of human *Schistosoma mansoni* infection. *Mol Biosyst*. 2011;7(5):1473.
31. Li Y, Xie M, Men L, Du J.O- GlcNAcylation in immunity and inflammation: An intricate system (Review). *Int J Mol Med*. 2019;44(2): 363-74.

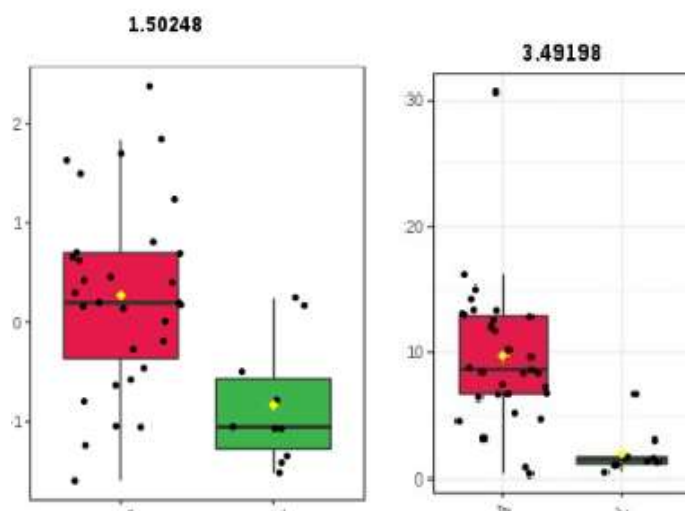
Assessment of Periportal Fibrosis in Schistosomiasis Patients by ^1H NMR-based Metabonomics

Avaliação da fibrose periportal em pacientes com esquistossomose usando Metabonômica baseada em RMN de ^1H

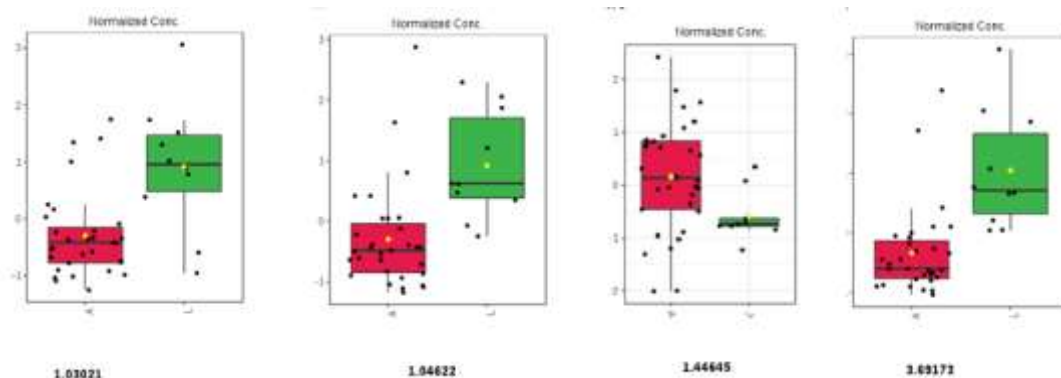
APÊNDICE A. Alguns bins relevantes para a discriminação, segundo os formalismos PLS-DA e OPLS-DA

Foram construídos dois modelos para discriminar as amostras de pacientes com esquistossomose mansônica, em função da gravidade. Nos dados apresentados abaixo, à esquerda e em vermelho, estão as amostras do grupo com FPP significativa; enquanto, à direita e em verde, estão as amostras do grupo com FPP leve.

No modelo usando o formalismo PLS-DA, tem-se os bins em δ 1,502 ppm (escore VIP = 1,98) e δ 3,492 ppm (escore VIP = 1,83), que foram atribuídos à alanina e ao glicolaldeído, respectivamente. Ambos apresentam níveis séricos mais elevados nas amostras do grupo com FPP Significativa.



Boxplot com a distribuição das intensidades observadas para cada amostra, no bin identificado como relevante no modelo PLS-DA. Vermelho, FPP Significativa; verde, FPP Leve.



Boxplot com a distribuição das intensidades observadas para cada amostra, no bin identificado como relevante no modelo OPLS-DA. Vermelho, FPP Significativa; verde, FPP Leve.

No modelo usando o formalismo OPLS-DA, tem-se os bins em δ 1,030 ppm, atribuído à valina; δ 1,046 ppm, não atribuído; δ 1,446 ppm atribuído à alanina; e δ 3,692 ppm, atribuído a carboidratos. Os níveis séricos de valina, carboidratos e do metabólito não identificado estão mais elevados no grupo de FPP Leve. Enquanto o nível sérico de alanina mostrou-se mais elevado no grupo de FPP Significativa.

6 CONCLUSÃO

Os modelos metabonômicos criados neste estudo foram capazes de discriminar, entre os pacientes esquistossomóticos, os que apresentam FPP leve daqueles com FPP significativa, através dos formalismos PLS-DA e OPLS-DA. Os metabólitos do soro permitiram identificar alterações relacionada a função hepática e metabolismo dos aminoácidos. Esses achados estão de acordo com dados de estudos anteriores sobre esquistossomose utilizando a metabonômica pela técnica de RMN, portanto fornecendo evidências de uma resposta metabólica para esse agravo.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, Z. A. Regressão da fibrose hepática. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v 38, n.6, p. 514-520,nov-dez,2005.
- ANDRADE, Z. A. Schistosomiasis and hepatic fibrosis regression. **Acta Tropica**, v. 108, n. 2–3, p. 79–82, 1 nov. 2008.
- ANDRADE, Z. A. Schistosomiasis and liver fibrosis. **Parasite Immunology**, 2009.
- BALOG, C.I.A et al. Metabonomic investigation of human *Schistosoma mansoni* infection. **Molecular Biosystems**.2011.
- BARSOUM, R. S., ESMAT, G., EL-BAZ, T. Human Schistosomiasis: Clinical Perspective: Review. **Journal of Advanced Research**, Cairo, v. 4, n. 5, p. 433–444, Sept. 2013.
- BRANDT, B. Avaliação das citocinas IL-10 e IL-13 como mediadores na progressão da fibrose de Symmers em portadores de esquistossomose mansônica na forma hepatoesplênica. **Rev. Col. Bras. Cir**, v. 37, n. 5, p. 333–337, 2010.
- BARRETO, A. V. M. S. et al. Evaluation of serum levels of IL-9 and IL-17 in human *Schistosoma mansoni* infection and their relationship with periportal fibrosis. **Immunobiology**, v. 221, n. 12, p. 1351–1354, 1 dez. 2016.
- 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**, 2018.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Vigilância da Esquistossomose Mansonii. **Diretrizes Técnicas**, 4^o edição, Brasília-DF, 2014.
- BARRETO, A.V.M.S et al. New index for the diagnosis of liver fibrosis in Schistosomiasis mansoni. **Arquivos de Gastroenterologia**, 2017.
- BERNINI, P. et al. Standard operating procedures for pre-analytical handling of blood and urine for metabolomic studies and biobanks. **Journal of Biomolecular NMR**, v. 49, n. 3–4, p. 231–243, 2011.

CARSON, J. P. et al. Schistosome-Induced Fibrotic Disease: The Role of Hepatic Stellate Cells. **Trends in Parasitology**, v. 34, n. 6, p. 524–540, 1 jun. 2018.

CAVALCANTI, M. G.; DE ARAUJO-NETO, J. M.; PERALTA, J. M. Schistosomiasis: Clinical management of liver disease. **Clinical Liver Disease**, v. 6, n. 3, p. 59–62, 2015.

COLNAGO, L. A.; ALMEIDA, F. C. L.; VALENTE, P. Espectometria de Massas e RMN Multidimensional e Multinuclear: Revolução nos Estudos de Macromoléculas Biológicas. **Atualidades em Química**, v. 16, p. 9–14, 2002.

COURA, J. R et al. Esquistossomose aguda autóctone de foco na cidade do Rio de Janeiro. Estudo de 22 casos. **Revista da Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, n. 6, p. 387-396, 1970.

DA SILVA, F. L. et al. Alterations in the lipid profiles and circulating liver enzymes in individuals infected by *Schistosoma mansoni*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 51, n. 6, p. 795–801, 2018.

DUARTE, I. F.; GIL, A. M. Metabolic signatures of cancer unveiled by NMR spectroscopy of human biofluid. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, v. 62, p. 51–74, 2012.

DOMINGUES, C. Parte V - Diagnóstico 32 -. In: **Diagnóstico por imagem**. 2008. ed. Rio de Janeiro.

DOMINGUES, A. L. C; MEDEIROS, T. B; LOPES, E. P. Ultrasound versus biological markers in the evaluation of periportal fibrosis in human *Schistosoma mansoni*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz (Impresso)**, v. 106, p. 802-807, 2011.

EBRAHIMI, H.; NADERIAN, M.; SOHRABPOUR, A. A. New Concepts on Pathogenesis and Diagnosis of Liver Fibrosis; A Review Article. **Middle East Journal of Digestive Diseases**, v. 8, n. 3, p. 166–178, 2016.

ELBAZ, T.; ESMAT, G. Hepatic and Intestinal Schistosomiasis : Review. **Journal of Advanced Research**, v. 4, n. 5, p. 445–452, 2013.

EL SCHEICH, T. et al. The WHO ultrasonography protocol for assessing hepatic morbidity due to *Schistosoma mansoni*. Acceptance and evolution over 12 years. **Parasitology**

Research, v. 113, n. 11, p. 3915–3925, 2014.

GHINI, V. et al. NMR for sample quality assessment in metabolomics. **New Biotechnology**, v. 52, n. April, p. 25–34, 2019.

GRYSEELS, B. Schistosomiasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 383–397, 2012.

GODOY, M. M. G. et al. Hepatitis C virus infection diagnosis using metabonomics. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 17, n. 12, p. 854–858, 1 dez. 2010.

GOMES, E.C.S, Mesquista, M.C.S, REHN, V.N.C, NASCIMENTO, W.R.C, LOYO, R, BARBOSA, C.S. Transmissão urbana da esquistossomose: novo cenário epidemiológico na Zona da Mata de Pernambuco. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, 2016.

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.

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.

HENRIQUE, B. et al. Incidência de Esquistossomose Mansônica em Pernambuco no Período Compreendido entre 2010 a 2016. **Ciências Biológicas e de Saúde Unit**, v. 3, n. 2, p. 57–66, 2017.

HOTEZ, P. J.; LO, N.C Neglected Tropical Diseases: Public Health Control Programs and Mass Drug Administration. **Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases**, p. 209–213, 2020.

HOTEZ, P. J.; FUJIWARA, R. T. Brazil ' s neglected tropical diseases : an overview and a report card. **Microbes and Infection**, v. 16, n. 8, p. 601–606, 2014.

JACOBSON, B., ANDERSON, W. & ARNOLD, J. Um estudo de ressonância magnética de prótons da hidratação do ácido desoxirribonucleico. **Nature**, v. 173, p.772–773, 1954.

KATZ, N. Acta Tropica The discovery of Schistosomiasis mansoni in Brazil. v. 108, p. 69–71, 2008.

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

KOKOVA, D.; MAYBORODA, O. A. Twenty Years on: Metabolomics in Helminth Research. **Trends in Parasitology**, v. 35, n. 4, p. 282–288, abr. 2019.

KÖPKE-AGUIAR, L. . et al. Serum hyaluronic acid as a comprehensive marker to assess severity of liver disease in schistosomiasis. **Acta Tropica**, v. 84, n. 2, p. 117–126, nov. 2002.

KOSTIDIS, S. et al. ¹H-NMR analysis of feces: new possibilities in the helminthes infections research. **BMC Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 275, 17 dez. 2017.

KUMAR, R. et al. The Causal Role of IL-4 and IL-13 in Schistosoma mansoni Pulmonary Hypertension. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 192, p. 998–1008, 2015.

LEITE, L. A. C. et al. Hemostatic Dysfunction Is Increased in Patients with Hepatosplenic Schistosomiasis Mansoni and Advanced Periportal Fibrosis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 7, 2013.

LENZ, E. M.; WILSON, I. D. Analytical strategies in metabonomics. **Journal of Proteome Research**, v. 6, n. 2, p. 443–458, 2007.

LI, J. V et al. Chemometric analysis of biofluids from mice experimentally infected with Schistosoma mansoni. **Parasites & Vectors**, v. 4, n. 1, p. 179, 19 set. 2011.

MAIA, M.D et al. Avaliação da esplenomegalia na forma hepatoesplênica da esquistossomose mansoni. **Acta Trop**, 2007.

MEDEIROS, T. B. et al. Correlation between platelet count and both liver fibrosis and spleen diameter in patients with Schistosomiasis mansoni. **Arq Gastroenterol**, v. 5, n. 1, p. 34–38, 2014.

Niamey Working Group 2000. Ultrasound in schistosomiasis: a practical guide to the standardized use of ultrasonography for the assessment of schistosomiasis- related morbidity. Geneva: **World Health Organization**. Geneva, Switzerland.

NICHOLSON, J. K ; LINDON, J. C. System Biology: Metabolomics. **The FEBS journal**, v. 274, n. 5, p. 1140–51, 2007.

NELWAN, M. L. Schistosomiasis: Life Cycle, Diagnosis, and Control. **Current Therapeutic Research - Clinical and Experimental**, v. 91, n. 24, p. 5–9, 2019.

Organização Mundial da Saúde (OMS). Esquistossomose, 2011. Disponível em: <http://www.who.int/tdr/diseases-topics/schistosomiasis/en/>. Acesso em outubro de 2018.

PATERNOSTRO, R.; REIBERGER, T.; BUCSICS, T. Elastography-based screening for esophageal varices in patients with advanced chronic liver disease. **World journal of gastroenterology**, v. 25, n. 3, p. 308–329, 21 jan. 2019.

PEDRINI, M. et al. SC. Advances and challenges in development of precision psychiatry through clinical metabolomics on mood and psychotic disorders. **Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry**, p. 1–39, 2019.

RICARD-BLUM, S. et al. Relationships between several markers of extracellular matrix turnover and ultrasonography in human Schistosomiasis mansoni. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 60, n. 4, p. 658–663, abr. 1999.

RICHTER, J. et al. Report of the Second Satellite Symposium on Ultrasound in Schistosomiasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 96, n. May, p. 151–156, 2001.

SACKETT, D. L. Evidence base of clinical diagnosis: The architecture of diagnostic research. **BMJ**, v. 324, n. 7337, p. 602–606, 2002.

SANTOS, G. T. et al. Reprodutibilidade da classificação ultra-sonográfica de Niamey na avaliação da fibrose periportal na esquistossomose mansônica. **Radiologia Brasileira**, v. 40, n. 6, p. 377–381, 2007.

SANTOS, I. B. Vida e Obra de Pirajá da Silva. **Ministério da Saúde**. ed. Brasília/DF:2008.

SANTOS, J.C., et al. Liver ultrasound elastography for the evaluation of periportal fibrosis in schistosomiasis mansoni: A cross-sectional study. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 11, p. e0006868, 16 nov. 2018.

SILVA, C.C, Domingues, A.L, Lopes, E.P, Moraes, C.N, Santos, R.B. Schistosomiasis mansoni: ultrasound- evaluated hepatic fibrosis and serum concentrations of hyaluronic acid. **Annls of Tropical Medicine & Parasitology**, 2011.

SILVA-MORAES, V. et al. Diagnosis of schistosoma mansoni infections: What are the choices in brazilian low-endemic areas? **Memorias do Instituto Oswaldo CruzFundacao Oswaldo Cruz**, , 1 fev. 2019.

SILVERSTEIN, Robert et al. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos. 7 ed. **LTC**, 2005.

SCOTT, R.; GUHA, I. N. Non-invasive monitoring of liver fibrosis. **British Medical Bulletin**, v. 112, n. 1, p. 97–106, 1 dez. 2014.

SCHWARTZ, C. et al. T Cell – Derived IL-4/IL-13 Protects Mice against Fatal Schistosoma mansoni Infection Independently of Basophils. **The Journal of Immunology**, 2019.

SONG, Z. et al. Application of NMR metabolomics to search for human disease biomarkers in blood. **Clin Chem Lab Med**, 2018.

SOUZA,F.P.C.S et al. Esquistossomose mansônica: aspectos gerais , imunologia,patogênese e história natural. **Revista Brasileira de Clínica Médica**, v. 9, n. 4, p. 0–7, 2011.

PEARCE, E.J, Macdonald, A. S. A imunologia da esquistossomose. **Nature Reviews Immunology**, 2002.

PERNAMBUCO. Boletim Esquistossomose. **Secretária Executiva de Vigilância em Saúde-SEVS**. Março.2018.

PONTES, T. A. et al. Osteopenia-osteoporosis discrimination in postmenopausal women by ¹H NMR-based metabonomics. **PLOS ONE**, v. 14, n. 5, p. e0217348, 29 maio 2019.

VASCONCELLOS, L. DE S. et al. Correlation between the values of circulating blood elements with the size of spleen in the presence of schistosomal splenomegaly. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 33, n. 12, p. 1103–1109, dez. 2018.

VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado de infectologia**. 5ª Ed. São Paulo Atheneu, 2015.

VITORINO, R. R.; GOMES, A. Esquistossomose mansônica: aspectos gerais , imunologia , patogênese e história natural. **Revista Brasileira de Clínica Médica**, v. 9, n. 4, p. 0–7, 2011.

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

Way C.T et al. Um índice não invasivo simples pode prever fibrose e cirrose significativas em pacientes com hepatite C. crônica. **Hepatologia**. 2003; 38: 518-26.

WORLEY, B.; POWERS, R. Multivariate Analysis in Metabolomics. **Current Metabolomics**, v. 1, n. 1, p. 92–107, 1 nov. 2012.

WU, J. et al. Metabolic changes reveal the development of schistosomiasis in mice. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 8, 2010.

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

APÊNDICE A- ARTICLE SEND FOR TROPICAL MEDICINE & HYGIENE

TRSTMH

Assessment of Periportal Fibrosis in Schistosomiasis mansoni Patients by 1H NMR-based Metabonomics --Manuscript Draft--

Article Type:	Full Length Article
Full Title:	Assessment of Periportal Fibrosis in Schistosomiasis mansoni Patients by 1H NMR-based Metabonomics
Abstract:	<p>The evaluation of Periportal fibrosis (PPF) is essential for a prognostic assessment of patients with schistosomiasis mansoni. WHO Protocol Niamey defines patterns of fibrosis from abdominal ultrasonography, but it is operator-dependent. 1 H NMR-based Metabonomics has been employed to assess liver fibrosis in some diseases. Herein, we built 1 H NMR-based metabonomics models (MM) to discriminate mild from significant PPF and identify differences in endogenous metabolites profile. We used 41 spectra of serum samples from 10 patients with mild PPF (C Niamey pattern) and 31 patients with significant PPF (D/E/F Niamey patterns). MM were built using Partial Least Squares-Discriminant Analysis (PLS-DA) and Orthogonal Projections to Latent Structures Discriminant Analysis (OPLS-DA) formalisms. PLS-DA and OPLS-DA resulted in discrimination between mild and significant PPF groups with R² e Q² values, equal to 0.80 and 0.38, and 0.72 and 0.42 for each model, respectively. The OPLS-DA model presented accuracy, sensitivity and specificity</p>

	<p>values equal to 92.7%, 90.3% and 100%, respectively. The metabolites identified as responsible by discriminations were: Nacetylglucosamines, alanine, glycolaldehyde, carbohydrates and valine. These MMs were able to discriminate mild from significant PPF patterns in patients with schistosomiasis mansoni and identified differences in serum metabolites profile in each of the two patterns.</p>
Manuscript Number:	
Order of Authors:	Milena Lima Rodrigues, MSc
	Tatiane Priscila Santos Rodrigues-Luz, MSc
	Caroline Louise Diniz Pereira, MSc
	Andrea Doria Batista, PhD
	Ana Lucia Coutinho Domingues, PhD
	Edmundo Pessoa Lopes, PhD
	Ricardo Oliveira Silva, PhD
Suggested Reviewers:	<p>Ana Gil, PhD Professor, Universidade de Aveiro CICECO agil@ua.pt She develops metabonomics and metabolomics models and has various papers in this field.</p>
	<p>Maria Lucia Ferraz, PhD Universidade Federal de Sao Paulo Escola Paulista de Medicina marialucia.ferraz@uol.com.br She study liver diseases and can to assess this paper.</p>

Edna Strauss, PhD

Universidade de Sao Paulo Hospital das Clinicas

ednastrauss@gmail.com

She studies liver diseases and schistosomiasis, specifically.

Opposed Reviewers:

Powered by Editorial Manager® and ProduXion Manager® from Aries Systems Corporation

Cover letter



Recife, April 8th, 2020

Sir Editor-in-Chief

We are sending the paper titled “**Assessment of Periportal Fibrosis in Schistosomiasis Patients by ¹H NMR-based Metabonomics**” which aimed to develop metabonomics models to classify periportal fibrosis (PPF) pattern in patients with schistosomiasis mansoni and identify differences in metabolites profile.

Herein, we used ¹H NMR-based metabonomics from the serum of patients with schistosomiasis mansoni to discriminate among cases of more or less intensity according to the pattern of periportal fibrosis. We used the Niamey Protocol to classify the patients into mild PPF and significant PPF groups with 10 and 31 patients, respectively. PLS-DA and OPLS-DA formalisms were used to build the metabonomics models. The best result was achieved using OPLS-DA which presented R²_Y and Q² values equal to 0.717 ($p = 0.001$) and 0.417 ($p <$

0.001), respectively, while accuracy, sensitivity and specificity values were equal to 92.7%, 90.3%, 100%, respectively. Moreover, the metabonomics formalisms used enabled identification of some metabolites associated with the discrimination, such as: alanine, glycolaldehyde and N-acetylglucosamines which had higher serum levels in the significant PPF group; while valine and carbohydrates presented lower serum levels in the most severe cases. The developed method can be a minimally invasive alternative for assessment of patients with schistosomiasis without requiring the present of experienced examiner or patient visit to a hospital for do image exams. This represents an

important change in the clinical practice. We believe that these findings are relevant to the scope of your journal and will be of interest to its readership.

This manuscript has not been published elsewhere and is not under consideration by another journal. There are no conflicts of interest to declare. The manuscript has been carefully reviewed by an experienced editor whose first language is English and who specializes in editing papers written by scientists whose native language is not English.

We look forward to hearing from you at your earliest convenience.

With Best Regards

Professor Ricardo
Oliveira Silva
Author correspondent

Abstract

Assessment of Periportal Fibrosis in Schistosomiasis mansoni Patients by ¹H NMRbased Metabonomics

Milena Lima Rodrigues¹, Tatiane Priscila Santos Rodrigues Luz², Caroline Louise Diniz Pereira¹, Andrea Doria Batista¹, Ana Lucia Coutinho Domingues¹, Edmundo Pessoa Lopes¹, Ricardo Oliveira Silva^{2*}

1. Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Centro de Ciências Médicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, 50670-901 - Brasil.
2. Programa de Pós-Graduação em Química, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, 50670-740 - Brasil.

* Corresponding author: phone number +55 81 2126.7465 email ros@ufpe.br

Abstract

The evaluation of Periportal fibrosis (PPF) is essential for a prognostic assessment of patients with schistosomiasis mansoni. WHO Protocol Niamey defines patterns of fibrosis from abdominal ultrasonography, but it is operator-dependent. ¹H NMR-based Metabonomics has been employed to assess liver fibrosis in some diseases. Herein, we built ¹H NMR-based metabonomics models (MM) to discriminate mild from significant PPF and identify differences in endogenous metabolites profile. We

used 41 spectra of serum samples from 10 patients with mild PPF (C Niamey pattern) and 31 patients with significant PPF (D/E/F Niamey patterns). MM were built using Partial Least Squares-Discriminant

Analysis (PLS-DA) and Orthogonal Projections to Latent Structures Discriminant Analysis (OPLS-DA) formalisms. PLS-DA and OPLS-DA resulted in discrimination between mild and significant PPF groups with R^2 e Q^2 values, equal to 0.80 and 0.38, and 0.72 and 0.42 for each model, respectively. The OPLS-DA model presented accuracy, sensitivity and specificity values equal to 92.7%, 90.3% and 100%, respectively. The metabolites identified as responsible by discriminations were: N-acetylglucosamines, alanine, glycolaldehyde, carbohydrates and valine. These MMs were able to discriminate mild from significant PPF patterns in patients with schistosomiasis mansoni and identified differences in serum metabolites profile in each of the two patterns.

Keywords: METABOLOMICS, *SCHISTOSOMA MANSONI*, BIOMARKERS, NEGLECTED

ORIGINAL ARTICLE

Assessment of Periportal Fibrosis in Schistosomiasis mansoni Patients by ^1H NMRbased Metabonomics

Milena Lima Rodrigues¹, Tatiane Priscila Santos Rodrigues Luz², Caroline Louise Diniz Pereira¹, Andrea Doria Batista¹, Ana Lucia Coutinho Domingues¹, Edmundo Pessoa Lopes¹, Ricardo Oliveira Silva^{2*}

1. Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Centro de Ciências Médicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, 50670-901 - Brasil.

2. Programa de Pós-Graduação em Química, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, 50670-740 - Brasil.

* Corresponding author: phone number +55 81 2126.7465 email ros@ufpe.br

Introduction

Schistosomiasis is a tropical disease caused by a parasite worm that exists in many countries around the world and has afflicted about 240 million people in 78 countries. In the American continent, the countries with the highest case reports are in the Caribbean, Venezuela and Brazil¹. In Brazil, schistosomiasis is caused by *Schistosoma mansoni*. In the state of Pernambuco, it is considered an endemic disease, since that has been recorded in 102 of 186 cities ^{2,3}.

Periportal fibrosis (PPF) is induced by helminth eggs in the portal vein and its branches, being able to extend to the peripheral intrahepatic branches without promoting hepatocyte death ⁴. Ultrasonography (US) scan is used for diagnosis and assessment of PPF by Niamey-Belo Horizonte Protocol, the WHO Standard Protocol. This protocol classifies 6 patterns of PPF intensity: from A (no-fibrosis) up F (advanced fibrosis), plus mixed patterns, such as the D/C or E/C patterns^{4,5,6}.

Although US exam enables PPF diagnosis and evaluation, there are limitations for its use, such as unavailability of the device in some places, its low sensitivity for the initial forms of the disease, in addition to inter-observer variation and the need of for an experienced examiner. Due to these difficulties, alternative strategies are being studied. Some serum biomarkers, alone or in association (indexes scores), have been used for this purpose. Some authors reported an inversely proportional relationship among platelet count and PPF pattern, as well as a directly proportional relationship among liver enzymes serum levels and PPF pattern^{6,7}.

Metabonomics is an area of knowledge that uses multivariate statistical formalisms applied to spectra data of biofluids to obtain a multiparametric response to external stimuli, such as pathogens⁸. Recently, Gouveia et al. (2017) investigated patients infected by *Schistosoma* with and without viral hepatitis coinfection, using ¹H NMR-based Metabonomics, and discriminated the two groups ⁹. In addition, Batista et al. (2018) used ¹H NMR-based Metabonomics for liver fibrosis assessment in patients with chronic hepatitis C ¹⁰. The multivariate statistical formalisms most commonly used in metabonomics are Principal Components Analyses (PCA) for exploratory analyses, since it does not depend on class information and investigates if there are outlier samples;

Partial Least Square-Discriminant Analyses (PLS-DA) and Orthogonal Projection to Latent Structures-Discriminant Analyses (OPLS-DA) which use the class information to build

metabonomics models that discriminate among samples from different groups¹¹. In the present study, ¹H NMR-based Metabonomics was used as alternative method to assess the pattern of PPF in patients with schistosomiasis mansoni and identify differences in serum metabolites profile.

Experimental

This is a transversal and prospective study performed with adult patients that have been diagnosed with schistosomiasis mansoni, aiming to assess periportal fibrosis patterns by ¹H NMR-based metabonomics.

Patients selection and Ethical Approval

Patients were selected from the Schistosomiasis Clinic of the Gastroenterology Service of the Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), between March and December 2019.

Inclusion criteria were: patients diagnosed with schistosomiasis mansoni, aged 18 years or over. Schistosomiasis diagnosis was based on the clinical history of contact with water sources in endemic areas, reports of previous treatment with praziquantel, together with the findings in the PPF by ultrasonography scan. Exclusion criteria were: patients with fatty liver disease, cirrhosis or hepatocellular carcinoma diagnosis, presence of portal vein thrombosis, HIV, hepatitis B or C virus coinfection, or history of drug-induced liver injury or alcohol abuse.

According to the Helsinki Declaration, the study was explained to patients and they were included only after signing an informed consent form. This study was approved by the

UFPE Research Ethical Committee involving human subjects, Protocol Number 3.222.710.

Method

Abdominal ultrasonography scan

All patients were submitted to US scan after overnight fasting of about 8 hours, all by the same examiner (Domingues, ALC). According to the Niamey Protocol, PPF pattern was defined from location in the liver parenchyma, as follows: C (peripheral fibrosis), D (central fibrosis), E (advanced fibrosis) and F (very advanced fibrosis) patterns. Patients

without or with a doubtful PPF (A and B pattern) were not selected for the study. All US exams were performed using a US Siemens Acuson S2000 instrument equipped with a 6C1 Ultrasound probe (Siemens Medical Solutions, Mountain View, CA, USA).

Liver function tests

Blood samples were collected from each patient's peripheral vein, after US scan. Serum were obtained after centrifugation (3500 rpm) using Centurion-Laborline equipment. Liver function tests including alanine and aspartate aminotransferase (ALT and AST), gammaglutamyl transferase (GGT), alkaline phosphatase (ALP), lipid profile (total cholesterol,

HDL cholesterol, LDL cholesterol and triglycerides) and glycemia were carried out using Wiener Lab[®] kits in a Wiener Lab[®] autoanalyzer (Wiener Lab Group, Argentina). Part of the samples was stored at minus 40°C until the NMR analysis.

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

¹H NMR spectra and Metabonomics modelling

All ¹H NMR spectra were recorded in a VNMRSYS400 spectrometer operating at 400 MHz, using NMR tubes of 5 mm. After thawing, serum samples were prepared by mixing 400 µl of serum and 200 µl of D₂O. ¹H NMR spectra were performed using a sequence of radiofrequency pulses with presaturation (PRESAT) of the water signal hyphenated to the Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) pulse sequence, which was employed as a T2 filter. The following parameters were used: spectral window of 6.4 kHz, saturation delay of 2.0 s, acquisition time of 1.704 s, 90° RF pulse, temperature of 27°C, 88 cycles, tau equal to 0.0004 s, bigtau equal to 0.07 s and 128 scans. The line broadening used was 0.3 Hz. Baseline and phase distortions were corrected manually. The signal attribute to the methyl group of lactate (δ 1.33 ppm) was used as a chemical shift reference. Using the

MestreNova 9.0 software, the region between δ 4.004 and 0.772 ppm was binned into 808 bins, each 0.004 ppm-wide. The matrix was built with 41 rows (cases) and 809 variables

(bins of ^1H NMR spectra plus class variable), and then was submitted to multivariate analysis.

The models based on PCA, PLS-DA and OPLS-DA were constructed using MetaboAnalyst 4.0, a web-based platform for metabonomics studies.^{12,13} In the preprocessing step, each sample was normalized by sum (cumulative intensity of the spectrum). This was performed to compare the spectral data, avoiding problems with sample dilutions, for example¹⁴. In addition, data were pre-processed using autoscaling. The validation of the PLS-DA and OPLS-DA models was based on two methods: (i) the leave-one-out cross-validation method (LOOCV), where the optimal number of latent variables for the PLS-DA model was determined, thus providing the basis for the computation of the predictive ability (Q^2), determination coefficient (R^2), and the classification accuracy of the model; and (ii) the permutation test, which made 2000 permutations of the class label to verify the accuracy of metabonomics models.

PLS-DA and OPLS-DA models provided a quantitative measure of the discriminating power of each spectral bin. Variable importance in the projection (VIP) score was used. VIP is a weighted sum of squares of the PLS loadings. These weights are based on the amount of explained variance of the dependent variable in each PLS dimension. A VIP score cut-off equal to 1 was used. Discriminatory signals were attributed to metabolites using HMDB platform and also based on the literature^{15,16,17,18}. Accuracy, sensitivity and specificity values were obtained from a confusion matrix that was constructed considering classification of OPLS-DA model.

Results

Forty-four patients were selected, but 3 were excluded because their samples proved to be outliers. Thus, 41 patients were included in the study, being 10 patients with C PPF pattern; 1 patient with D PPF pattern; 17 patients with E PPF pattern; 2 patients with F PPF pattern; and 11 patients with D/C PPF pattern, according to the Niamey Protocol. These patients were divided into two group: mild PPF (C PPF pattern) and significant PPF (D/C/E/F PPF pattern)¹⁹. Table 1 shows clinical and demographic data of the population.

INSERT TABLE 1

Figure 1 shows a ^1H NMR spectrum of serum obtained in the study with assigned peaks. Exploratory analyses, by Principal Component Analyses (PCA), failed to indicate separation between the groups (data not shown). Thus, metabonomics models were developed using supervised methods: PLS-DA and OPLS-DA formalisms. Figure 2 shows (A) score plot and (B) performance of metabonomics model constructed using PLS-DA formalism. Regarding accuracy, the best performance was achieved when four latent variables were used, resulting in accuracy, with R^2 and Q^2 values equal to 0.85, 0.80 and 0.38, respectively.

INSERT FIGURES 1 and 2

Figure 3 shows (A) VIP (Variables Importance for Projection) score plot and (B) permutation test from PLS-DA model which presented p -value equal to 0.0245 after 2000 classes permutations. The spectral region high enough to indicate discrimination is between δ 1.975 and δ 2.011 ppm. This region is attributed to methyl group of N-acetylglucosamines.

INSERT FIGURE 3

According to the Figure 3A, serum level of N-acetylglucosamines is higher in Significant PPF group than in Mild PPF group. In addition to this region, three more discriminatory bins can be observed – δ 3.544; 3.692; and 3.808 ppm, which were assigned to carbohydrates. According to the VIP score plot, the serum level of these carbohydrates is higher in the Mild PPF group. The VIP score full table presents other discriminatory bins, such as δ 1.502 ppm (VIP score = 1.98) and δ 3.492 ppm (VIP score = 1.83), which were assigned to alanine and glycolaldehyde. Both had higher serum levels in samples from Significant PPF group.

Figure 4 shows (A) score plot and (B) results of permutation test of metabonomics models using OPLS-DA formalism.

INSERT FIGURE 4

The OPLS-DA metabonomics model presented R²_Y and Q² values equal to 0.717 and 0.417, respectively, while the p-values from permutation test were less than 0.01. We identified four discriminatory bins, as follow: δ 1.030 ppm, assigned to valine; δ 1.046 ppm (not assigned); δ 1.446 ppm attributed to alanine; and δ 3.692 ppm assigned to carbohydrates. The serum levels observed for valine, carbohydrates and for the metabolite not identified (signal at δ 1.046 ppm) were higher in the Mild PPF group, while the alanine serum level was higher in the Significant PPF group. Table 2 presents a summary of metabolites that discriminated the Mild PPF samples from the Significant PPF samples, as well as the metabonomics formalism employed, the chemical shift (δ) of each metabolite and the group in which these metabolites had higher serum level.

INSERT TABLE 2

Table 3 shows confusion matrix obtained from the OPLS-DA metabonomics model. Accuracy, sensitivity, specificity, positive predictive and negative predictive values equal to 92.7%, 90.3%, 100%, 100% and 76.9%, respectively.

INSERT TABLE 3

Discussion

PPF is a mark of schistosomiasis mansoni disease that is crucial to determine morbidity and prognostic of the illness, requiring continuous assessment. Tools, such as US scan and elastography or serum biomarkers, have generally been used up to now for the PPF assessment in schistosomiasis patients^{2,20}. Among serum biomarkers for PPF assessment in schistosomiasis patients, liver enzymes, and platelet count alone or combined with ALP, as in Coutinho-index, have been given importance in the literature^{2,6,7}. In agreement with these authors, laboratory data found in this study indicate a higher serum level of liver enzymes, GGT in particular, and lower platelet count in patients with significant PPF. Köpke-Aguiar et al.²¹ also reported higher serum levels of GGT in more severe cases. Medeiros et al.²² and Lambertucci²³ also reported lower platelets count in the most severe cases of disease, as well as increased spleen size in schistosomiasis mansoni patients.

Significant PPF in the schistosomiasis patients is observed due the both by increase in number of eggs obstruction into intrahepatic portal veins and tissues (by repeated infections) and by the exacerbated host's immune response ²⁴. The presence of adult worms in mesenteric and portal vessels, as well as the presence of their eggs, promotes immunological stimulation and induces primary splenomegaly, by reticuloendothelial system hyperplasia, which leads to thrombocytopenia, by hypersplenism^{19,22}. Splenomegaly also causes blood hyperflow in the splenic vein, which contributes to presinusoidal portal hypertension²⁵. In addition, the changes in liver hemodynamics, triggered by portal hyperflow, promote increase of GGT serum level, as observed in our study²⁶. Usually, metabonomics studies started with exploratory analyses by PCA (data no shown). This initial analysis failed to discriminate between the groups. Discriminant Analyses formalisms were employed, resulting in efficient separation between mild PPF and significant PPF groups.

Serum levels of valine (δ 1.030 ppm) and alanine (δ 1.446 and 1.502 ppm) observed in the spectral data suggest that the changes in portal vein flow could trigger disorders of aminoacid metabolism in hepatocytes, as reported by Li et al. ²⁷. Changes in amino acid serum levels were important for discrimination in both the PLS-DA and OPLS-DA metabonomics models. These findings are in agreement with studies that correlate changes in serum levels of these amino acids in response to liver fibrogenesis caused by schistosomiasis in mice^{15,28}. Balog et al. ²⁹ also reported an association between valine and alanine serum levels with the disease, as well as a relationship with the disease progression.

An increase in the serum level of N-acetylglucosamines were observed for significant PPF group, while the carbohydrate serum level was higher in the mild PPF group. Glucosamines are product of glucose metabolism, which is able to avoid (or to suppress) the production of metalloproteinases. Therefore, higher N-acetylglucosamines serum level in significant PPF group would be associated with an inefficient fibrosis mechanism and reduced the ability of hepatocytes to repair the tissue and to preserve the structure of liver. These findings are important for monitoring and assessment of patients in endemic regions, where it is possible to collect blood samples and take them to a laboratory. This would dispense the need to take patients to a hospital unit or use of sophisticated devices *in loco*. ¹H NMR-based metabonomics produced a "metabolic fingerprint", delivering

systemic information about patients and identifying those with the more severe forms of schistosomiasis.

In clinical practice, the monitoring of patients with schistosomiasis mansoni is done by US scan and elastography. In both cases, it is necessary to transfer patients to hospital unit or to bring sophisticated instruments to the field. In addition, the presence of an experienced examiner is necessary, since the US scan is operator-dependent. In the present study, we used ^1H NMR-based metabonomics from the serum of patients with schistosomiasis mansoni to discriminate among cases of more or less intensity according to the pattern of PPF. Patients were divided into mild PPF and significant PPF groups with 10 and 31 patients, respectively. PLS-DA and OPLS-DA formalisms were used to build the metabonomics models. The best result was achieved using OPLS-DA which presented R^2_Y and Q^2 values equal to 0.717 ($p = 0.001$) and 0.417 ($p < 0.001$), respectively, with high accuracy. Moreover, the metabonomics formalisms used enabled identification of some metabolites associated with the discrimination, such as: alanine, glycolaldehyde and N-acetylglucosamines which had higher serum levels in the significant PPF group; while valine and carbohydrates presented lower serum levels in the most severe cases. The developed method can be a minimally invasive alternative for assessment of patients with schistosomiasis without requiring the present of experienced examiner or patient visit to a hospital for do image exams.

Conclusion

These metabonomics models were able to discriminate mild from significant PPF patterns in patients with schistosomiasis and identify differences in serum metabolites profile in each of the two patterns.

Acknowledgments

The authors thank Analytical Central Laboratory of the Universidade Federal de Pernambuco for the ^1H NMR spectra and to the Hospital das Clinicas of the Universidade Federal de Pernambuco where patients were selected. They also thank to Brazilian funding agencies – CNPq by support to Milena Lima Rodrigues and Tatiane Priscila

Santos Rodrigues Luz; and FACEPE - Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco for research support (APQ-0765-1.06/14). The English text of this paper has been revised by Sidney Pratt, Canadian, MAT (The Johns Hopkins University), RSAdip - TESL (Cambridge University).

Declaration of interest

The authors declare that no competing interests exist. In addition, the funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

References

1. Silva-Moraes V, Shollenberger LM, Siqueira LMV, Castro-Borges W, Harn DA, Queiroz E Grenfell RF, Rabello ALT, Coelho PMZ. Diagnosis of schistosoma mansoni infections: What are the choices in brazilian low-endemic areas? *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2019;114(2).
2. Domingues ALC, Medeiros TB de, Lopes EPA. Ultrasound versus biological markers in the evaluation of periportal fibrosis in human *Schistosoma mansoni*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011;106(7):802-7.
3. Oliveira WJ, Magalhães FC, Elias AMS, Castro VN, Favero V, Lindholz CG et al. Evaluation of diagnostic methods for the detection of intestinal schistosomiasis in endemic areas with low parasite loads: Saline gradient, Helmintex, Kato-Katz and rapid urine test. van Lieshout L, ed. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018;12(2):e0006232.
4. Domingues C. Parte V - Diagnóstico 32 -. In: *Diagnóstico Por Imagem*. 2008th ed. Rio de Janeiro; 2008.
5. Richter J, Lúcia A, Domingues C, Barata CH, Prata AR, Lambertucci JR. Report of the Second Satellite Symposium on Ultrasound in Schistosomiasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2001;96(May):151-6.
6. Barreto AVMS, Alecrim VM, Medeiros TB, Domingues ALC, Lopes EPA, Martins JRM, Nader HB, Diniz GTN, Montenegro SML, Morais CNL. New index for the diagnosis of liver fibrosis in *Schistosomiasis mansoni*. 2017;(1):51-6.
7. Leite AC, Domingues ALC, Lopes EPA, et al. Relationship between splenomegaly and hematologic findings in patients with hepatoesplenic schistosomiasis.

8. Nicholson JK, Lindon JC. System Biology: Metabolomics. *FEBS J.* 2007;274(5):1140-51.
9. Gouveia LR, Santos JC, Silva RD, Batista AD, Domingues ALC, Lopes EP de A, Silva RO. Diagnosis of coinfection by schistosomiasis and viral hepatitis B or C using ¹H NMR-based metabolomics. *PLoS One.* 2017;12(8):e0182196.
10. Batista AD, Barros CJP, Costa TBBC, de Godoy MMG, Silva RD, Santos JC, Lira MM, Jucá NT, Lopes EPA, Silva RO. Proton nuclear magnetic resonance-based metabolomic models for non-invasive diagnosis of liver fibrosis in chronic hepatitis C: Optimizing the classification of intermediate fibrosis. *World J Hepatol.* 2018.
11. Worley B, Powers R. Multivariate Analysis in Metabolomics. *Curr Metabolomics.* 2012;1(1):92-107.
12. Xia J, Sinelnikov I V., Han B, Wishart DS. MetaboAnalyst 3.0-making metabolomics more meaningful. *Nucleic Acids Res.* 2015;43.
13. Chong J, Wishart DS, Xia J. Using MetaboAnalyst 4.0 for Comprehensive and Integrative Metabolomics Data Analysis. *Curr Protoc Bioinforma.* 2019;68(1):1128.
14. Sumner LW, Samuel T, Noble R, Gmbh SD, Barrett D, Beale MH, Hardy N. Proposed minimum reporting standards for chemical analysis Chemical Analysis Working Group (CAWG) Metabolomics Standards Initiative (MSI). *Metabolomics.* 2007;3(3):211-21.
15. Wang Y, Holmes E, Nicholson JK, Cloarec O, Chollet J, Tanner M, Singer BH, Utzinger J. Metabonomic investigations in mice infected with *Schistosoma mansoni*: An approach for biomarker identification. *Proc Natl Acad Sci.* 2004;101(34):12676-681.
16. Wishart DS. Computational strategies for metabolite identification in metabolomics. *Bioanalysis.* 2009;1(9):1579-96.
17. Li J V, Saric J, Wang Y, Keiser J, Utzinger J, Holmes E. Chemometric analysis of biofluids from mice experimentally infected with *Schistosoma mansoni*. *Parasit Vectors.* 2011;4(1):179.
18. Pontes TA, Barbosa AD, Silva RD, Melo-Junior MR, Silva RO. Osteopenia/osteoporosis discrimination in postmenopausal women by ¹H NMR-based metabolomics. Monleon D, ed. *PLoS One.* 2019;14(5):e0217348.
19. Carvalho SJ, Batista AD, Mola CMV, Souza LR, Romão SJV. Liver ultrasound elastography for the evaluation of periportal fibrosis in schistosomiasis mansoni: A cross-sectional study. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018;12(11):e0006868.

20. Strimbu K, Tavel JA. What are Biomarkers? *NIH Public Access*. 2010;5(6):463-66.
21. Köpke-Aguiar L., Martins JR., Passerotti C., Toledo C., Nader H., Borges DR. Serum hyaluronic acid as a comprehensive marker to assess severity of liver disease in schistosomiasis. *Acta Trop*. 2002;84(2):117-26.
22. Medeiros TB, Domingues ALC, Luna CF, Lopes EPA. Correlation between platelet count and both liver fibrosis and spleen diameter in patients with Schistosomiasis mansoni. *Arq Gastroenterol*. 2014;5(1):34-8.
23. Lambertucci JR, Lambertucci JR. Revisiting the concept of hepatosplenic schistosomiasis and its challenges using traditional and new tools. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2014;47(2):130-36.
24. Barbosa VS, E Guimarães RJ de PS, Loyo RM, Barbosa CS. Modelling of the distribution of Biomphalaria glabrata and Biomphalaria straminea in the metropolitan region of Recife, Pernambuco, Brazil. *Geospat Health*. 2016;11(3):490.
25. Coutinho, A. Hemodynamic studies of portal hypertension in schistosomiasis. *Am. J. Med*. 1968;44, 547–56.
26. Alves A, Fontes DA, De Melo VA, Machado MCC, Cruz JF, Santos EAS. Hipertensão portal esquistossomótica: Influência do fluxo sanguíneo portal nos níveis séricos das enzimas hepáticas. *Arq Gastroenterol*. 2003;40(4):203-08.
27. Li Y, Xie M, Men L, Du J. O-GlcNAcylation in immunity and inflammation: An intricate system (Review). *Int J Mol Med*. 2019;44(2):363-74.
28. Wu J, Xu W, Ming Z, Dong H, Tang H, Wang Y. Metabolic changes reveal the development of schistosomiasis in mice. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(8).
29. Balog CIA, Meissner A, Göraler S, Bladergroen MR, Vennervald BJ, Mayboroda OA, Deelder AM. Metabonomic investigation of human Schistosoma mansoni infection. *Mol Biosyst*. 2011;7(5):1473.

Table 1. Clinical and demographic characteristic of 41 patients with schistosomiasis mansoni, Pernambuco, Brazil, 2020.

Characteristic	Total	Mild PPF		Significant PPF <i>p</i> -value
		(C pattern)	(D/E/F pattern)	
n	41	10	31	
Age (years)*	57 (18-80)	48.1 (18–75)	57.2 (25-80)	0.0865 ^a
Sex Male (n, %) Female (n, %)	17 (41%) 24 (59%)	5 (40%) 5 (50%)	12 (39%) 19 (61%)	0.4820 ^b
AST (U/L)	29.0 ± 2.6	24.3 ± 1.9	30.0 ± 2.9	0.3328 ^c
ALT (U/L)	29.0 ± 2.2	26.2 ± 4.5	30.0 ± 3.2	0.4584 ^c
ALP (U/L)	262 ± 33	329 ± 113	238 ± 22	0.6379 ^c
GGT (/LSN)	62 ± 12	35 ± 16	71.2 ± 14.0	0.0013^c
Platelets count (/mm ³)	131 ± 12	218 ± 15	102 ± 11	0.0001^c
Total Cholesterol (mg/dL)	169.0 ± 4.6	174.0 ± 7.2	167.8 ± 5.6	0.4626 ^c
HDL (mg/dL)	45.7 ± 2.0	49 ± 5.7	44.6 ± 2.0	0.4863 ^c
LDL (mg/dL)	105.0 ± 3.8	108 ± 4.7	104 ± 4.8	0.3760 ^c
Glucose (mg/dL)	<u>93.6 ± 5.2</u>	<u>97 ± 14</u>	<u>92 ± 5.1</u>	<u>0.9451^c</u>

Data presented as Mean values ± standard deviation. ^aUnpaired *t* test; ^bFisher's exact test; ^cMann-Whitney test. * Mean value (lower limit – upper limit).

Table 2. Metabolites responsible for discrimination between the Mild PPF from Significant PPF samples, according to the metabolomics models, using 41 samples of patients with schistosomiasis mansoni, Pernambuco, Brazil, 2020.

Metabolite	Chemical shift (δ /ppm)	Metabonomics formalism	Higher serum level
Valine	1.030	OPLS-DA	Mild PPF
No identified	1.046	OPLS-DA	Mild PPF
Alanine	1.446 and 1.502	PLS-DA and OPLS-DA	Significant PPF
N-acetylglucosamines	1.975 up 2.011	PLS-DA	Significant PPF
Glycolaldehyde	3.492	PLS-DA	Significant PPF

Table 3. Confusion matrix – OPLS-DA metabolomics model. Mild PPF versus Significant PPF, using 41 samples of patients with schistosomiasis mansoni, Pernambuco, Brazil, 2020.

		Classification from Niamey Protocol		
		Significant PPF	Mild PPF	<i>p</i> -value ¹
Metabonomics Model	Significant PPF	28	0	<0.0001
	Mild PPF	3	10	

¹ Fisher exact test. 92.7% accuracy, 90.3% sensitivity, 100% specificity. PPV and NPV value equal to 100% and 76.9%, respectively.

Figure 1 [Click here to access/download/Figure/Figure1_Milena.tiff](#)

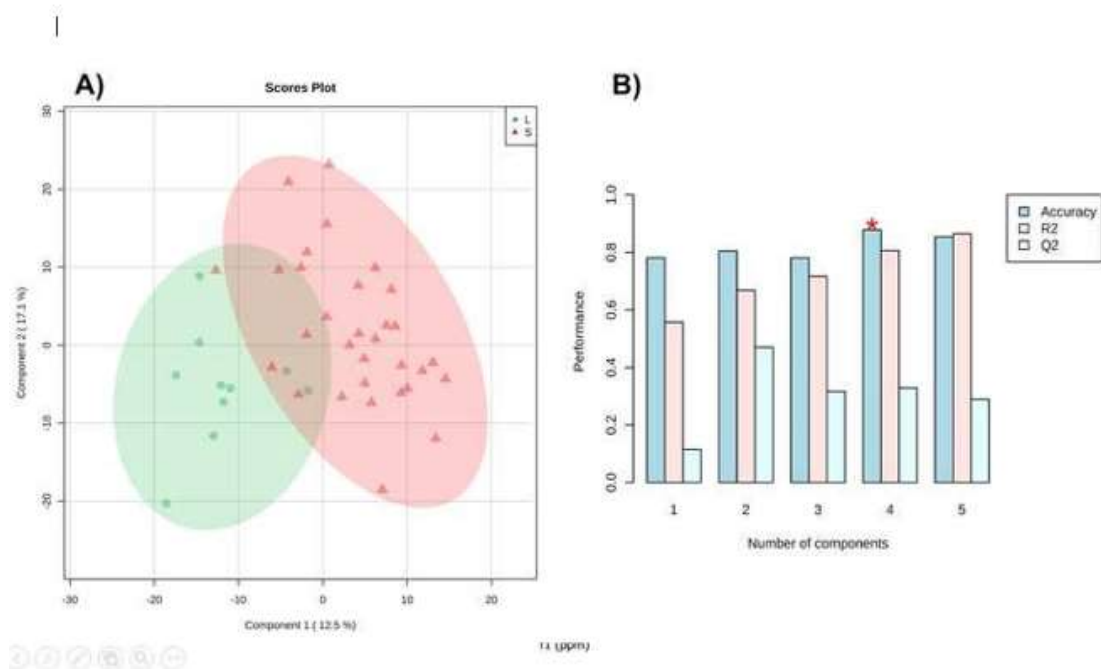
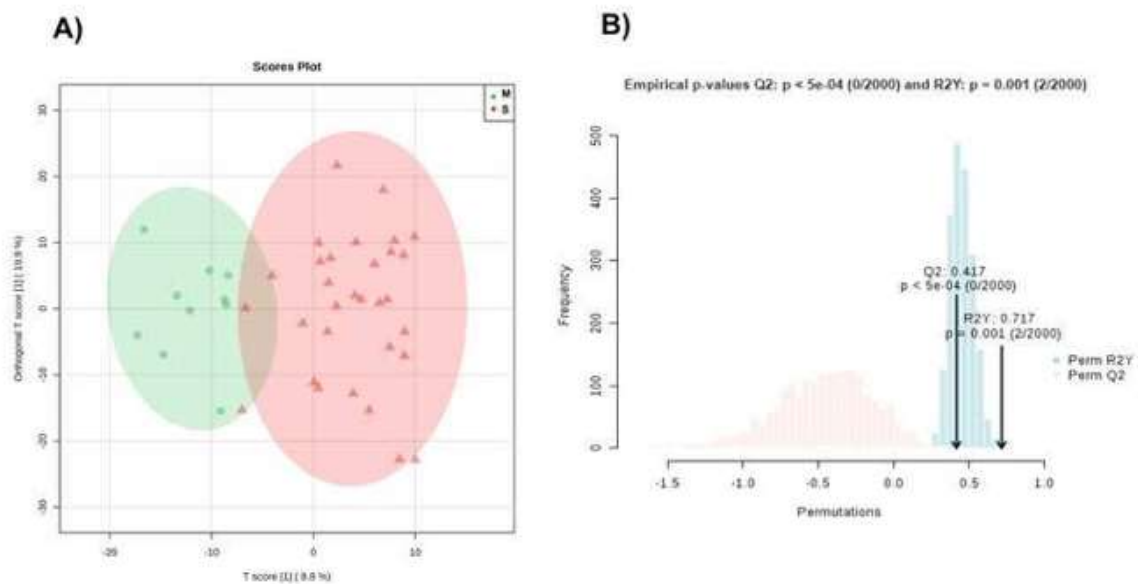


Figure 2 [Click here to access/download/Figure/Figure2_Milena.tiff](#)



Supplementary Material [Click here to access/download;Supplementary Files;Supplementary_Rodrigues.docx](#)

Assessment of Periportal Fibrosis in Schistosomiasis Patients by ^1H NMR-based Metabonomics

Milena Lima Rodrigues¹, Tatiane Priscila Santos Rodrigues Luz², Caroline Louise Diniz Pereira¹, Andrea Doria Batista¹, Ana Lucia Coutinho Domingues¹, Edmundo Pessoa de Almeida Lopes¹, Ricardo Oliveira Silva²

1. Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Centro de Ciências Médicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco 50670-901 Brasil.
2. Programa de Pós-Graduação em Química, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco 50670-740 Brasil.

Supplementary material

Two metabonomics models were built to discriminate among samples of patients with schistosomiasis according to the pattern of periportal fibrosis. In Figure 3A, a VIP score plot of PLS-DA model with VIP score higher than 2.2 is presented. However, there are other discriminatory bins with VIP scores higher than 1.0 that are not visualized. Figure S1 shows two bins centered at δ 1.502 ppm (VIP score equal to 1.98), assigned to methyl group of alanine; and δ 3.492 ppm (VIP score equal to 1.83), assigned to methylene group of glycolaldehyde. Both have a higher serum level in Significant PPF group (red rectangles in boxplot).

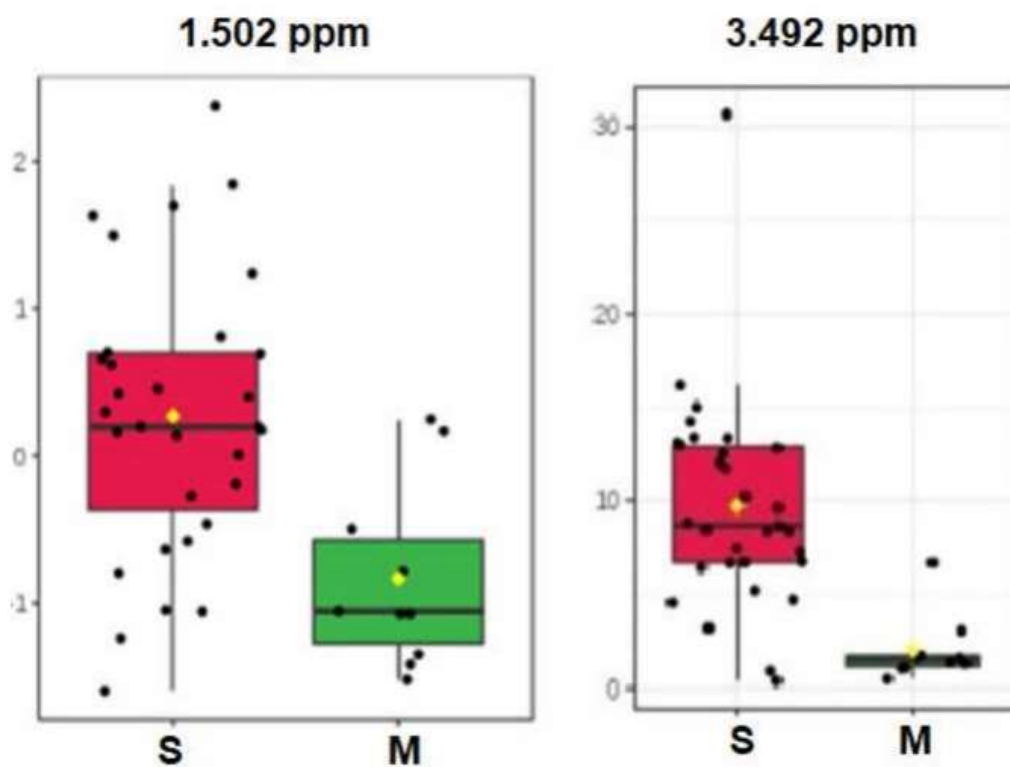
INSERT FIGURE S1

OPLS-DA model presented the best result for discrimination. Figure S2 shows the four bins most relevant for separation of Mild PPF from Significant PPF groups.

INSERT FIGURE S2

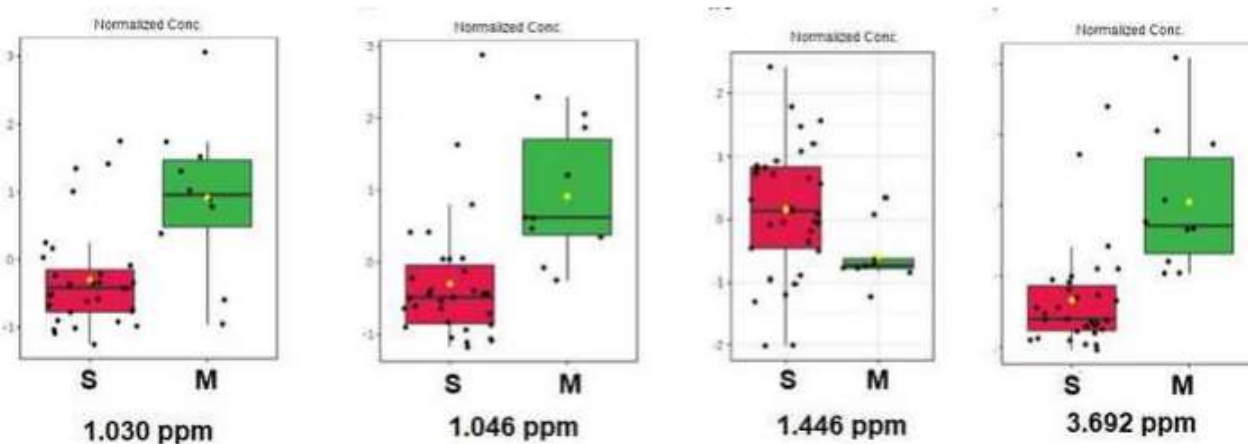
Only the signal at δ 1.046 ppm was not assigned. Valine (δ 1.030) ppm and carbohydrates (δ 3.692 ppm) presented higher serum levels in Mild PPF group, while alanine (δ 1.446 ppm) shown higher serum level in Significant PPF group.

Figure S1

[Click here to access/download;Figure;FigureS1.tiff.](#)


FigureS1.jpg

Figure S2

[Click here to access/download;Figure;FigureS2.tiff.](#)


FigureS2.jpg

Legends

Assessment of Periportal Fibrosis in Schistosomiasis Patients by ^1H NMR-based Metabonomics

Milena Lima Rodrigues¹, Tatiane Priscila Santos Rodrigues Luz², Caroline Louise Diniz Pereira¹, Andrea Doria Batista¹, Ana Lucia Coutinho Domingues¹, Edmundo Pessoa de Almeida Lopes¹, Ricardo Oliveira Silva²

1. Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Centro de Ciências Médicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco 50670-901 Brasil.

2. Programa de Pós-Graduação em Química, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco 50670-740 Brasil.

Figures Legends

Figure 1. ^1H NMR spectrum (400 MHz, D_2O , Presat-CPMG) of serum from a patient with schistosomiasis mansoni, Pernambuco, Brazil, 2020

Figure 2. Results of PLS-DA - 41 samples of patients with schistosomiasis mansoni, Pernambuco, Brazil, 2020. A) Score plot and B) Performance of metabonomics model – Significant (red) and Mild (green)

Figure 3. Results of PLS-DA - 41 samples of patients with schistosomiasis mansoni, Pernambuco, Brazil, 2020. A) VIP score plot. B) Permutation test with 2000 classes permutations ($p = 0.0245$)

Figure 4. Results of OPLS-DA - 41 samples of patients with schistosomiasis mansoni, Pernambuco, Brazil, 2020. A) Score plot and B) Performance of metabonomics model – Significant (red) and Mild (green)

Figure S1. PLS-DA Metabonomics model Boxplot from intensities of signals at δ 1.502 ppm (VIP score = 1.98) and 3.492 ppm (VIP score = 1.83). Mild PPF (green) versus Significant PPF (red)

Figure S2. Boxplot of OPLS-DA from intensities of signals at δ 1.030 ppm; 1.046 ppm; 1.446 ppm; and 3.692 ppm. Mild PPF (green) versus Significant PPF (red) samples

ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

UFPE - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DE PERNAMBUCO -



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: MODELOS METABONÔMICOS PARA AVALIAÇÃO DE FIBROSE PERIportal EM PACIENTES COM ESQUISTOSSOMOSE

Pesquisador: Milena Lima Rodrigues

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 07291019.2.0000.8807

Instituição Proponente: EMPRESA BRASILEIRA DE SERVIÇOS HOSPITALARES - EBSEH

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.222.710

Apresentação do Projeto:

A esquistossomose é uma das doenças de maior prevalência entre aquelas veiculadas as coleções hídricas, sendo principalmente um risco nas populações de área rurais e das periferias urbanas. De acordo com a Organização Mundial de Saúde – OMS, a doença afeta 200 milhões de pessoas, sendo uma ameaça mais elevada para indivíduos residentes em área de risco

A esplenomegalia e a fibrose periportal são causas da hipertensão portal, que são fatores clínicos associados a Esquistossomose, revelando um perfil de morbimortalidade diante do quadro infeccioso. A progressão da doença é clinicamente silenciosa e capsidiosa. A fibrose periportal se correlaciona diretamente com as condições clínicas e riscos de complicações em consequência da doença

A avaliação da fibrose hepática por um método não invasivo e de boa reprodutibilidade, como a metabonômica, poderá constituir relevante ferramenta para avaliação e classificação do grau de fibrose periportal em pacientes com esquistossomose.

O modelos metabonômicos, utilizando sangue periférico, poderão substituir a ultrassonografia, sobretudo nos estudos de campo na zona rural, na medida que o soro pode ser facilmente transportado e não requer um médico com expertise para realizar o exame, como ocorre com a US.

Trata-se de um estudo transversal com o objetivo de realizar análise em amostras de sôros pelo método de espectrometria de massa de indivíduos portadores de fibrose periportal por

FEDERAL DE PERNAMBUCO -

Continuação do Parecer: 3.222.710

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_1279540.pdf	14/03/2019 20:51:09		Aceito
Outros	respostasaonap.doc	14/03/2019 20:50:47	Milena Lima Rodrigues	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	digitalizar0001.pdf	14/03/2019 20:36:48	Milena Lima Rodrigues	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetoaparaocp.doc	14/03/2019 20:35:52	Milena Lima Rodrigues	Aceito
Outros	anuenciasame.doc	06/02/2019 20:42:09	Milena Lima Rodrigues	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	30/01/2019 12:51:35	Milena Lima Rodrigues	Aceito
Outros	declaracaovinculo.doc	21/01/2019 23:25:33	Milena Lima Rodrigues	Aceito
Outros	LATTESRICARDO.pdf	21/01/2019 16:37:47	Milena Lima Rodrigues	Aceito
Outros	LATTESCAROLINE.pdf	21/01/2019 16:36:34	Milena Lima Rodrigues	Aceito
Outros	LATTESDMUNDO.pdf	21/01/2019 16:35:36	Milena Lima Rodrigues	Aceito
Outros	lattesmilena.pdf	21/01/2019 16:34:08	Milena Lima Rodrigues	Aceito
Outros	PRINT.doc	21/01/2019 16:33:29	Milena Lima Rodrigues	Aceito
Outros	cartaapres.doc	21/01/2019 16:23:58	Milena Lima Rodrigues	Aceito
Outros	termodecompromissoe.doc	21/01/2019 16:08:00	Milena Lima Rodrigues	Aceito
Outros	termodecompromissoeconfidencialidade.doc	21/01/2019 16:07:06	Milena Lima Rodrigues	Aceito
Outros	cartadeanuencia.doc	21/01/2019 15:51:28	Milena Lima Rodrigues	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av. Professor Moraes Rego, S/N, 3º andar do prédio principal (enfermarias)**Bairro:** Cidade Universitária**CEP:** 50.670-901**UF:** PE**Município:** RECIFE