



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

**ANDREA DÓRIA BATISTA**

**VALIDAÇÃO DE MODELOS METABONÔMICOS POR RESSONÂNCIA  
MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDROGÊNIO PARA PREDIÇÃO DE FIBROSE  
HEPÁTICA SIGNIFICATIVA, FIBROSE HEPÁTICA AVANÇADA E CIRROSE EM  
PACIENTES COM HEPATITE C CRÔNICA**

**RECIFE/PE  
2017**

**ANDREA DÓRIA BATISTA**



**VALIDAÇÃO DE MODELOS METABONÔMICOS POR RESSONÂNCIA  
MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDROGÊNIO PARA PREDIÇÃO DE FIBROSE  
HEPÁTICA SIGNIFICATIVA, FIBROSE HEPÁTICA AVANÇADA E CIRROSE EM  
PACIENTES COM HEPATITE C CRÔNICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos para obtenção de título de Doutor em Medicina Tropical.

Orientador:  
Prof. Dr. Edmundo Pessoa de Almeida Lopes.

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

**RECIFE/PE**

**2017**

Catálogo na Fonte

Bibliotecária: Gláucia Cândida- CRB4-1662

B333v

Batista, Andrea Dória.

Validação de modelos metabonômicos por RMN de H1 para predição de fibrose hepática significativa, fibrose hepática avançada e cirrose em pacientes com hepatite C crônica. / Andrea Dória Batista. – 2017.

159 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2017.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Hepatite C - diagnóstico. 2. Fibrose. 3. Biomarcadores – sangue. 4. Espectroscopia de Ressonância Magnética. 5. Metabolômica. 6. Valor Preditivo dos Testes. I. Lopes Neto, Edmundo Pessoa de Almeida. (Orientador). II. Título.

618.9883

CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2017-131)



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)**

**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE (CCS)**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL (PPGMEDTROP)**

---

---

**ANDREA DORIA BATISTA**

**VALIDAÇÃO DE MODELOS METABONÔMICOS POR RESSONÂNCIA  
MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDROGÊNIO PARA PREDIÇÃO DE FIBROSE  
HEPÁTICA SIGNIFICATIVA, FIBROSE HEPÁTICA AVANÇADA E CIRROSE EM  
PACIENTES COM HEPATITE C CRÔNICA**

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

Aprovada em: 23/02/2017.

**BANCA EXAMINADORA**

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto (Orientador)  
Universidade Federal de Pernambuco

\_\_\_\_\_  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Lúcia Coutinho Domingues (Examinadora Interna)  
Universidade Federal de Pernambuco

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. José Eymard Medeiros Filho (Examinador Externo)  
Universidade Federal da Paraíba

\_\_\_\_\_  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Paula Carolina Valença Silva (Examinadora Externa)  
Universidade Federal de Pernambuco

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Severino Alves Junior (Examinador Externo)  
Universidade Federal de Pernambuco



## **UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**

### **REITOR**

Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

### **PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

Ernani Rodrigues de Carvalho Neto

### **DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Nicodemos Teles de Pontes Filho

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

Valdênia Maria Oliveira de Souza

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

Maria Amélia Vieira Maciel

### **DOCENTES PERMANENTES**

Ana Catarina de Souza Lopes

Ana Lúcia Coutinho Domingues

Célia Maria Machado Barbosa de Castro

Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto

Fábio André Brayner dos Santos

Heloísa Ramos Lacerda de Melo

Maria Amélia Vieira Maciel

Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho

Marli Tenório Cordeiro

Rejane Pereira Neves

Ricardo Arraes de Alencar Ximenes

Valdênia Maria Oliveira de Souza

Vera Magalhães da Silveira

Vlãudia Maria Assis Costa

### **DOCENTES COLABORADORES**

Líbia Cristina Rocha Vilela Moura

Virgínia Maria Barros de Lorena

À **Deus** Nosso Senhor,

Por permitir que eu chegasse até aqui e por me guiar na vida pessoal e profissional.

À meu esposo e filhos, **Marco Antônio, Mayara e Mateus,**

Pelo incentivo, apoio e compreensão nos momentos de ausência do convívio familiar.

À minha mãezinha, **Hilda Maria** (in memoriam),

e à meu pai, **Eugênio Jander,** meus melhores amigos e maiores incentivadores,

Por terem me ensinado a valorizar o conhecimento.

## AGRADECIMENTOS

**Ao Prof. Dr. Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto**, meu orientador no projeto e na prática diária do exercício da hepatologia no HC/UFPE,  
Pela disponibilidade para ensinar e discutir, com bom humor e energia de quem mantém o entusiasmo pela especialidade em elevado grau.

**Ao Prof. Dr. Ricardo Oliveira da Silva**, meu co-orientador,  
Pela paciência em ensinar conceitos de química analítica para uma médica, e pela disponibilidade para discutir os resultados incansavelmente, ajudando de forma decisiva na integração do conhecimento dessas duas áreas correlatas.

**À Dra. Michele Maria Gonçalves de Godoy**,  
Que, com sua dissertação de mestrado, abriu caminho para a linha de pesquisa em metabonômica nas doenças hepáticas em nosso meio, e mostrou a beleza deste tema.

**À Joelma Carvalho Santos e Izolda Maria Fernandes de Moura**,  
Companheiras do programa de pós-graduação em Medicina Tropical, pela amizade incondicional e pela parceria nesta jornada científica.

**À Carlos Jonnatan Pimentel Barros, Tássia Brena Barroso Carneiro da Costa e Ronaldo Dionísio da Silva**,  
Colegas do programa de pós graduação em Química Fundamental, pelo comprometimento no desenvolvimento do projeto e importante contribuição nas análises quimiométricas e discussões dos resultados.

**À Dra. Norma Jucá e Dra. Mariana Lira**,  
Por terem, gentilmente, revisado as biópsias hepáticas dos pacientes incluídos na pesquisa.

**À Dra. Maria Chiara Chindamo**,  
Por ter aceitado participar do projeto, contribuindo decisivamente com a segunda fase da pesquisa, ao ceder os soros e dados clínicos dos pacientes do Rio de Janeiro, e pelo entusiasmo na discussão dos resultados.

**Ao Instituto Nacional do Seguro Social**, na pessoa da **Dra Ladjane Santos Wolmer de Melo**, à época chefe do Serviço de Saúde do Trabalhador,  
Pelo incentivo e empenho na obtenção da licença do trabalho, tão importante para a dedicação ao projeto.

**Ao programa de pós-graduação em Medicina Tropical**, e em especial ao **Prof. Ricardo Arraes de Alencar Ximenes**,  
Pelo profissionalismo, dedicação e apoio aos estudantes dos programas de mestrado e doutorado.

**Aos membros da banca de qualificação e examinadora**,  
Por suas valiosas contribuições ao projeto.

À **todos** que, direta ou indiretamente, contribuíram para a conclusão desta pesquisa.

A verdadeira viagem do descobrimento não consiste em procurar novas paisagens, mas em ver com novos olhos”.

(Marcel Proust)

## RESUMO

O padrão-ouro na avaliação da fibrose hepática em pacientes com hepatite C crônica (HCC) é a análise histopatológica de fragmento hepático por biópsia, método invasivo, sujeito a complicações e a erros. Alternativamente, biomarcadores vêm sendo testados. A metabonômica é uma estratégia de análise que utiliza espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN H1) para classificar biofluidos em função do seu status bioquímico. Este estudo de validação fase II teve como objetivo desenvolver modelos metabonômicos (MMs), através de espectros de RMN H1 de amostras de soro, para predição de fibrose hepática significativa (FS: METAVIR  $\geq$  F2), fibrose avançada (FA: METAVIR  $\geq$  F3), e cirrose (C: METAVIR F4 ou cirrose clínica), em duas populações de pacientes com HCC, nas cidades de Recife/PE e do Rio de Janeiro/RJ, e comparar com os índices APRI e FIB-4, utilizando a biópsia como padrão de referência. Em PE, foram incluídos 69 pacientes com biópsia dos últimos 12 meses ou diagnóstico clínico de cirrose. No RJ, foram incluídos 180 pacientes com biópsia na inclusão. Pacientes com doença hepática por outra etiologia, coinfeção com HBV ou HIV ou ingestão excessiva de etanol foram excluídos. Espectros de RMN H1 foram obtidos utilizando espectrômetro *Varian Unity 300*. Os MMs foram construídos utilizando os formalismos análise discriminante linear (LDA) e análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA). Em pacientes de PE, os MMs foram testados por validação cruzada, considerando FS, FA e C, e em pacientes do RJ, por validação cruzada em 126 indivíduos, e por validação externa em 54, considerando FS e FA. Em PE, 42 (61%) pacientes apresentaram FS, 28 (40%) FA e 18 (26%) C. Os MMs apresentaram sensibilidade e especificidade de 97,6% (IC 95%: 87,4-99,9%) e 92,6% (IC 95%: 77,5-99,9%) para predição de FS; 96,4% (IC 95%: 81,7-99,1%) e 95,1% (IC 95%: 83,5-99,4%) para FA; e 100% (IC 95%: 81,5-100%) e 98,0% (IC 95%: 89,6-99,9%) para C. No RJ, 103 (57,2%) pacientes apresentaram FS e 51 (28,3%) FA. Os MMs validados externamente apresentaram sensibilidade e especificidade de 100% (IC 95%: 86,8-100%) e 100% (IC 95%: 87,7-100%) para predição de FS, e de 100% (IC 95%: 71,5-100%) e 100% (IC 95%: 91,8-100%) para FA. O desempenho dos MMs foi similar ao do APRI e FIB-4, nas duas populações, porém, os MMs classificaram corretamente 27 (39,7%) pacientes de PE e 95 (54,3%) do RJ com valores intermediários de APRI, e 25 (36,8%) pacientes de PE e 76 (44,2%) do RJ com valores intermediários de FIB-4, quando não é possível predizer FS e FA por esses índices. Conclui-se que os MMs desenvolvidos apresentaram elevada acurácia para predição de FS, FA e C, em pacientes com HCC de PE e do RJ, e permitiram o estadiamento da fibrose nas zonas cinzas do APRI e FIB-4, sugerindo tratar-se de método promissor como marcador

indireto de fibrose nesses pacientes. Entretanto, serão necessários novos estudos, com maior casuística, a fim de confirmar seu desempenho, para posterior incorporação na prática clínica.

Palavras-chave: Hepatite C/ diagnóstico. Fibrose. Biomarcadores/ sangue. Espectroscopia de ressonância magnética. Metabolômica. Valor preditivo de testes.

## ABSTRACT

The gold standard in liver fibrosis assessment in patients with chronic hepatitis C (CHV) is histopathological analysis of hepatic fragment by biopsy, an invasive method, subject to complications and errors. Alternatively, biomarkers have been tested. Metabonomics is an analytical strategy that uses nuclear magnetic resonance of hydrogen ( $^1\text{H-NMR}$ ) spectroscopy to classify biofluids based on their biochemical status. This phase II validation study aimed to develop metabonomic models (MMs), using  $^1\text{H-NMR}$  spectra of serum samples, to predict significant liver fibrosis (SF: METAVIR  $\geq$  F2), advanced fibrosis (AF: METAVIR  $\geq$  F3), and cirrhosis (C: METAVIR F4 or clinical cirrhosis), in two populations of CHC patients, in the cities of Recife/ PE and Rio de Janeiro/RJ, and to compare these to the APRI and FIB-4 scores, using biopsy as reference. In PE, 69 patients were included, who had had a biopsy in the last 12 months or clinical diagnosis of cirrhosis. In RJ, 180 patients were included who had had a biopsy on inclusion. Patients with liver disease due to another etiology, co-infection with HBV or HIV or excessive ethanol intake were excluded.  $^1\text{H-NMR}$  spectra were obtained using a Varian Unity 300 spectrometer. The MMs were constructed using the linear discriminant analysis (LDA) and partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) formalisms. For patients of PE, the constructed MMs were tested by cross-validation, considering SF, AF and C and for those of RJ, by cross-validation in 126, and by external validation in 54 patients, considering SF and AF. In PE, 42 (61%) patients had SF, 28 (40%) AF and 18 (26%) C. The MMs presented sensitivity and specificity of 97.6% (95% CI: 87.4-99.9%) and 92.6% (95% CI: 77.5-99.9%) for predicting SF; 96.4% (95% CI: 81.7-99.1%) and 95.1% (95% CI: 83.5-99) for AF; and 100% (95% CI: 81.5-100%) and 98.0% (95% CI: 89.6-99.9%) for C. In RJ, 103 (57.2%) patients presented SF and 51 (28.3%) AF. The externally validated MMs presented sensitivity and specificity of 100% (95% CI: 86.8-100%) and 100% (95% CI: 87.7-100%) for predicting SF, and 100% (95% CI: 71.5-100%) and 100% (95% CI: 91.8-100%) for AF. The performance of the MMs was similar to that of APRI and FIB-4, in both populations, however, the MMs correctly classified 27 (39.7%) PE patients and 95 (54.3%) RJ patients with intermediate values of APRI and 25 (36.8%) PE patients and 76 (44.2%) RJ patients with intermediate values of FIB-4, when it is not possible to predict SF and AF by these scores. It is concluded that the MMs that were developed presented a high accuracy for predicting SF, AF and C in CHC patients of PE and RJ, and allowed the staging of fibrosis in the gray zones of these scores, suggesting that it is a promising method as an indirect marker of fibrosis in these

patients. However, further studies, with a larger casuistry, will be necessary in order to confirm its performance, for later incorporation into clinical practice.

Key words: Hepatitis C/ diagnosis. Fibrosis. Biomarkers/ blood. Magnetic resonance spectroscopy. Metabolomics. Predictive value of tests.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1-</b> Mudanças na arquitetura hepática associadas à fibrose hepática avançada. ....	23
<b>Figura 2-</b> O sistema METAVIR de estadiamento da fibrose. ....	24
<b>Quadro 1-</b> Índices sorológicos para avaliação indireta da presença de fibrose ou cirrose em pacientes com infecção pelo vírus da hepatite C .....	29
<b>Figura 3-</b> Técnicas "ômicas" .....	34
<b>Figura 4-</b> Representação gráfica das diferentes abordagens analíticas e técnicas de informática empregadas em estudos de metabolômica e metabonômica. ....	35
<b>Figura 5-</b> Espectroscopia de RMN H1 de amostra de soro de paciente com HCC. ....	36
<b>Figura 6 -</b> Classificação de amostras de urina baseada em escores obtidos através de modelos metabonômicos de espectros de RMN H1 por LDA de 34 pacientes com infecção pelo HCV (doença) e 32 indivíduos controles. ....	38
<b>Figura 1-</b> Análise PLS-DA dos modelos metabonômicos para predição de fibrose significativa, avançada e cirrose em 69 pacientes com hepatite C crônica, em Recife/PE, no período de 2012 a 2015. ....	62
<b>Figura 2 -</b> Comparação de desempenho dos modelos metabonômicos, APRI e FIB-4, em 69 pacientes com hepatite C crônica, em Recife/PE, no período de 2012 a 2015. ....	65
<b>Figura 1-</b> Análise PLS-DA dos modelos metabonômicos para predição de fibrose significativa e avançada em 126 pacientes com hepatite C crônica, no Rio de Janeiro/RJ, no período de 2010 a 2014. ....	84
<b>Figura 2-</b> Comparação de desempenho dos modelos metabonômicos, APRI e FIB-4 nas populações modelo e validação externa, em pacientes com hepatite C crônica, no Rio de Janeiro/RJ, no período de 2010 a 2014. ....	87
<b>Figura 1-</b> Modelo metabonômico por PCA em 69 pacientes com HCC de PE e de 180 pacientes com HCC do RJ, no período de 2010 a 2015. ....	111
<b>Figura 2-</b> Curvas ROC do APRI e FIB-4 em pacientes com hepatite C crônica de PE e do RJ, no período de 2010 a 2015. ....	112

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b> Principais características demográficas e laboratoriais de 69 pacientes com hepatite C crônica, em Recife/PE, no período de 2012 a 2015 .....	59
<b>Tabela 2-</b> Principais características demográficas e laboratoriais de 69 pacientes com hepatite C crônica, de acordo com o grupo de fibrose, em Recife/PE, no período de 2012 a 2015.....	60
<b>Tabela 2-</b> Principais características demográficas e laboratoriais de 69 pacientes com hepatite C crônica, de acordo com o grupo de fibrose, em Recife/PE, no período de 2012 a 2015 (continuação).....	61
<b>Tabela 3-</b> Desempenho dos modelos metabonômicos, APRI e FIB-4 para predição de fibrose significativa, avançada e cirrose em 69 pacientes com hepatite C crônica, em Recife/PE, no período de 2012 a 2015.....	63
<b>Tabela 1-</b> Principais características demográficas e laboratoriais de 180 pacientes com hepatite C crônica, de acordo com o tipo de população (modelo e validação) no Rio de Janeiro/RJ, no período de 2010 a 2014. ....	81
<b>Tabela 2-</b> Principais características demográficas e laboratoriais de 180 pacientes com hepatite C crônica, de acordo com o grupo de fibrose, no Rio de Janeiro/RJ, no período de 2010 a 2014.....	82
<b>Tabela 3-</b> Desempenho dos modelos metabonômicos, APRI e FIB-4 para predição de fibrose significativa e avançada em pacientes com hepatite C crônica, no Rio de Janeiro/RJ, no período de 2010 a 2014.....	85
<b>Tabela 1-</b> Principais características demográficas e laboratoriais de pacientes com hepatite C crônica, de acordo com o tipo de população (RJ e PE), no período de 2010 a 2015. ....	110

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Acurácia
AH	Ácido hialurônico
ALT	Alanina aminotransferase
Anti-HBc	Anticorpo contra o antígeno core do vírus da hepatite B
Anti-HCV	Anticorpo contra o vírus da hepatite C
Apo A1	Apolipoproteína A1
APRI	Índice da relação aspartato aminotransferase sobre plaquetas
ARFI	<i>Acoustic Radiation Force Impulse</i>
AST	Alanina aminotransferase
AUROC	Área sobre a curva de características de operação do receptor
BT	Bilirrubina total
CHC	Carcinoma hepato-celular
E	Especificidade
ET	Elastografia transitória
FA	Fosfatase alcalina
FIB-4	Índice de fibrose baseado em quatro fatores
GGT	Gama-glutamil transpeptidase
Hap	Haptoglobina
HBsAg	Antígeno de superfície do vírus da hepatite B
HBV	Vírus da hepatite B
HC/UFPE	Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco
HCC	Hepatite C crônica
HCV	Vírus da hepatite C
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HUCFF/UFRJ	Hospital Universitário Clementino Fraga Filho/Universidade Federal do Rio de Janeiro
INR	Razão normalizada internacional
LDA	Análise discriminante linear
LOOCV	<i>Leave-one-out cross-validation</i>
MEC	Matriz extracelular

MM	Modelo metabonômico
MMP	Metaloproteinases da matriz
OMS	Organização Mundial da Saúde
PC	Componente principal
PCA	Análise de componentes principais
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PLS-DA	Análise discriminante por mínimos quadrados parciais
RMN H1	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
ROC	<i>Receiver Operating characteristic</i>
ROI	Região de interesse
RVN	Razão de verossimilhança negativa
RVP	Razão de verossimilhança positiva
S	Sensibilidade
SWE	<i>Shear Wave Elastography</i>
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TIMPs	Inibidores das metaloproteinases teciduais
TP	Tempo de protrombina
US	Ultra-sonografia
$\alpha$ -2-M	$\alpha$ -2-Macroglobulina

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>18</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>21</b>
2.1 Hepatite Crônica C: aspectos epidemiológicos e clínicos .....	21
2.2 Fibrose hepática e seu diagnóstico nas hepatites virais .....	22
2.3 Metaboloma, Metabonômica e Metabolômica .....	33
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>41</b>
3.1 Geral .....	41
3.2 Específicos.....	41
<b>4. CASUÍSTICA E MÉTODOS</b> .....	<b>42</b>
4.1- Desenho do estudo .....	42
4.2- Local e período do estudo .....	42
4.3- População do estudo.....	43
4.4- Critérios de inclusão.....	43
4.5- Critérios de exclusão .....	43
4.6- Definição das variáveis e dos desfechos .....	43
<b>4.7- Operacionalização da pesquisa e técnicas</b> .....	<b>44</b>
4.7.1- Recrutamento dos participantes e procedimentos clínicos e laboratoriais.....	44
4.7.2- Realização das biópsias hepáticas e análise histopatológica.....	46
4.7.3- Obtenção dos espectros de RMN H1 dos soros .....	47
<b>4.8- Análise estatística</b> .....	<b>47</b>
4.8.1- Análise descritiva e comparativa da casuística .....	47
4.8.2- Análise estatística multivariada dos dados espectrais e desenvolvimento dos MMs.....	48
4.8.3- Análise de desempenho dos MM e dos índices APRI e FIB-4 .....	49
4.9- Fluxograma da pesquisa .....	51
4.10- Considerações éticas .....	52
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>53</b>
5.1 - Modelos Metabonômicos por RMN H1 para Predição de Fibrose Hepática em Pacientes com Hepatite C Crônica .....	53
5.2- Resultados Suplementares.....	71
5.3 - Validação de Modelos Metabonômicos por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio para Predição de Fibrose Hepática Significativa e Avançada em Pacientes com Hepatite C Crônica. ....	72
<b>6. RECOMENDAÇÕES</b> .....	<b>96</b>
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	<b>97</b>

<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>98</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>104</b>
APÊNDICE A- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO .....	104
APÊNDICE B – Ficha Clínica .....	106
APÊNDICE C – Protocolo de Biossegurança .....	109
APÊNDICE D - Tabelas e figuras dos resultados suplementares .....	110
APÊNDICE E - Versão do artigo 1 em inglês.....	113
APÊNCIDE F - Versão do artigo 2 em inglês.....	133
<b>ANEXOS .....</b>	<b>156</b>
ANEXO A- Aprovação do projeto pelo CEP .....	156
ANEXO B- Aprovação da emenda ao projeto pelo CEP .....	157
ANEXO C- Autorização de uso de dados de pesquisa.....	159

## 1. INTRODUÇÃO

A hepatite C crônica (HCC) é uma das principais causas de doença hepática crônica no mundo. Cerca de 30% dos pacientes evoluem para cirrose após duas a três décadas da infecção e, uma vez cirróticos, apresentam risco de 15 a 20% de descompensação e de 10% de surgimento de carcinoma hepato-celular (CHC) em 5 anos (ALBERTI et al., 1999). Considerando que a fibrose é o principal definidor de progressão da doença, o diagnóstico preciso do estágio de fibrose hepática é essencial no manejo clínico desses pacientes, uma vez que é utilizada para decisão da necessidade e urgência de terapia anti-viral, avaliação prognóstica e vigilância de complicações (SEBASTIANI, 2009).

O padrão-ouro para o estadiamento da fibrose hepática é o exame histopatológico de fragmento obtido, geralmente, através de biópsia percutânea por agulha fina. O procedimento necessita ser realizado em ambiente hospitalar, por profissional treinado e não é isento de complicações, que ocorrem em até 13,6% dos casos, podendo ser graves em 0,75% dos casos (MYERS; FONG; SHAHEEN, 2008; VAN DER POORTEN et al., 2006). Erro de amostragem na obtenção do espécime de biópsia, e variabilidade intra e inter-observador, na avaliação histopatológica, podem levar à discrepância na classificação da fibrose em 20% dos casos, mesmo quando tolerância de  $\pm 1$  estágio de fibrose é aceita (PETZ et al., 2003). Além disso, a evidência de que a fibrose hepática pode ser reversível com a resposta ao tratamento da hepatite viral, levou à necessidade de monitoramento do estágio de fibrose em avaliações seriadas, mais frequentes que a permitida pela biópsia, e estimulou o estudo de marcadores não invasivos da fibrose hepática. (FRIEDMAN, 2003).

Os marcadores não invasivos de fibrose podem ser sorológicos ou físicos, e os marcadores sorológicos podem ser diretos ou indiretos. Os diretos refletem o *turnover* das proteínas da matriz extracelular (MEC), enquanto os indiretos estão relacionados à atividade inflamatória, hipertensão portal, ou alteração da função hepática, que acompanham ou decorrem do processo de fibrogênese. Os marcadores sorológicos podem ser usados isoladamente ou, como ocorre mais frequentemente, em conjunto, quando uma pontuação (índice) discriminante é determinada a partir da combinação deles. De uma maneira geral, os marcadores indiretos de fibrose hepática mostraram melhor resultado na identificação de pacientes nos dois extremos da evolução da fibrose, ou seja, fibrose ausente ou leve e fibrose avançada ou cirrose, porém sua acurácia para identificar pacientes com fibrose moderada é pequena. (ROSSI et al., 2007; SCHIAVON; NARCISO-SCHIAVON; DE CARVALHO-

FILHO, 2014). Quando comparados, dez painéis de marcadores sorológicos foram capazes de confirmar ou afastar fibrose significativa em apenas 35% dos pacientes com HCC (PARKES et al., 2006). Outra limitação dos marcadores sorológicos é a de não serem fibrose-específicos, podendo refletir também atividade necro-inflamória (ROSSI et al., 2007).

A metabonômica é um método diagnóstico descrito em 1999, que analisa globalmente os metabólitos endógenos de biofluidos ou tecidos biológicos, utilizando análise espectroscópica (NICHOLSON; LINDON; HOLMES, 1999). Baseia-se no princípio da homeostase. Uma perturbação bioquímica, causada por uma doença, por exemplo, leva à mecanismos de ajuste nos níveis dos metabólitos, na busca da homeostase, que são expressos como uma impressão digital desta perturbação (NICHOLSON; LINDON, 2008). Biofluidos são geralmente analisados por RMN H1, visto que grande parte dos metabólitos conhecidos possuem átomos de hidrogênio. Estudos clínicos em doenças hepáticas têm demonstrado utilidade da metabonômica no diagnóstico da hepato-toxicidade por droga, hepatite alcoólica, hepatites crônicas B e C, e em complicações da cirrose hepática, como na encefalopatia hepática e CHC, utilizando soro ou urina (GODOY et al., 2010; JIMÉNEZ et al., 2010; LIAN et al., 2011; SHARIFF et al., 2011; WATERS et al., 2006; ZHANG et al., 2010).

Por expressar mudanças no ambiente bioquímico intra e extra-celular, a metabonômica poderia identificar as alterações bioquímicas causadas por diferentes estágios de fibrose hepática. Shariff, em 2010, demonstrou que a espectroscopia de urina por RMN H1 e posterior análise estatística multivariada foi capaz de diferenciar pacientes com cirrose hepática de pacientes com CHC, em população nigeriana infectada pelo vírus da hepatite B (HBV), com sensibilidade de 89,5% e especificidade de 88,9%. Em estudo similar, conduzido pelo mesmo grupo, a sensibilidade e especificidade do método na diferenciação de pacientes com CHC e cirrose, em egípcios infectados pelo vírus da hepatite C (HCV), foi de 81% e 71%, respectivamente (SHARIFF et al., 2011). Análise multivariada de espectro de soro por RMN H1 foi capaz de diferenciar pacientes com CHC de pacientes com cirrose e de controles saudáveis, em uma população chinesa (GAO et al., 2009). Outro estudo chinês demonstrou que o modelo metabonômico foi capaz de diferenciar cirrose compensada de cirrose descompensada, em pacientes infectados pelo HBV, com acurácia de 85% (QI et al., 2012).

Com base no exposto, para avaliar se a metabonômica, método minimamente invasivo, é capaz de diferenciar os diferentes estágios de fibrose hepática em pacientes com HCC, decidiu-se desenvolver modelos metabonômicos, a partir de espectros de RMN H1 de soro, para predição de fibrose hepática significativa, fibrose hepática avançada e cirrose, utilizando a biópsia hepática como referência. Decidiu-se ainda comparar o desempenho dos modelos

metabonômicos construídos com o de dois índices sorológicos de fibrose amplamente utilizados em nosso meio, o índice da relação aspartato aminotransferase sobre plaquetas (APRI) e o índice de fibrose baseado em quatro fatores (FIB-4).

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Hepatite Crônica C: aspectos epidemiológicos e clínicos

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 130 a 170 milhões de pessoas no mundo estejam cronicamente infectadas pelo HCV (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2004), e cerca de 500 mil pessoas morreram em 2010, em decorrência de doenças relacionadas ao vírus, incluindo cirrose e CHC (LOZANO et al., 2012). No Brasil, a prevalência estimada de hepatite C é 1.450.000 casos (BRASIL, 2015) e cerca de 8 mil mortes decorreram de doenças relacionadas ao HCV em 2013 (FERREIRA et al., 2015).

Nos EUA, em 2012, o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), recomendou o rastreamento da infecção pelo HCV em todos os nascidos entre 1945 e 1965, quando houve explosão da natalidade, após a Segunda Guerra Mundial (geração do *baby boom*), visto que a prevalência da infecção nesta população é de 3,25%, cinco vezes maior que na população nascida em outros anos. A alta prevalência da doença nesta coorte de nascimento reflete um número substancial de infecções incidentes ao longo dos anos 70 e 80, decorrentes de transfusões sanguíneas ou condutas de risco até então ignoradas (SMITH et al., 2012).

O impacto da história natural da infecção pelo HCV ainda será um importante problema de saúde pública pelos próximos 10 a 15 anos. Isso porque estima-se que, enquanto a infecção pelo HCV apresentou pico de prevalência em 2001, sofrendo declínio lento a partir de então, com previsão de atingir 50% da prevalência de pico em 2030, a prevalência de cirrose vem aumentando desde 1990. A proporção de cirróticos dentre os infectados correspondia a 20% em 2006, com projeção de elevação para 44,9% em 2030, para só então começar a apresentar declínio. O número de pacientes com cirrose descompensada ou diagnóstico de CHC também aumentará até 2020-2030 (DAVIS et al., 2010).

O curso da infecção pelo HCV é lento e leva à cronicidade em cerca de 80% dos casos (ALTER et al., 1999). Os sintomas são inespecíficos e, geralmente, inaparentes, até que a cirrose se instale. A progressão da fibrose hepática no curso da HCC é variável. O tempo médio para o aparecimento da cirrose em pacientes não tratados é de 30 anos, porém 33% dos pacientes desenvolvem cirrose em menos de 20 anos (fibrosantes rápidos) e 31% não apresentam cirrose antes de 50 anos de infecção (fibrosantes lentos) (POYNARD et al., 2000). Os fatores associados à progressão mais rápida da fibrose são idade superior a 40 anos no momento da infecção, sexo masculino, uso de álcool acima de 50g/dia, coinfeção com HBV ou vírus da imunodeficiência humana (HIV), índice de massa corporal elevado associado à esteatose

hepática, imunossupressão pós transplante hepático e sobrecarga de ferro (FRIEDMAN, 2003). A cirrose hepática foi responsável por 1.000.000 de mortes em 2010, sendo cerca de 300.000 relacionadas ao HCV (LOZANO et al., 2012). Suas complicações, como a hemorragia digestiva alta, encefalopatia hepática, ascite, peritonite bacteriana espontânea, síndrome hepato-renal e síndrome hepato-pulmonar, além do CHC, determinam alta morbi-mortalidade nestes pacientes.

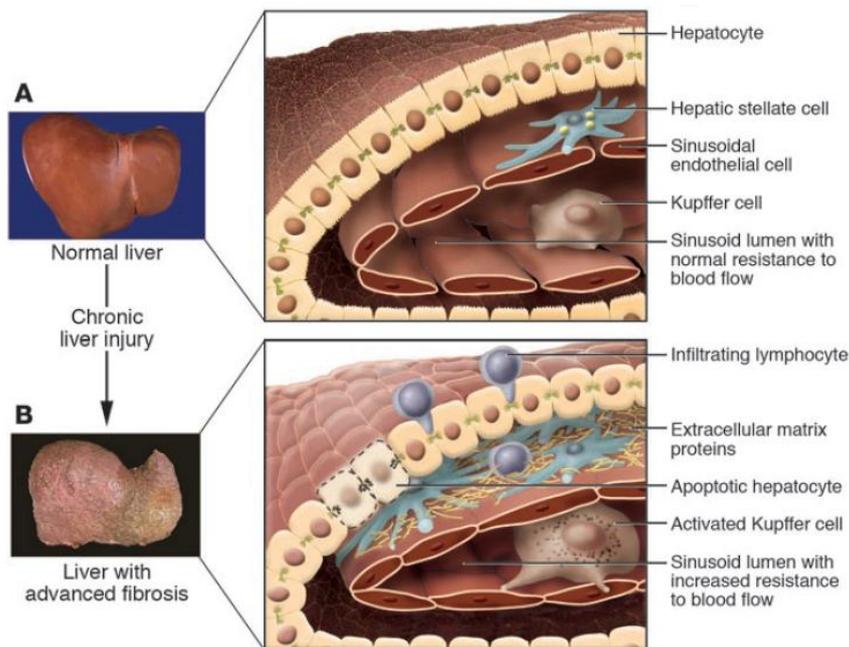
## 2.2 Fibrose hepática e seu diagnóstico nas hepatites virais

A fibrose hepática é consequência de uma reposta do tipo cicatrização à injúria hepática crônica, e resulta do excesso de deposição de componentes da MEC no espaço de Disse, que torna o tecido inelástico (FRIEDMAN, 2003). A cirrose é a manifestação final desse processo, caracterizada por distorção da arquitetura do órgão, hipertensão portal e perda de função hepática. A principal característica da fibrogênese hepática é a ativação das células estreladas. A inflamação hepática crônica ativa estas células, antes quiescentes, que se tornam proliferativas, contráteis, produzem componentes da MEC e secretam citocinas pró-inflamatórias. O balanço entre deposição (fibrogênese) e degradação (fibrólise) da MEC é controlado por metaloproteinases da matriz (MMP) e seus reguladores, os inibidores das metaloproteinases teciduais (TIMPs). No processo de fibrose há um desequilíbrio entre esses dois mecanismos, que favorece a fibrogênese. As células estreladas ativadas produzem TIMPs, diminuindo a degradação da MEC (FRIEDMAN, 2003). A representação gráfica do processo de fibrose hepática é mostrado na Figura 1.

Sabe-se hoje em dia que o processo de fibrose e até de cirrose pode ser reversível, uma vez cessado o estímulo inflamatório hepático (POYNARD et al., 2002). O advento dos novos anti-virais de ação direta, que atuam em diferentes alvos da replicação viral, mudou drasticamente o cenário do tratamento da HCC. O uso combinado das novas drogas permite tratamento por via oral, bem tolerado, por 12 a 24 semanas, e com baixo risco de resistência. A resposta virológica sustentada ocorre em mais de 95% dos pacientes (EASL, 2016; SCHINAZI; ASSELAH, 2017), e está associada à redução de mortalidade em 2 a 3 vezes e redução do risco de CHC em 5 a 10 vezes, no período de 5 a 10 anos. (SHIFFMAN; BENHAMOU, 2015). Esse risco é mais elevado a partir do momento que o paciente apresenta fibrose hepática significativa. Por isso, está formalmente indicado tratar os pacientes com fibrose significativa ou avançada (EASL, 2016). Entretanto, o tratamento não está amplamente disponível, sendo oferecido pelo

sistema público de saúde do Brasil para pacientes com fibrose hepática avançada e para aqueles em situação clínica especial, como os coinfetados pelo HIV, transplantados, renais crônicos ou com manifestação extra-hepática da doença (BRASIL, 2015). Mesmo após a cura da HCC, a reversibilidade da fibrose hepática pode, potencialmente, ser influenciada pela duração da cirrose, que reflete um período mais longo de reticulação do colágeno; pelo conteúdo total de colágeno no tecido cicatricial e pela expressão reduzida das enzimas que degradam a MEC ou elevação sustentada de proteínas que inibem sua função (FRIEDMAN, 2003). Desta forma, o diagnóstico acurado da fibrose hepática é de fundamental importância no manejo clínico desses pacientes, para determinar a necessidade e urgência de tratamento, monitorar complicações da doença hepática crônica e avaliar regressão de fibrose pós tratamento bem sucedido.

Figura 1- Mudanças na arquitetura hepática associadas à fibrose hepática avançada.



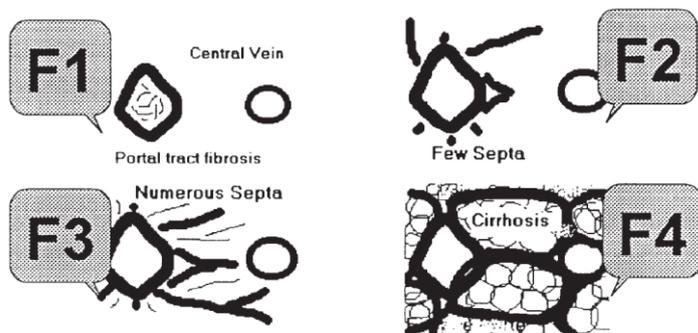
Fonte: (BATALLER; BRENNER, 2005)

Legenda: (A): arquitetura hepática normal; (B) fibrose hepática avançada

Nota: Em decorrência da injúria hepática crônica, linfócitos inflamados infiltram o parênquima hepático. Alguns hepatócitos sofrem apoptose e as células de Kupffer ativadas liberam mediadores fibrogênicos. As células esteladas proliferam e sofrem uma dramática ativação fenotípica, secretando grande quantidade de proteínas da MEC. As células sinusoidais endoteliais perdem sua fenestração e a contração tônica das células esteladas aumenta a resistência ao fluxo sanguíneo sinusoidal hepático.

O padrão de referência na avaliação da fibrose é a análise histopatológica do tecido hepático. O fragmento é, mais frequentemente, obtido através de punção percutânea por agulha, podendo também ser obtido por canulação de veia hepática, através de punção transjugular, ou por visão direta, durante laparoscopia ou laparotomia. Várias classificações histológicas foram criadas para avaliar a fibrose hepática nas hepatites crônicas, empregando sistema de escores. A classificação METAVIR é a recomendada pelo Ministério da Saúde do Brasil, por ser simples e amplamente empregada na rotina diagnóstica (BEDOSSA; POYNARD; METAVIR COOPERATIVE STUDY GROUP, 1996). Segundo METAVIR, a fibrose hepática é classificada em 5 estágios: F0 = ausência de fibrose portal e periportal; F1 = fibrose portal e periportal sem septos; F2 = fibrose portal e periportal com raros septos; F3 = fibrose portal e periportal com numerosos septos e F4 = cirrose (Figura 2). Considera-se fibrose significativa METAVIR  $\geq$  F2, fibrose avançada METAVIR  $\geq$  F3 e cirrose METAVIR = F4

Figura 2- O sistema METAVIR de estadiamento da fibrose.



Fonte: Poynard, 2000

Legenda: F0- normal (sem fibrose). F1- fibrose portal. F2- poucos septos. F3- muitos septos. F4- cirrose.

As limitações da biópsia hepática incluem o risco de complicações, a qualidade da amostra e a variabilidade intra e inter-observador. O risco de complicação do procedimento varia de 0,75 a 13,6% (MYERS; FONG; SHAHEEN, 2008; PICCININO, F., SAGINELLI, E.; PASCALE, G.; GIUSTI, AD; POYNARD et al., 2004a; VAN DER POORTEN et al., 2006). A maioria das complicações ocorre nas primeiras horas, sendo a mais comum dor em hipocôndrio direito ou ombro direito. Complicações mais graves, como hemorragia intra-abdominal, hemobilia ou hemotórax, ocorrem em 0,75% dos casos (MYERS; FONG; SHAHEEN, 2008). A mortalidade relacionada ao procedimento é de 0,001 a 0,003%, sendo a

população de maior risco aquela com fibrose avançada ou tumor hepático (PICCININO et al., 1986). O procedimento deve, portanto, ser realizado por profissionais treinados, em centros especializados, e os pacientes devem ser mantidos em observação intra-hospitalar por quatro a seis horas.

A qualidade e a confiabilidade da análise histopatológica dependem da largura e extensão do fragmento, que, idealmente, deve ser obtido com agulha 16 G, ter extensão de 20 a 25 mm e, no mínimo, 11 espaços portais (EP) completos (COLLOREDO et al., 2003). Rockey et al. demonstraram que fragmentos menores que 15 mm falham em diagnosticar cirrose em 20% dos casos (ROCKEY et al., 2009). Entretanto, o tamanho do fragmento suficiente para o estadiamento da fibrose não é consenso. Poynard et al. afirmaram que, na prática, fragmento com extensão superior a 20 mm só é obtido em 14% dos pacientes com HCC (POYNARD et al., 2004b). Além disso, o mesmo autor, estudando 352 pacientes com HCC, demonstrou que fragmento com extensão mínima de 15 mm e contendo mais de 5 espaços portais é adequado para diagnóstico da fibrose significativa (POYNARD et al., 2003)

Mesmo com um bom fragmento hepático, pode haver erro de amostragem, visto que o espécime representa 1/50.000 de todo o fígado. Regev et al. demonstraram discordância de mais de 1 estágio na classificação de fibrose em 33% das biópsias hepáticas de pacientes com HCC, quando os fragmentos foram obtidos dos dois lobos hepáticos simultaneamente (REGEV et al., 2002). A variabilidade intra e inter-observador também pode levar à discrepância de resultados em mais de 20% dos casos, independentemente do calibre da agulha, mesmo quando uma diferença de 1 estágio na classificação da fibrose foi aceita (PETZ et al., 2003). Chindamo et al., estudando 255 biópsias de pacientes brasileiros com HCC, realizadas com agulha de corte *TruCut* 14 ou 16 G e analisadas por quatro patologistas, demonstraram concordância inter-observador no estadiamento da fibrose de 77% quando o fragmento tinha mais de 20 mm e 11 EP e de 40% com fragmentos menores. Demonstraram ainda concordância inter-observador de 42% para F2, 97% para F0-F1 e 72% para  $F \geq 3$ , sugerindo que a biópsia tem limitação intrínseca para diagnosticar fibrose intermediária, mesmo com tamanho ótimo do espécime e experiência do patologista (CHINDAMO et al., 2015).

Além dos aspectos relacionados aos riscos de complicações, erros de amostragem e variabilidade intra e inter-observador, a necessidade de monitoramento da fibrose, após resposta ao tratamento, com avaliações mais frequentes que a permitida pelo método, estimulou o estudo de marcadores indiretos, não invasivos, da fibrose hepática. Os marcadores indiretos de fibrose podem ser sorológicos ou físicos. Um marcador ideal teria como principais características ser hepato-específico, de fácil realização, minimamente alterado pela excreção urinária ou biliar,

reflexivo da fibrose hepática de qualquer etiologia, sensível o suficiente para discriminar os diferentes estágios de fibrose, capaz de correlacionar-se com alterações dinâmicas na progressão ou regressão da fibrose e capaz de prever desfechos clínicos, incluindo disfunção hepática e mortalidade (MANNING; AFDHAL, 2008). Dentre essas características, uma das mais relevantes é a de ser capaz de discriminar fibrose não significativa (F0/F1) de fibrose significativa (F2-F4), para subsidiar a decisão de indicar ou postergar tratamento, e também de discriminar fibrose avançada (F3/F4) de não avançada (F0-F2), identificando os pacientes com necessidade urgente de tratamento e vigilância de complicações da doença hepática crônica, como hipertensão portal e CHC.

Os marcadores sorológicos podem ser diretos ou indiretos. Os marcadores diretos refletem a deposição ou degradação dos componentes da MEC. Os principais marcadores diretos de fibrose são descritos a seguir: (ROSSI et al., 2007)

Ácido Hialurônico (AH)- Mucopolissacarídeo presente em fluido sinovial e tecido hepático, componente da MEC. Sua concentração sérica eleva-se nas doenças hepáticas, como reflexo da maior produção pelas células estreladas e menor depuração pelas células sinusoidais. Tem sido utilizado isoladamente, ou em combinação com outros marcadores, para excluir fibrose significativa.

$\alpha$ -2-Macroglobulina ( $\alpha$ -2-M)- Proteína de alto peso molecular, produzida pela célula estrelada, que inibe a degradação das proteínas da MEC, por ação inibitória nas endoproteases. Sua concentração sérica eleva-se na fibrose hepática.

Marcadores do Colágeno- Grupo que inclui peptídeos pró-colágeno tipo I, II, III e IV, e seus metabólitos, como a laminina. O excesso de deposição de colágeno na MEC é característico da fibrose, elevando a concentração destes marcadores.

Apolipoproteína A1 (Apo A1) - Lipoproteína de alta densidade, cuja concentração sérica relaciona-se inversamente com a fibrose hepática.

Haptoglobina (Hap)- Proteína sérica que se liga à hemoglobina livre, e cuja concentração diminui na hemólise e na fibrose hepática.

MMPs e TIMPs- A concentração das MMPs, enzimas que degradam as proteínas da MEC, encontra-se diminuída na fibrose, enquanto a concentração de seus inibidores, as TIMPs, encontra-se aumentada, favorecendo a deposição de colágeno no fígado.

Uma das principais limitações ao uso desses marcadores é o fato de não estarem disponíveis de maneira rotineira em clínicas e hospitais. Além disso, a maioria não é hepatoespecífica ou é afetada pela inflamação hepática.

Os marcadores sorológicos indiretos incluem aqueles relacionados à atividade inflamatória que acompanha a fibrogênese hepática, como as transaminases, e aqueles que refletem alteração da função hepática, em decorrência da fibrose, como plaquetas e tempo de protrombina (TP). Podem ser usados de forma isolada ou, mais comumente, combinados (escores compostos ou índices). O cálculo destes índices pode ser simples ou baseado em fórmulas complexas. O valor diagnóstico de determinado teste que apresente resultado contínuo é definido pela área sobre a curva de características de operação do receptor (AUROC), variando de 0 a 1, e um ponto de corte é escolhido para definir a melhor relação entre sensibilidade e especificidade do teste. Um teste é considerado não informativo com AUROC = 0,5; pouco acurado com AUROC entre 0,51 e 0,7; moderadamente acurado com AUROC entre 0,71 e 0,9; muito acurado com AUROC entre 0,91 e 0,99 e perfeito com AUROC = 1. Entretanto, como o padrão de referência histopatológico não é perfeito, um teste com AUROC entre 0,85 e 0,9 é considerado tão bom quanto a biópsia para o estadiamento da fibrose (AFDHAL; NUNES, 2004).

O índice APRI, calculado por uma fórmula simples, que inclui aspartato aminotransferase (AST) e plaquetas, é amplamente utilizado na prática clínica por basear-se em parâmetros laboratoriais de fácil obtenção. Inicialmente foi descrito para pacientes com HCC como preditor de fibrose significativa, utilizando-se os pontos de corte  $\leq 0,5$  e  $> 1,5$ , com AUROC de 0,88 e 51% dos pacientes corretamente classificados; e de cirrose, utilizando-se os pontos de corte  $\leq 1,0$  e  $> 2,0$ , com AUROC de 0,94 e 81% dos pacientes corretamente classificados (WAI et al., 2003). Ressalta-se que 49% dos pacientes apresentaram valores intermediários do APRI para predição de FS (valores entre 0,6 e 1,5), a chamada zona cinza, quando não é possível descartar ou confirmar a FS. Em metanálise posterior, que incluiu 4266 pacientes, o índice mostrou maior acurácia como preditor de ausência de fibrose significativa, para valores  $< 0,5$ , e de ausência de cirrose, para valores  $< 2,0$  (AUROC 0,76 e 0,82, respectivamente). Porém, utilizando-se o ponto de corte  $< 0,5$  como preditor de ausência de fibrose hepática significativa, apenas 1/3 das biópsias seria evitada, visto que, nos 16 estudos incluídos, só 35% dos pacientes preenchem este critério. (SHAHEEN, 2007).

O índice FIB4, que utiliza plaquetas, alanina aminotransferase (ALT), AST e idade, tem seu uso amplamente difundido na prática clínica, por também tratar-se de índice baseado em parâmetros clínicos e laboratoriais facilmente obtidos. Foi inicialmente descrito para pacientes com coinfeção HCV/HIV como preditor de fibrose hepática avançada, utilizando os pontos de corte  $\leq 1,45$  e  $> 3,25$ , com AUROC de 0,76 e 30% dos pacientes na zona cinza. Dos 70% dos pacientes com valores abaixo do ponto de corte inferior ou acima do ponto de corte superior,

86% foram corretamente classificados. Considerando-se, portanto, os pacientes não classificados (na zona cinza) e os pacientes incorretamente classificados, a utilização do FIB-4 para predição de FA evitaria a biópsia hepática em cerca de 60% dos pacientes (STERLING et al., 2006). Em metanálise posterior, o FIB-4 apresentou AUROC de 0,85 para FA em pacientes monoinfectados pelo HCV. Os autores demonstraram valor preditivo do índice para excluir FA de 94,7%, com sensibilidade de 74,3% para valores  $\leq 1,45$ , e valor preditivo para confirmar FA de 82,1%, com especificidade de 98,2% para valores  $> 3,25$ . Porém, 27% dos pacientes apresentaram valores intermediários (zona cinza), não sendo possível, nestes casos, excluir ou confirmar FA. Dos 73% dos pacientes com valores abaixo do ponto de corte inferior ou acima do ponto de corte superior, 93% foram corretamente classificados. Portanto, considerando-se os pacientes com valores não classificados ou incorretamente classificados, a biópsia teria sido evitada em 63% dos pacientes (VALLET-PICHARD et al., 2007).

O índice FibroTest® utiliza Apo A1, Hap,  $\alpha$ -2-M, gama-glutamil transpeptidase (GGT) e bilirrubina, além da idade e sexo do paciente. Uma revisão sistemática, que incluiu nove estudos e 1679 pacientes, demonstrou que para o diagnóstico da fibrose significativa e da cirrose, em pacientes com hepatite C, a AUROC variou de 0,66 a 0,86, e de 0,72 a 1,00, respectivamente. Os estudos com maior prevalência de fibrose significativa e cirrose reportaram melhor performance do teste. Além disso, para valores abaixo do ponto de corte inferior, fibrose significativa é eficazmente excluída, porém para valores intermediários, entre os pontos de corte inferior e superior, presentes em cerca de metade dos pacientes, a sobreposição entre os estágios da fibrose limita a utilização deste teste. (SHAHEEN; WAN; MYERS, 2007). Outros índices, como o Fibrospect®, que usa  $\alpha$ -2-M, HA e TMP; o Hepascore®, que utiliza bilirrubina, GGT,  $\alpha$ -2-M e HA; e o Fibrometer®, que utiliza plaquetas, TP, AST,  $\alpha$ -2-M, HA e uréia, também têm sido utilizados, porém, por serem testes patenteados e de custo elevado, não estão amplamente disponíveis na prática clínica. Os índices sorológicos disponíveis para predição de fibrose em pacientes com HCC são mostrados no Quadro 1.

Quadro 1-Índices sorológicos para avaliação indireta da presença de fibrose ou cirrose em pacientes com infecção pelo vírus da hepatite C

Índice	Itens (n)	Idade	Plaqueta	AST	ALT	Outros componentes
Índice idade-plaqueta	2	✓	✓			-
APRI	2		✓	✓		-
Razão AST-ALT	2			✓	✓	-
Escore discriminante de cirrose (índice Bonacini)	6		✓	✓	✓	Índice de protrombina, presença de ascite, e presença de aranha vascular
Índice ELF e ELF simplificado*	3 ou 4	✓†				Ácido hialurônico, propeptídeo N-terminal do colágeno tipo II e níveis de TIMP-1
FIB-4	4	✓	✓	✓	✓	-
Escore fibro- $\alpha$	4		✓	✓	✓	Nível de $\alpha$ -fetoproteína
FibroIndex	3		✓	✓		Nível de $\gamma$ -globulina
Fibrometer*	8	✓	✓	✓		Sexo, nível de $\alpha$ 2-macroglobulina, tempo de protrombina, níveis de GGT e ureia
Escore discriminante de fibronectina	4		✓	✓		Níveis de albumina e fibronectina
FibroQ	5	✓	✓	✓	✓	Índice de protrombina
Índice fibrose-cirrose	4		✓			Níveis de fosfatase alcalina, bilirrubina e albumina
Índice de fibrose	2		✓			Nível de albumina
Índice de probabilidade de fibrose (índice Sud)	5	✓		✓		Nível de colesterol total, resistência à insulina e ingestão de álcool
Índice fibrose-proteína	2					Níveis de $\alpha$ 2-macroglobulina e hemopexina
Teste de rotina de fibrose	5	✓	✓	✓		Níveis de $\alpha$ -Fetoproteína e albumina
FIBROSpect II*	3					Níveis de TIMP-1, $\alpha$ 2-macroglobulina, e ácido hialurônico
FibroTest (FibroSure)*	7	✓				Níveis de $\alpha$ 2-macroglobulina, haptoglobina, apolipoproteína A-I, GGT, bilirrubina total ( $\gamma$ -globulina na versão original), e sexo
Índice Forns	4	✓	✓			GGT e níveis de colesterol
Razão globulina-albumina	2					Níveis de globulina e albumina
GUCI	3		✓	✓		Índice de protrombina
Modelo HALT-C model	3		✓			Níveis de TIMP-1 e ácido hialurônico
Hepascore*	6	✓				Níveis de $\alpha$ 2-macroglobulina, ácido hialurônico, GGT, bilirrubina total, e sexo
Escore de King	4	✓	✓	✓		INR
Índice Lok	4		✓	✓	✓	INR
Escore MP3	2					Níveis de MMP-1 e PIIP
Índice Pohl	3		✓	✓	✓	-
Índice Sabadell NIHCED	8	✓	✓	✓	✓	Tempo de protrombina, atrofia do lobo hepático direito, esplenomegalia, e hipertrofia do lobo caudado
Índice de fibrose significativa	5					Níveis de haptoglobina, $\alpha$ 2-macroglobulina, TIMP-1, MMP-2, e GGT
Índice Zeng	4	✓				Níveis de $\alpha$ 2-macroglobulina, GGT, e ácido hialurônico

Fonte: (CHOU, ROGER; NGOC, 2013)

Legenda: ALT: alanina aminotransferase; APRI: índice da relação aspartato aminotransferase sobre plaquetas; AST: aspartato aminotransferase; ELF: teste de fibrose hepática melhorada; FIB-4: índice de fibrose baseado em quatro fatores; GGT:  $\gamma$ -glutamil transferase; GUCI: Índice de cirrose da universidade de Göteborg; HALT-C: Tratamento antiviral da hepatite C a longo prazo contra cirrose; INR: razão normalizada internacional; MMP-1: metaloproteinase de matriz 1; MMP-2: metaloproteinase de matriz 2; NIHCED: detecção precoce não invasiva da cirrose relacionada à hepatite C; PIIP: propeptídeo do pro-colágeno tipo III; TIMP-1: inibidor tecidual de metaloproteinase 1. \*Patenteado e disponível comercialmente como um painel de testes. A  $\gamma$ -glutamil transferase substituiu o ácido hialurônico no Fibrometer de terceira geração. †Removido no índice ELF simplificado.

Uma das principais limitações dos marcadores sorológicos é que nenhum deles é fibrose-específico, podendo refletir também atividade necro-inflamória hepática (DUFOR, 2005). Além disso, eles mostraram melhor resultado na identificação de pacientes nos dois extremos da evolução da fibrose, ou seja, pacientes com pouca ou nenhuma fibrose e pacientes com estágio avançado de fibrose, porém, sua acurácia para identificar pacientes com fibrose intermediária é pequena. (BISSELL, 2004). Quando comparados, dez painéis de marcadores sorológicos foram capazes de afastar ou confirmar fibrose significativa em apenas 35% dos pacientes com HCC (PARKES et al., 2006). Os índices Fibrometer®, Fibrotest®, Hepascore® e APRI demonstram acurácia moderada para o diagnóstico da fibrose significativa (AUROC de 0,72 e 0,79) e acurácia de moderada a boa para o diagnóstico da cirrose (AUROC 0,77 a 0,86) (DEGOS et al., 2010).

Dentre os marcadores físicos de fibrose hepática, destaca-se a elastografia transitória (ET), que utiliza uma sonda, posicionada na pele do paciente, que produz vibrações de leve amplitude e baixa frequência, e um aparelho de US unidimensional, que mede a velocidade propagação da onda de cisalhamento, produzida pelo estímulo mecânico, no parênquima hepático (SANDRIN et al., 2002). A velocidade da onda que penetra o tecido hepático depende da elasticidade do tecido, sendo tão mais rápida quanto maior a rigidez hepática, e correlaciona-se com o estágio de fibrose. O Fibroscan® (Echosens, França) converte a velocidade de onda em elastometria, que varia de 2 a 75 KPa, em uma região de interesse (ROI) de tecido hepático correspondente a um cilindro com 1 cm de espessura e 2 cm de profundidade, tamanho 100 vezes superior ao do fragmento retirado por biópsia.

Em 2003, O método foi testado em 106 pacientes com HCC e mostrou melhor acurácia para predição de cirrose (AUROC de 0,99 para cirrose e 0,88 para fibrose significativa) (SANDRIN et al., 2003). Meta-análise posterior envolvendo 40 estudos de pacientes com doença hepática de diversas etiologias, demonstrou sensibilidade e especificidade de 79% e 78% para fibrose significativa e 83% e 89% para cirrose, porém houve grande variabilidade e sobreposição dos *cut-offs* dentro e entre diferentes estágios de fibrose (TSOCHATZIS et al., 2011). A maior acurácia de ET para o diagnóstico da cirrose, quando comparada à outros métodos não invasivos, foi comprovada por Castera et al., que compararam o Fibroscan® com Fibrotest® e APRI, para predição de cirrose em 183 pacientes com HCC, e encontraram AUROC de 0,95, 0,87 e 0,83, respectivamente (CASTERA et al., 2005).

A realização da ET, porém, pode ser dificultada em pacientes com elevado índice da massa corporal (IMC), esteatose hepática ou naqueles com espaços intercostais muito estreitos.

Além disso, a presença de hepatite aguda, hepatite crônica agudizada ou colestase importante, podem superestimar a fibrose pelo método (ARENA et al., 2008; MILLONIG et al., 2008).

A elastografia por *Acoustic Radiation Force Impulse* (ARFI) utiliza pulsos acústicos de 2,6 MHz, que geram onda de cisalhamento no tecido hepático. Essa velocidade de onda é monitorada por aquisição de US bidirecional e medida em m/s em um ROI de 0,5 x 1,0 cm. Apesar do ROI ser menor que na ET, o fato do ARFI estar acoplado à US bidimensional, permite que o operador escolha a região de interesse, evitando área subcapsular ou com grandes vasos. Outra vantagem em relação à ET seria a maior aplicabilidade, podendo ser realizado em pacientes obesos e com ascite, apesar de menor reprodutividade intra e inter-observador ser descrita em pacientes com sobrepeso e ascite, assim como em não cirróticos e mulheres (BOTA et al., 2012).

Metanálise com 518 pacientes, sendo 380 com HCC, mostrou boa acurácia do método para predição de FS, FA e cirrose, com AUROC de 0,97, 0,91 e 0,93, respectivamente (FRIEDRICH-RUST et al., 2012). Estudo multicêntrico, com 914 pacientes europeus e asiáticos com HCC e biópsia hepática, mostrou 99,6% de exames válidos, alto coeficiente de correlação do ARFI com o estágio de fibrose pela biópsia, e acurácia crescente do método com o estágio de fibrose (*cut-offs*  $\geq$  F1: 1,19 m/s (AUROC 0,78);  $\geq$  F2: 1,33 m/s (AUROC 0,79);  $\geq$  F3: 1,43 m/s (AUROC 0,83) e F4: 1,55 m/s (AUROC 0,84) (SPOREA et al., 2012). Metanálise com 13 estudos e 1163 pacientes com biópsia por hepatopatia de várias etiologias, incluindo hepatites virais crônicas B e C e doença hepática gordurosa não-alcoólica, comparou ARFI e ET e mostrou acurácia similar dos dois métodos para predição de fibrose significativa e cirrose (AUROC 0,85 x 0,87 para FS, e AUROC 0,93 x 0,93 para C), com maior percentual de exames válidos para o ARFI (97,9% x 93,4%) (BOTA et al., 2013).

Mais recentemente, a *Shear Wave Elastography* (SWE) e a elastografia por RMN de imagem do fígado têm sido estudadas. A SWE utiliza o mesmo princípio do ARFI, porém o transdutor emite múltiplos impulsos que permitem a avaliação da onda de cisalhamento em várias frentes ao mesmo tempo, gerando um mapeamento de cor em tempo real da elasticidade de tecido hepático. Já a elastografia por RMN é fundamentada na absorção e emissão de energia eletromagnética pelos prótons submetidos a um campo magnético após estímulo eletromecânico. A velocidade de onda (RF) é convertida em elastometria (KPa), gerando um mapa de cor de todo o órgão.

A SWE foi comparada à elastografia por RMN em 50 pacientes americanos (21 com HCC) e mostrou boa correlação com a RMN ( $R^2=0,86$ ), e AUROC para fibrose mínima de 0,89 e para fibrose avançada de 0,96. (ZHAO et al., 2014). Estudo francês com 349 pacientes com

biópsia (79 pacientes com HCC) comparou SWE, ARFI e TE, e demonstrou que os três métodos se correlacionaram com o estágio de fibrose histopatológico. Além disso, a SWE apresentou maior acurácia que a ET para FA (AUROC 0,93 x 0,87) e maior acurácia que o ARFI para FS (AUROC 0,88 x 0,81) (CASSINOTTO et al., 2014). Estudo prospectivo francês com 96 pacientes com biópsia, sendo 65 com HCC, comparou elastografia por RMN com ET e APRI e mostrou maior taxa de sucesso da elastografia por RMN em relação à ET (94% x 84%), com *cut-off* discriminantes para fibrose  $\geq F1= 1,25$  KPa;  $\geq F2= 2,4$  KPa;  $\geq F3= 3,1$  KPa e  $F4= 4,1$  KPa. A comparação dos três métodos mostrou superioridade da elastografia por RMN em relação à ET e APRI, isoladamente ou em associação, com AUROC para FS, FA e C > 0,98 (HUWART et al., 2008).

Apesar de parecer ser o mais acurado dos métodos físicos não invasivos de avaliação de fibrose, a elastografia por RMN tem importantes limitações, que dificultam a aplicabilidade em larga escala, por se tratar se exame de custo elevado. Além disso, a presença, em alguns pacientes, de claustrofobia, obesidade que impeça a acomodação na máquina ou sobrecarga hepática de ferro também limitam a realização do exame. Avaliação comparativa dos métodos físicos mostra que, de uma maneira geral, todos têm alto desempenho para o diagnóstico da FA e cirrose, além de boa reprodutibilidade e aplicabilidade, porém a ET é a mais validada e mostra valor prognóstico na cirrose, faltando ainda estudos de validação robustos para o ARFI, SWE e elastografia por RMN (BERZIGOTTI; CASTERA, 2013).

Até o presente momento, nenhum marcador indireto de fibrose hepática, sorológico ou físico, comprovou ser capaz de substituir a biópsia hepática como padrão de referência. A fim de superar as limitações de cada método, a estratégia proposta por muitos pesquisadores é a de combinar testes não invasivos, avaliando a concordância entre eles e utilizando a biópsia nos casos de dúvida.

Leroy et al. propuseram a realização simultânea de dois testes sorológicos, Fibrotest® e APRI, com a realização de biópsia em casos discordância, porém apenas 33,2% dos pacientes poderiam dispensar a biópsia por este algoritmo (LEROY et al., 2007). No algoritmo sequencial *SAFE-biopsy*, Sebastiani propôs a realização do APRI, inicialmente, e a realização sequencial do Fibrotest® nos casos não classificados pelo APRI. A biópsia estaria reservada para os pacientes com valores do Fibrotest®  $\leq 0,48$ . Este algoritmo evitaria a biópsia em 48,3% dos pacientes com FS e 79,1% dos pacientes com cirrose (SEBASTIANI, 2009). Já no algoritmo Bourdoux, Castera et al. propuseram a realização de Fibroscan® e Fibrotest® simultaneamente, com a biópsia sendo realizada nos casos de discordância nos resultados ou nos casos de impossibilidade de determinação da ET. Neste algoritmo a biópsia seria evitada em 65% dos

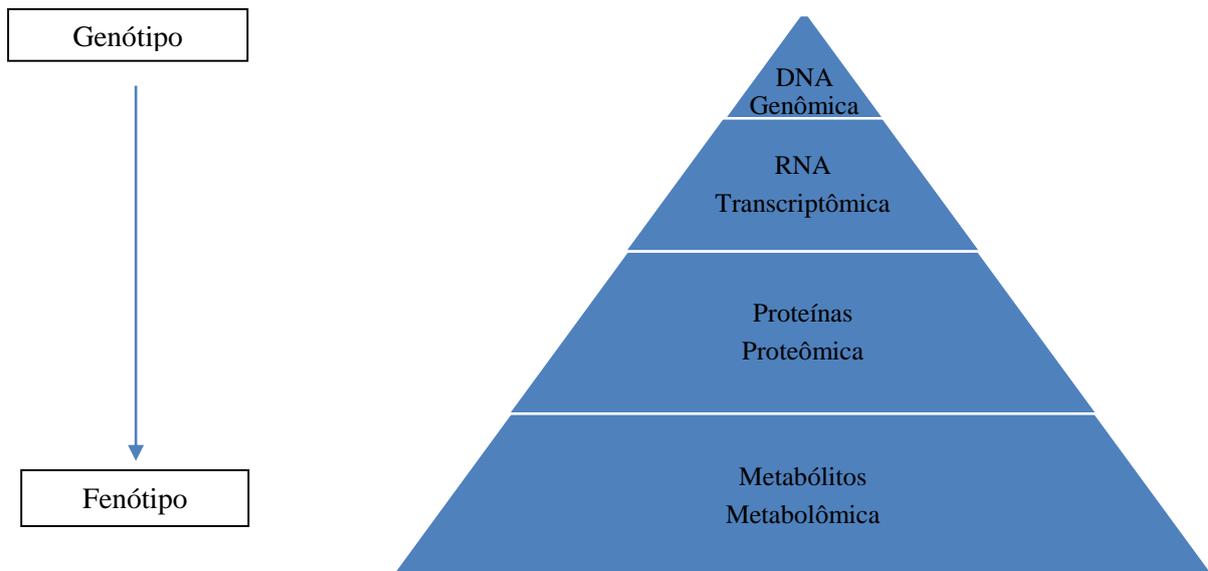
pacientes com FS e em 74% dos pacientes com cirrose. (CASTERA et al., 2005). Por fim, Boursier et al. propuseram o algoritmo Febrometer® + Fibroscan® (FM + FS), a partir de 2 índices de fibrose, combinando os 2 métodos por regressão logística (índice de FS e índice de FA). Os intervalos entre os esses dois índices foi então determinado, levando à classificação de fibrose em 6 estágios. Essa nova classificação mostrou acurácia de 86,7% e, utilizando esse algoritmo, a biópsia seria evitada em 100% dos pacientes com FS e FA (BOURSIER et al., 2012).

Conclui-se que os algoritmos variam muito em desempenho e alguns utilizam exames de custo elevado e nem sempre disponíveis de forma rotineira, especialmente nos serviços públicos de saúde. No Brasil, Schiavon, Narciso-Schiavon e de Carvalho-Filho propuseram um algoritmo que sugere a realização de um teste sorológico de fácil realização, APRI ou FIB-4, associado a um método físico, com a realização da biópsia em caso de discordância dos resultados (SCHIAVON; NARCISO-SCHIAVON; DE CARVALHO-FILHO, 2014).

### 2.3 Metaboloma, Metabonômica e Metabolômica

O termo metaboloma é definido como o conjunto completo de compostos de baixo peso molecular, os metabólitos, presentes em uma célula e que são necessários para sua manutenção, crescimento e função. A metabolômica é uma técnica “ômica”, baseada no metaboloma, situada abaixo da genômica, transcriptômica e proteômica ( Figura 3).

Figura 3- Técnicas "ômicas"



Fonte: (AMATHIEU et al., 2016)

Nota: Representação esquemática do sistema biológico: cada nível funcional a partir do DNA, RNA, proteínas e metabólitos, que constituem respectivamente o genoma, o transcriptoma, o proteoma e o metaboloma, tem um fluxo bidirecional de informações e interações complexas em conjunto e com o meio ambiente (doenças, drogas, estilo de vida, gênero, hábito, dieta, etc.). Essas interações produzem o fenótipo, que representa o resultado final do sistema, medido na metabolômica.

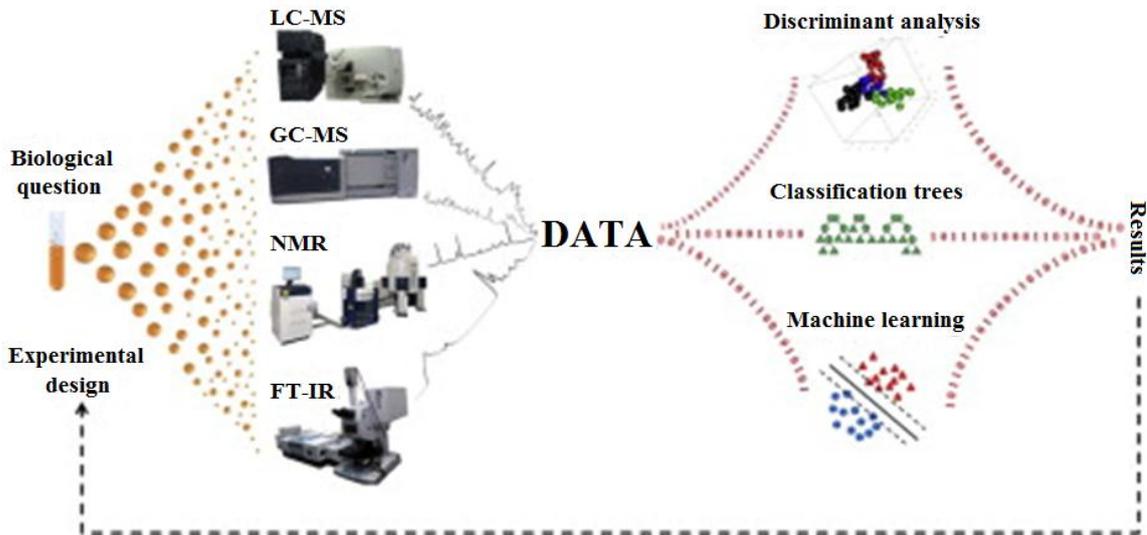
Como os metabólitos são produtos finais da transcrição e tradução de genes, em comparação com a genômica e proteômica, as abordagens por metabolômica podem fornecer uma imagem mais clara do fenótipo de um sistema biológico (FIEHN, 2002).

Os estudos envolvendo metabólitos são realizados através das estratégias metabolômica e metabonômica. O estudo do conteúdo metabólico de uma amostra é chamado metabolômica, enquanto a análise das alterações dinâmicas dos níveis de metabólitos em resposta à um estímulo é chamado metabonômica. Apesar das palavras metabolômica e metabonômica serem frequentemente utilizadas como sinônimos, a metabonômica dedica-se à análise das alterações dinâmicas dos níveis de metabólicos, em resposta à uma perturbação da homeostase, enquanto a metabolômica procura identificar e quantificar os metabólitos intracelulares envolvidos nessa resposta.

Um típico estudo de metabólitos começa com uma questão biológica que, em estudos clínicos, por exemplo, geralmente abrange dois grupos de indivíduos, frequentemente designados por casos e controles. A análise dos metabólicos inclui a coleta do biofluido ou tecido, conservação da amostra, preparação da amostra, aquisição do sinal, análise e processamento dos dados. Esse desenho experimental é seguido pela seleção e emprego de

técnicas apropriadas para extrair informações úteis das amostras, e inúmeras técnicas estatísticas podem ser utilizadas (Figura 4) (GROMSKI et al., 2015).

Figura 4- Representação gráfica das diferentes abordagens analíticas e técnicas de informática empregadas em estudos de metabolômica e metabonômica.



Fonte: (GROMSKI et al., 2015)

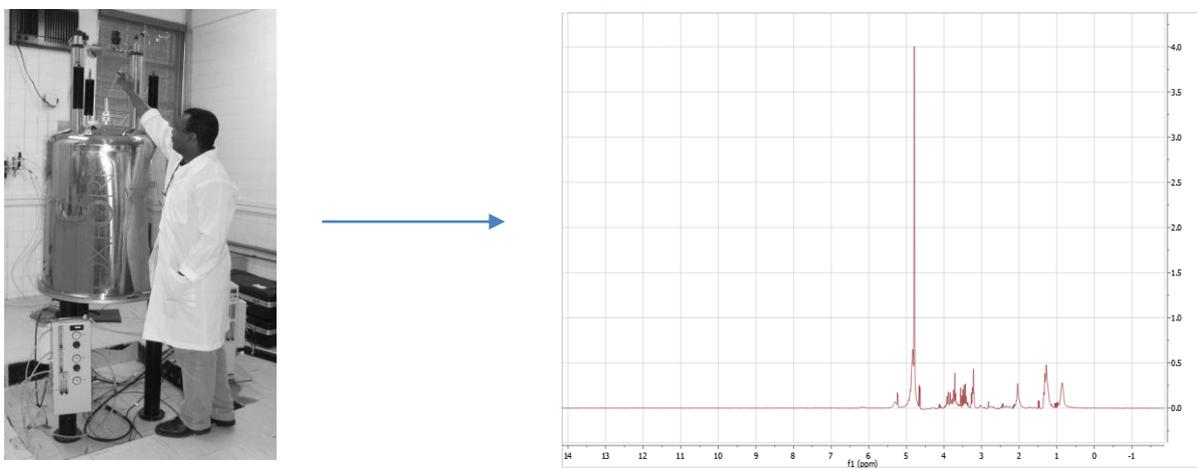
Nota: Um desenho experimental padrão inclui a preparação de amostras e aquisição de dados usando, por exemplo, LC-MS, GC-MS, RMN ou FT-IR. Uma vez gerados os dados, vários tipos de algoritmos estatísticos univariados (não descritos aqui) e multivariados, tais como: análise discriminante, árvores de classificação e aprendizado mecânico podem ser aplicados para reduzir dimensionalidade dos dados e facilitar a interpretação biológica. Legenda: LC-MS: espectrometria de massa por cromatografia líquida; GC-MS: espectrometria de massa por cromatografia gasosa; NMR: ressonância magnética nuclear; FT-IR: espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

A metabonômica, que será a estratégia utilizada neste estudo, pode ser definida como um método de detecção, identificação, quantificação e classificação da resposta metabólica de um sistema vivo a um estímulo patofisiológico ou modificação genética, tempo-relacionada (NICHOLSON; LINDON, 2008; NICHOLSON; LINDON; HOLMES, 1999). As doenças, drogas ou toxinas causam perturbação na concentração e fluxo dos metabólitos endógenos envolvidos nas principais vias celulares. Esta perturbação leva a mecanismos de ajuste no ambiente intra e extracelular, na busca da homeostase. Esses ajustes são expressos como uma impressão digital da perturbação bioquímica (LINDON, J.C.; HOLMES, E.; NICHOLSON, 2003).

As alterações bioquímicas de um organismo, causadas por um estímulo, podem ser medidas em biofluidos, geralmente soro ou urina, ou tecidos, através da análise espectroscópica dos mesmos. Vários métodos espectroscópicos podem ser usados para gerar um conjunto de dados metabólicos de uma amostra biológica, porém a espectroscopia de RMN H1 é a mais utilizada, já que todos os metabólitos orgânicos contêm átomos de hidrogênio.

A espectroscopia de biofluido por RMN utiliza o mesmo princípio da obtenção de imagem por RMN, e é baseado nas propriedades do spin nuclear e do momento magnético nuclear do isótopo. No caso do hidrogênio, por exemplo, o spin representa o movimento de giro do próton em torno de seu próprio eixo. Além disso, o núcleo atômico funciona como um pequeno magneto, que, uma vez exposto a um campo magnético externo forte e homogêneo, tem seus spins posicionados de forma paralela ao campo (estado basal ou de menor energia) ou antiparalela ao campo (estado excitado ou de maior energia). Essa orientação dipolo do spin é o momento magnético. Quando um pulso temporário de radiofrequência (RF) é aplicado ao isótopo, ocorre movimento do spin do seu nível de menor energia para o nível de maior energia. Uma vez que esse pulso de RF é retirado, o núcleo tende a voltar do estado excitado para o estado basal, liberando energia, também na forma de RF, que é registrada como um espectro (Figura 5).

Figura 5- Espectroscopia de RMN H1 de amostra de soro de paciente com HCC.



Fonte: Autora

Legenda: (A) Inserção da amostra de soro no espectrômetro. (B) Espectro de RMN- registro gráfico dos deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio dos metabólitos da amostra.

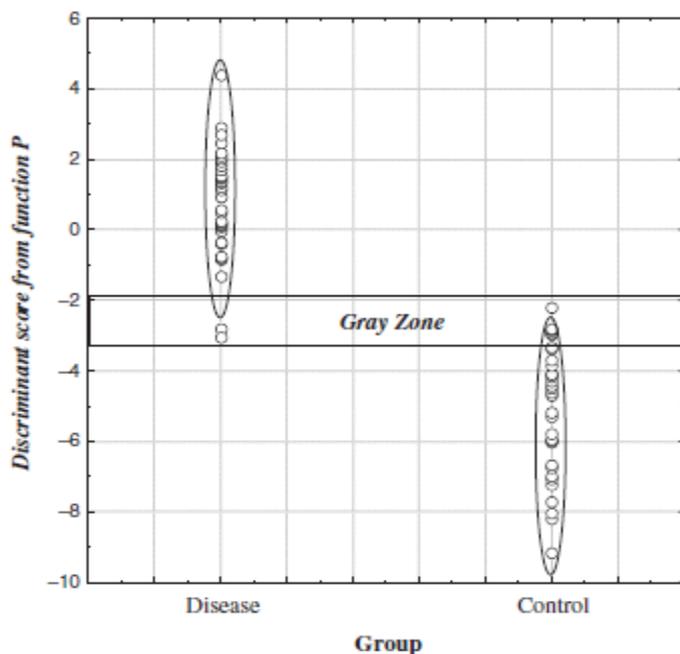
Normalmente, os espectros de RMN H1 de biofluidos contêm milhares de sinais, provenientes de centenas de moléculas endógenas, que representam muitas vias bioquímicas. Cada metabólito pode emitir um ou mais sinais, e a intensidade do sinal está relacionada com a concentração deste metabólito na amostra.

A base de dados do metaboloma humano contém 42.003 entradas de metabólitos, incluindo metabólitos solúveis em água e solúveis em lipídios, bem como metabólitos que seriam considerados abundantes ( $> 1 \mu\text{M}$ ) ou relativamente raros ( $< 1 \text{ nM}$ ) (THE METABOLOMICS INNOVATION CENTRE, 2017). Devido à complexidade do metaboloma, a análise de uma ampla gama de metabólitos requer a utilização de múltiplos protocolos e instrumentos analíticos. Para facilitar a interpretação dos resultados, geralmente é necessário o uso de redução de variáveis, por técnicas de reconhecimento de padrões, que são abordagens estatísticas multivariadas aplicadas à dados químicos numéricos, usadas para diminuir a dimensionalidade de um conjunto de dados complexos (LINDON; HOLMES; NICHOLSON, 2001).

Os métodos de reconhecimento de padrões podem ser não supervisionados e supervisionados. Os não supervisionados compreendem aqueles que são usados para determinar se qualquer agrupamento intrínseco existe dentro um conjunto de dados, sem o conhecimento prévio dos componentes destes agrupamentos. Um exemplo é a PCA, método estatístico que utiliza transformação ortogonal para converter um conjunto de variáveis possivelmente correlacionadas em um conjunto de variáveis linearmente não correlacionadas, os componentes principais (PCs). Cada PC é uma combinação linear das variáveis originais e explica parte da variância dos dados. A representação gráfica desse método é a projeção de cada amostra nas PCs. Pode-se obter gráfico em 2 dimensões (2 PCs representadas) e 3 dimensões (3 PCs representadas).

Os métodos supervisionados utilizam informações prévias de um conjunto de dados da amostra para otimizar a separação entre duas ou mais classes. Um exemplo é a LDA (Figura 6). Essa técnica utiliza a informação de classe para extrair as características mais discriminantes das amostras, através da combinação linear das variáveis (função discriminante linear). O objetivo é maximizar as diferenças inter-classe e minimizar as diferenças intra-classe. Dois grupos de amostras são necessários. O primeiro grupo, chamado grupo de treinamento, cuja informação de classe é conhecida, é utilizado para criar um modelo, a ser testado em um segundo grupo, chamado grupo teste ou validação, cuja informação de classe é desconhecida.

Figura 6 - Classificação de amostras de urina baseada em escores obtidos através de modelos metabonômicos de espectros de RMN H1 por LDA de 34 pacientes com infecção pelo HCV (doença) e 32 indivíduos controles.



Fonte: GODOY 2010.

Outra técnica quimiométrica supervisionada é a PLS-DA, que utiliza a ligação de duas matrizes de dados, X (dados brutos) e Y (associação de classes), para otimizar a separação entre diferentes grupos de amostras. O método visa maximizar a covariância entre as variáveis independentes X (dados de espectroscopia) e a variável dependente Y (classes que se pretende prever) de um conjunto de dados multidimensional, encontrando um subespaço linear das variáveis explicativas. Este novo subespaço permite a predição da variável Y com base em um número reduzido de fatores, os componentes latentes (CLs). Cada CL é uma regressão linear das variáveis originais. Por exemplo, se considerarmos a divisão de amostras em diferentes classes, como em um estudo caso-controle, então a variável Y será composta por um único vetor que terá uma entrada 0 para todas as amostras na primeira classe e uma entrada 1 para todas as amostras na segunda classe. Esse formalismo fornece uma interpretação visual de conjuntos de dados complexos através de um gráfico de fácil interpretação, que ilustra a separação entre diferentes grupos. Além disso, várias estatísticas, tais como a determinação da importância da variável na projeção (VIP) e o coeficiente de regressão ( $R^2$ ) e de correlação ( $Q^2$ ), podem ser usadas para identificar as variáveis mais importantes para o modelo (GROMSKI et al., 2015)

Estudos clínicos com o uso da metabonômica e metabolômica têm demonstrado utilidade na avaliação do efeito de várias toxinas no fígado, rins, testículos, coração e sistema nervoso, no diagnóstico de erros inatos do metabolismo, neoplasias, diabetes, doenças cardiovasculares, urinárias, gastro-intestinais, neurológicas e infecciosas, utilizando espectrometria de massa e cromatografia ou espectroscopia por RMN H1 de biofluido (BUZATTO et al., 2014; EMWAS et al., 2013).

A técnica tem se mostrado promissora também na avaliação das doenças hepato-biliares. (AMATHIEU, 2016; BEYOĞLU; IDLE, 2013; PATEL et al., 2012). Em estudo clínico com pacientes infectados cronicamente pelo HBV, o modelo metabonômico, gerado a partir da análise de soro por cromatografia líquida/ espectrometria de massa, mostrou sensibilidade e especificidade de 100% e 94,3% no diagnóstico da insuficiência hepática (ZHANG et al., 2010). Em nosso meio, Godoy et al., utilizando espectroscopia por RMN H1 de urina de pacientes infectados pelo HCV e posterior análise estatística por PCA e LDA, demonstraram sensibilidade de 94% e especificidade de 97% do modelo metabonômico para o diagnóstico da infecção, com valor preditivo positivo de 97% e valor preditivo negativo de 94% (GODOY et al., 2010).

Espectroscopia de urina por RMN H1 e posterior análise estatística multivariada foi capaz de distinguir pacientes portadores de CHC de indivíduos saudáveis e daqueles com cirrose hepática em população egípcia, que apresenta a mais alta prevalência de hepatite C no mundo, segundo a OMS, com sensibilidade e especificidade de 100% e 94% e 81% e 71%, respectivamente. O mesmo grupo, utilizando o mesmo desenho de estudo em população nigeriana, região com prevalência do HBsAg de 8 a 20%, demonstrou sensibilidade e especificidade do método de 100% e 93% e 89,5% e 88,9%, respectivamente (SHARIFF et al., 2010, 2011).

Análise multivariada de espectro de soro por RMN H1 foi capaz de diferenciar pacientes com cirrose de pacientes com CHC e de indivíduos saudáveis em uma população chinesa (GAO et al., 2009). Outro estudo chinês demonstrou que o modelo metabonômico, gerado a partir da análise espectral de soro de pacientes infectados pelo HBV, foi capaz de diferenciar pacientes com cirrose compensada de pacientes com cirrose descompensada com acurácia de 85% (QI et al., 2012). Análise metabonômica por RMN H1 de soro de controles e de pacientes cirróticos com e sem encefalopatia hepática mínima diferenciou pacientes cirróticos dos controles e discriminou pacientes com encefalopatia, sugerindo que o método pode contribuir para o difícil diagnóstico desta complicação neurológica da cirrose hepática. (JIMÉNEZ et al., 2010).

Beyoglu e Idle, revisando as publicações de metabonômica e metabolômica em cirrose, chamaram a atenção para um fenótipo metabólico de cirrose de qualquer etiologia, caracterizado por diminuição da concentração sérica das lisofosfatidilcolinas e aumento de ácidos biliares. Em pacientes cirróticos há também um aumento da concentração sérica de aminoácidos não essenciais e certos D-aminoácidos e diminuição da concentração sérica de aminoácidos essenciais, sugerindo que o fígado cirrótico tem inabilidade de metabolizar tanto proteína como aminoácidos essenciais (BEYOĞLU; IDLE, 2013).

Sendo a espectroscopia de amostra de soro por RMN H1 representativa do estado metabólico do organismo, fornecendo uma “impressão digital” metabólica específica da natureza da agressão ou processo patológico, diferentes estágios da evolução da fibrose hepática, decorrentes da infecção crônica pelo HCV, determinariam diferentes perfis metabólicos, que poderiam ser utilizados como marcadores evolutivos da doença hepática.

Considerando-se que a correta classificação do estágio de fibrose em pacientes com HCC é de fundamental importância no manejo clínico desses pacientes; que a biópsia, padrão de referência, é invasiva e imperfeita; que os marcadores indiretos de fibrose ainda não se mostraram capazes de substituir a biópsia, por apresentarem limitação para diagnosticar estágios intermediários de fibrose hepática e apresentam zona cinza que impede a classificação da fibrose em até 50% dos pacientes; e considerando-se ainda que a metabonômica tem mostrado utilidade no diagnóstico de doenças hepáticas e da cirrose e suas complicações, decidiu-se realizar um estudo visando a construção e a validação de modelos metabonômicos, a partir da espectroscopia por RMN H1 de soro, capazes de diferenciar fibrose hepática significativa, fibrose avançada e cirrose em pacientes com HCC de duas regiões geográficas distintas do país, e comparar o desempenho dos modelos com o dos índices APRI e FIB-4, avaliando a redução do número de pacientes na zona cinza destes índices e consequente diminuição do número de biópsias.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

Desenvolver modelos metabonômicos (MMs), a partir de dados espectrais de RMN H1 de amostras de soro, para predição de fibrose hepática significativa, fibrose hepática avançada e cirrose, em pacientes com HCC, tendo a análise histopatológica do tecido hepático como padrão de referência, e comparar o desempenho dos MMs com o dos índices APRI e FIB-4.

#### 3.2 Específicos

- 1- Desenvolver modelos MMs para predição de fibrose significativa, fibrose avançada e cirrose, utilizando análise quimiométrica, a partir de dados espectrais obtidos por RMN H1 de amostras de soro, em pacientes com HCC de Recife/PE e do Rio de Janeiro/RJ.
- 2- Verificar a associação entre os MMs desenvolvidos e os estágios de fibrose hepática significativa, avançada e cirrose, determinadas pela análise histopatológica de fragmento hepático (padrão de referência) e estimar sensibilidade (S), especificidade (E), razão de verossimilhança positiva (RVP), razão de verossimilhança negativa (RVN) e acurácia (A) dos MM desenvolvidos para predição de fibrose hepática significativa, fibrose avançada e cirrose.
- 3- Determinar os valores dos índices APRI e FIB-4 nos mesmos pacientes e comparar o desempenho desses índices com o dos MMs desenvolvidos.
- 4- Comparar as características sociodemográficas e laboratoriais dos pacientes, de acordo com o estágio de fibrose hepática, por METAVIR.

## CASUÍSTICA E MÉTODOS

### 4.1 Desenho do estudo

Trata-se de estudo transversal, prospectivo, do tipo validação de teste diagnóstico fase II (SACKETT, 2002). Nesse tipo de estudo, o pesquisador tenta responder se pacientes com determinados resultados do teste são mais propensos a ter o distúrbio alvo do que os pacientes com outros resultados do teste. No estudo em questão, tenta-se responder se os pacientes com teste positivo pelo MM para predição de FS, por exemplo, são mais propensos a apresentarem FS pela biópsia hepática, padrão de referência. Desta forma, esse tipo de estudo nos diz se o teste mostra-se promissor como diagnóstico de determinado distúrbio alvo, em condições ideais (SACKETT, 2002).

Em um primeiro momento, foram criados MMs para predição de FS, FA e C, por técnica supervisionada. Em seguida, foi testada a associação entre a estratégia metabonômica e o estágio de fibrose hepática pela biópsia, por validação cruzada, tendo sido estimadas a S, E, RVP, RVN e A dos MMs para predição de FS, FA e C. O padrão de referência na avaliação da fibrose hepática foi a análise histopatológica do tecido, obtido por biópsia percutânea. A fibrose hepática foi classificada, segundo METAVIR, de F0 a F4. Os MMs geraram resultados dicotômicos (positivo ou negativo). Foi considerado teste positivo aquele que se enquadrava no modelo gerado para o grupo e teste negativo aquele que não se enquadrava no modelo.

### 4.2- Local e período do estudo

O estudo foi realizado em ambulatórios de hepatologia, no Hospital das Clínicas, da Universidade Federal de PE (HC/UFPE), no período de outubro de 2012 a dezembro 2015, e no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro (HUCFF/RJ), no período de 2010 a 2014. Os dois centros são referência, em suas cidades e estados, para o tratamento das doenças hepáticas, pelo sistema público de saúde. A obtenção dos espectros de RMN H1 e as análises quimiométricas foram realizadas no Laboratório da Central Analítica do Departamento de Química Fundamental, da Universidade Federal de Pernambuco (DPF/UFPE).

#### 4.3- População do estudo

A população do estudo foi composta por indivíduos adultos, com diagnóstico de HCC, atendidos nos referidos ambulatórios, de forma consecutiva e por demanda espontânea.

#### 4.4- Critérios de inclusão

Foram incluídos pacientes com idade igual ou superior a 18 anos, com diagnóstico de HCC, caracterizado pela presença do anticorpo anti-HCV há mais de 6 meses e pela detecção do HCV-RNA no soro, e que tivessem realizado biópsia hepática nos últimos 12 meses ou diagnóstico de cirrose clinicamente estabelecido, no estudo de PE, ou com biópsia hepática no momento da inclusão, no estudo do RJ.

#### 4.5- Critérios de exclusão

Foram excluídos pacientes em tratamento para hepatite viral, com diagnóstico estabelecido de esquistossomose hepatointestinal ou hepatoesplênica, esteatohepatite não alcoólica, hepatite autoimune, hepatopatia metabólica ou colestática, coinfeção com o HIV ou HBV, neoplasia ou consumo excessivo de álcool, caracterizado pelo consumo de etanol > 210 g/semana em homens e 140 g/semana em mulheres, nos últimos 5 anos.

#### 4.6- Definição das variáveis e dos desfechos

As variáveis independentes foram classificadas em demográficas (sexo, idade e IMC), e biológicas (AST, ALT, relação AST/ALT, GGT, FA, BT, Plaquetas, Albumina, INR, APRI e FIB-4).

As variáveis dependentes foram definidas como relacionadas à classificação histopatológica de fibrose hepática e ao deslocamento químico dos átomos de hidrogênio dos metabólitos das amostras de soro, submetidos ao campo magnético.

Foi definido como desfecho, pelo padrão de referência, a categorização dos pacientes, de acordo com a classificação histopatológica de fibrose hepática por METAVIR em:

- a- Fibrose significativa: METAVIR F2, F3 ou F4
- b- Fibrose não significativa: METAVIR F0 ou F1

- c- Fibrose avançada: METAVIR F3 ou F4
- d- Fibrose não avançada: METAVIR F0, F1 ou F2
- e- Cirrose: METAVIR F4 ou diagnóstico clinicamente estabelecido de cirrose.
- f- Não cirrose: METAVIR F0, F1, F2 ou F3

Foi definido como desfecho, pelo teste (MMs), a categorização dos pacientes, de acordo com a classificação dos modelos construídos para cada grupo, em:

- a- Fibrose significativa: teste positivo pelo MM para predição de FS
- b- Fibrose não significativa: teste negativo pelo MM para predição de FS
- c- Fibrose avançada: teste positivo pelo MM para predição de FA
- d- Fibrose não avançada: teste negativo pelo MM para predição de FA
- e- Cirrose: teste positivo pelo MM para predição de cirrose
- f- Não-cirrose: teste negativo pelo MM para predição de cirrose

#### **4.7- Operacionalização da pesquisa e técnicas**

##### 4.7.1- Recrutamento dos participantes e procedimentos clínicos e laboratoriais

Foram recrutados pacientes com diagnóstico de HCC e classificação histopatológica de fibrose hepática, atendidos de forma consecutiva, por demanda espontânea, nos ambulatórios de hepatologia do HC/UFPE e do HUCFF/UFRJ, como parte da rotina desses serviços.

Os pacientes com HCC foram definidos pela presença de anti-HCV reagente há mais de 6 meses e HCV-RNA positivo no soro, por técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). Os pacientes cirróticos foram definidos pelo quadro clínico e/ou alterações sugestivas de doença hepática crônica e/ou hipertensão portal à ultrassonografia (US), como textura hepática heterogênea, ecogenicidade aumentada, diminuição do tamanho do fígado, aumento do calibre da veia porta, presença de circulação colateral e/ou esplenomegalia, e/ou alterações sugestivas de hipertensão portal à endoscopia digestiva alta (EDA), como a presença de varizes esofageanas, varizes gástricas e/ou gastropatia hipertensiva.

Os indivíduos elegíveis foram convidados a participar da pesquisa, após explicação detalhada dos objetivos do estudo. Os que concordaram, receberam o TCLE (apêndice A), para assinatura e inclusão no protocolo, e responderam o questionário aplicado pelo pesquisador. Durante o atendimento, foram realizados anamnese e exame físico (apêndice B).

Após a consulta, os participantes de PE realizaram coleta de duas amostras de 10 mL de sangue, em veia periférica, utilizando-se sistema à vácuo com tubos BD Vacutainer® que foram encaminhados ao Laboratório Central do HC-UFPE, para centrifugação e obtenção do soro ou plasma, e, em seguida, quantificação dos respectivos testes.

A dosagem dos níveis séricos de AST, ALT, GGT, FA, bilirrubinas e albumina, foi realizada por método cinético automatizado, utilizando equipamento CMD 800 X1 (Wiener Lab®); a contagem automatizada de plaquetas, por citometria de fluxo, utilizando equipamento Cell Dyn Ruby (Abbot®); a determinação do TP e índice internacional normalizado (INR), por leitura óptica e turbidimetria, utilizando equipamento ACL TOP 500 (Instrumentation Lab®) e a pesquisa do HBsAg, anti-HBc, anti-HCV e anti-HIV, por ensaio imunoenzimático por quimiluminescência, utilizando equipamento ARCHITECT i 2000 SR(Abbott®), conforme a rotina do laboratório.

A pesquisa do RNA-HCV e a determinação do genótipo foram realizados no Laboratório Central de Pernambuco (LACEN-PE). O RNA do HCV foi detectado e quantificado por PCR em tempo real, utilizando COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® (versão 2, Roche, Pleasanton, CA, EUA) com o limite de 15 UI/mL de detecção. Uma amostra de soro de cada participante foi armazenada à temperatura de - 20°C, e, posteriormente, encaminhada ao DQF/UFPE e submetida à análise por RMN H1, seguindo protocolo de biossegurança (apêndice C).

Os pacientes do RJ que participaram desta pesquisa fizeram parte de um estudo desenvolvido no ambulatório de Hepatologia do HUCFF/UFRJ, entre 2010 e 2014 (CHINDAMO et al., 2015). Os pacientes realizaram coleta de sangue em jejum, por punção de veia periférica, no dia da realização da biópsia ou com intervalo máximo de 3 meses, que foi centrifugado para obtenção de soro e plasma, e estocado a -70°C. Os níveis séricos de AST, ALT, GGT, FA, bilirrubinas, albumina, contagem de plaquetas e determinação do TP e INR foram realizados por método automatizado, de acordo com a rotina do laboratório do HUCFF/UFRJ. A pesquisa do RNA-HCV e genótipo foram realizados por PCR em tempo real, utilizando COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® (versão 2, Roche, Pleasanton, CA, EUA) com o limite de 15 UI/mL de detecção.

Os índices APRI e FIB-4 foram calculados de acordo com as fórmulas (WAI et al., 2003; STERLING et al, 2006):

$$APRI = \frac{AST (U/L)}{LSN AST (U/L)} \times 100 \quad FIB - 4 = \frac{Idade (anos) \times AST (U/L)}{Plaquetas (10^9/L) \times \sqrt{ALT (U/L)}}$$

LSN: limite superior da normalidade

Os pontos de corte  $\leq 0,5$  e  $> 1,5$  do APRI foram utilizados para o excluir e confirmar FS, e os pontos de corte  $\leq 1,0$  e  $> 2,0$  para excluir e confirmar cirrose. Para o FIB-4, os pontos de corte  $\leq 1,45$  e  $> 3,25$  foram utilizados para excluir e confirmar FA, de acordo com o descrito previamente (WAY et al, 2003; STERLING et al, 2006).

#### 4.7.2- Realização das biópsias hepáticas e análise histopatológica

As biópsias hepáticas percutâneas dos pacientes de PE foram realizadas no Serviço de Gastroenterologia e no Serviço de Radiologia do Hospital das Clínicas/UFPE, guiadas por US, após assepsia e anestesia local, com cânula para biópsia hepática Menghini 16 G x 90 mm (Biomedical, Minas Gerais, Brasil) ou *Tru-Cut* 16 G x 150 mm (TSK Laboratório, Akasaka, Japão), em, no máximo, duas punções. Após o procedimento, o paciente foi mantido em decúbito lateral direito por 2 horas e teve os sinais vitais monitorizados por 6 horas.

Os fragmentos de tecido hepático foram processados no Departamento de Patologia Clínica do HC/UFPE. Os espécimes foram fixados em solução de formol a 10%, adicionados a bloco de parafina, cortados com espessura de 5  $\mu$ m, e, então, corados por hematoxilina e eosina, tricrômico de Masson e técnica de Perls. Foram incluídos na análise os fragmentos com pelo menos 15 mm de extensão e/ou 6 espaços portais completos. As biópsias hepáticas percutâneas do RJ foram também guiadas por US e realizadas com agulha *Tru Cut* 14 ou 16 G (TSK Laboratório, Akasaka, Japão), obtendo fragmento de até 20 mm por punção. Fragmentos com extensão menor que 10 mm ou contendo menos de 6 espaços portais completos foram considerados inadequados. Os espécimes foram fixados em solução de formol a 10%, adicionados a bloco de parafina, cortados com espessura de 5  $\mu$ m, e então corados por hematoxilina e eosina, ácido periódico-Schiff, reticulina, tricrômico de Masson e Picrosirius. Nas duas cidades, a fibrose foi classificada por METAVIR de F0 a F4, por patologistas experientes, de forma independente, cegos em relação aos resultados clínicos e sorológicos.

Os soros dos pacientes do RJ foram transportados por empresa especializada em transporte de material biológico, por via aérea, em voo direto, seguindo as normas da Instrução Suplementar N<sup>o</sup> 175-004, Revisão A, da Agência Nacional de Aviação Civil (ANAC). As

amostras foram transportadas congeladas em gelo seco e imediatamente acomodadas, após a chegada, em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ . As espectroscopias por RMN H1 foram realizadas em um período de até um mês da chegada dos soros.

#### 4.7.3- Obtenção dos espectros de RMN H1 dos soros

As espectroscopias por RMN H1 foram realizadas no DQF/UFPE, por químicos treinados. As amostras de soro de pacientes de PE e do RJ foram descongeladas à temperatura ambiente, e, em seguida, 200  $\mu\text{L}$  de  $\text{D}_2\text{O}$  (água deuterada) foram adicionados à 400  $\mu\text{L}$  de cada amostra, que, após homogeneização, foram transferidos para tubos de RMN de 5 mm. Os espectros de RMN foram obtidos utilizando espectrômetro *Varian Unity Plus 300*, operando a 299,95 MHz para núcleo H1, a 300 K. As amostras foram analisadas usando uma sequência de pulsos com supressão da ressonância da água (PRESAT), utilizando tempo de pré-saturação igual a 2,0 s, tempo de aquisição igual a 1704 s, 128 repetições e largura espectral de 4,8 kHz. Sequência *Carr-Purcell-Meiboom-Gill* (CPMG) foi utilizada como filtro T2. Cada decaimento livre da indução foi multiplicado por uma função exponencial de 0,3 Hz antes da transformação de Fourier. O sinal atribuído ao grupo metila do lactato, em  $\delta$  1,33 ppm, foi utilizado como referência interna de deslocamento químico. A linha de base dos espectros foi corrigida manualmente. As amostras de soro foram descartadas após análise, segundo protocolo de biossegurança (apêndice C).

### 4.8- Análise estatística

#### 4.8.1- Análise descritiva e comparativa da casuística

Realizada com os programas *STATA* (versão 12.0, StataCorp, College Station, Texas), *GraphPad Prism* (versão 5.0 para Windows, *GraphPad Software*, La Jolla, California) e Excel 2010 (Microsoft Office 2010). As variáveis qualitativas foram apresentadas como frequências absolutas e relativas. A normalidade das variáveis foi verificada usando o teste de Kolmogorov-Smirnov. As variáveis quantitativas foram expressas como médias e desvio padrão ou medianas e percentil 25 e 75. O teste de Qui-quadrado foi usado para comparar variáveis categóricas, aplicando o teste exato de Fisher quando necessário. Para a análise comparativa de medidas

contínuas não paramétricas, utilizou-se o teste de Mann-Whitney, e para as medidas paramétricas, o teste T de Student. Todos os testes foram aplicados com 95% de confiança (valor de  $p \leq 0,05$ ).

#### 4.8.2- Análise estatística multivariada dos dados espectrais e desenvolvimento dos MMs

Todos os espectros foram processados usando o software *MestreNova* (versão 9.0.1, *MestreLab Research*). Os espectros foram divididos em 250 regiões de 0,04 ppm, denominadas bins, usadas para construir uma matriz de amostras versus variáveis (bins). A região contendo os bins centrados entre  $\delta$  4,52 - 5.12 ppm foi excluída para eliminar o sinal residual de água. Os espectros foram normalizados, usando a seguinte expressão:

$$x = \frac{x_i - \bar{x}}{\sigma}$$

Onde  $x_i$  é a intensidade em cada bin, enquanto  $\bar{x}$  é a média aritmética das intensidades observadas nos bins e  $\sigma$  é o desvio-padrão.

Na construção dos MMs, o formalismo PCA, não supervisionado, foi aplicado inicialmente a todo o conjunto de dados, para explorar agrupamentos inerentes e identificar a presença de *outliers*. A PCA não apresentou agrupamento nas classes de interesse. Foram utilizados, então, os formalismos PLS-DA e LDA, supervisionados, ou seja, com a informação do estágio de fibrose hepática, para construção dos modelos. Para os modelos PLS-DA, utilizou-se a matriz de dados normalizada, na plataforma online *MetaboAnalyst 3.0* (XIA et al., 2015). No caso da LDA, foi utilizada a matriz de escores da PCA como dado de entrada, utilizando o lambda de Wilks para selecionar os PCs a serem utilizados nas funções discriminantes. Os modelos LDA foram construídos usando o software *STATISTICA* (versão 10.0, Quest software). Com estes modelos, uma melhor separação dos grupos foi conseguida.

Três MMs por PLS-DA e três MMs por LDA foram construídos com as todas as amostras de soro dos pacientes de PE: o primeiro para a predição da FS, utilizando cinco PCs; o segundo para predição de FA, utilizando quatro PCs; e o terceiro para predição de C, utilizando cinco PCs. Para cada MM por LDA, validação cruzada “*leave-one-out-cross-validation*” (LOOCV) foi realizada.

Na construção dos MMs do RJ, os pacientes foram inicialmente alocados em dois grupos: modelo e validação. Para seleção dos pacientes utilizados na construção dos MMs (grupo modelo) e na validação externa dos MMs (grupo validação), utilizou-se o algoritmo de

Kennard-Stone, no aplicativo autônomo *Chemoface* (disponível em <http://ufla.br/chemoface>). Nesta estratégia de seleção do conjunto de formação (grupo modelo), os objetos são escolhidos sequencialmente. Em cada estágio, o objetivo é escolher os objetos de forma que eles fiquem uniformemente distribuídos no espaço. Os primeiros dois objetos são selecionados escolhendo-se os dois que estão mais distantes um do outro. O terceiro objeto selecionado é aquele mais distante dos primeiros dois objetos e assim por diante. O conjunto de formação é constituído de 70% dos objetos selecionados de cada classe, separadamente, e os restantes 30% dos objetos constituem o conjunto de teste (WU et al., 1996). Dois MMs por PLS-DA e dois MMs por LDA foram construídos com 70% das amostras de soro dos pacientes do RJ: o primeiro para a predição da FS, utilizando três PCs, e o segundo para predição de FA, utilizando três PCs. Cada MM por LDA foi testado por validação cruzada “*leave-one-out-cross-validation*” (LOOCV) no grupo modelo, e por validação externa no grupo validação.

#### 4.8.3- Análise de desempenho dos MM e dos índices APRI e FIB-4

Tabelas de contingência 2 x 2 foram criadas para este estudo de validação fase II, segundo o critério exemplificado abaixo:

MM (N)	BIÓPSIA (N)	
	F $\geq$ 2	F<2
F $\geq$ 2	Verdadeiro positivo (a)	Falso positivo (b)
F<2	Falso negativo (c)	Verdadeiro negativo (d)

Nesse exemplo, observamos os resultados obtidos pelo padrão de referência (biópsia) e pelo teste (MM) para predição de FS. Os valores de sensibilidade, especificidade, razão de verossimilhança positiva, razão de verossimilhança negativa e acurácia foram assim estimados:

- Sensibilidade =  $a/a+c$

Número de testes verdadeiro positivos dividido pelo total de pacientes com o agravo.

- Especificidade =  $d/b+d$

Número de testes verdadeiro negativos dividido pelo total de pacientes sem o agravo.

- RVP =  $a/a+c / b/b+d$

Razão entre a probabilidade de teste positivo em pacientes com o agravo e a probabilidade de teste positivo em pacientes sem o agravo.

- $RVN = c/a+c / d/b+d$

Razão entre a probabilidade de teste negativo em pacientes com o agravo e a probabilidade de teste negativo em pacientes sem o agravo.

- $Acurácia = a+d/a+b+c+d$

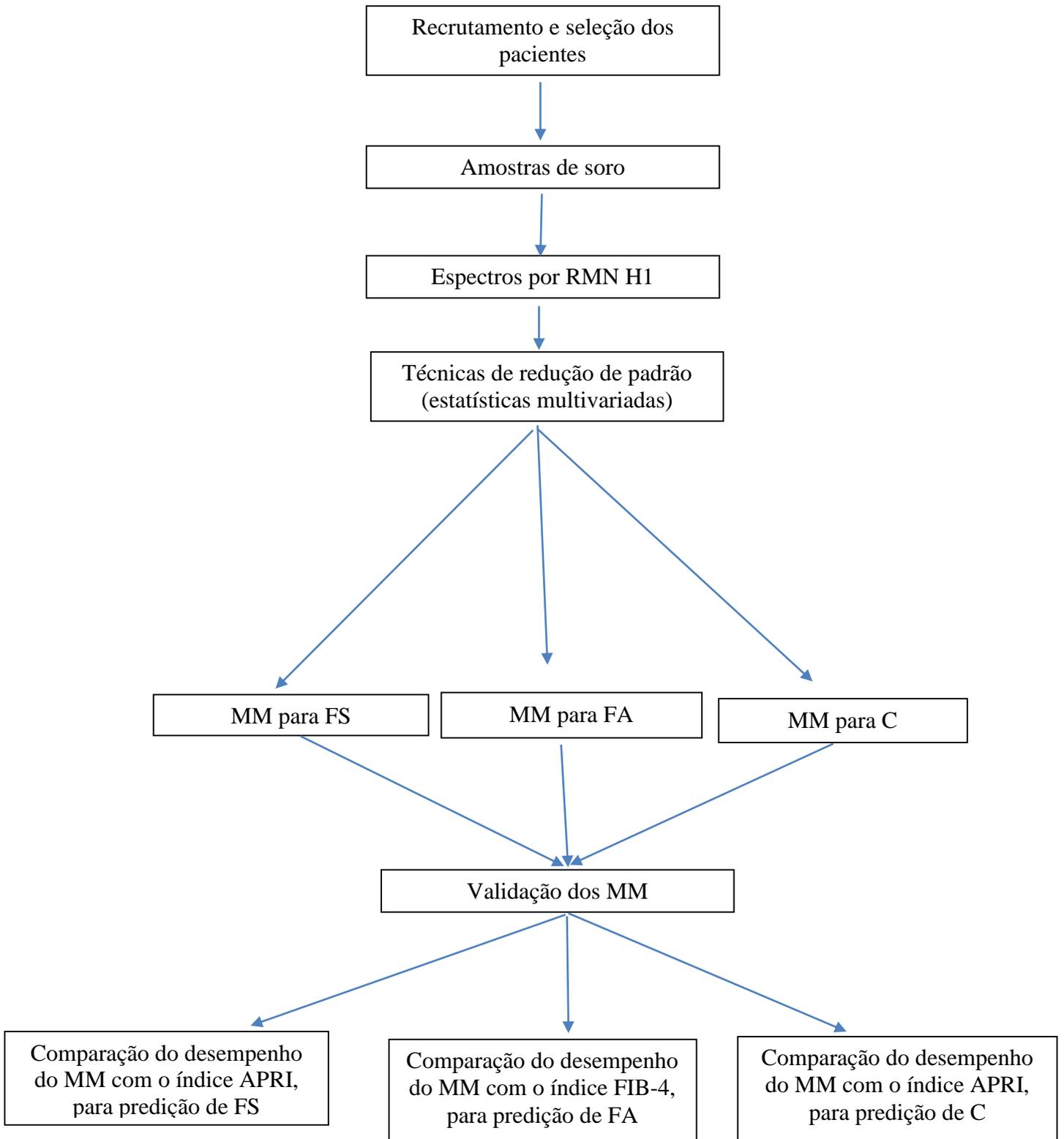
Número de testes verdadeiro positivos + verdadeiro negativos dividido pelo total de pacientes.

Tabelas de contingência 2 x 2 foram construídas para avaliar o desempenho de todos os MMs e dos índices APRI e FIB-4, com os pontos de corte estabelecidos na literatura. Os testes de associação utilizados nesta análise foram o teste de Qui-quadrado ou o teste exato de Fisher.

Uma curva ROC foi construída para predição de FS e C pelo APRI, e para predição de FA, pelo FIB-4. A curva ROC é uma forma de expressar a relação entre sensibilidade e especificidade de vários pontos de corte de um teste contínuo. A AUROC foi utilizada como indicador de acurácia dos índices.

O desempenho dos MMs desenvolvidos foi comparado ao desempenho do APRI, para predição de FS e C, e ao desempenho do FIB-4, para predição de FA.

## 4.9- Fluxograma da pesquisa



#### 4.10- Considerações éticas

A pesquisa de PE foi iniciada após a devida aprovação pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da UFPE (anexos A e B). A pesquisa do RJ foi devidamente aprovada pelo Comitê de Ética local e os soros dos pacientes foram cedidos pela pesquisa responsável (anexo C). Todos os pacientes foram informados das etapas do estudo e assinaram termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (apêndice A), após sua leitura, antes da inclusão no estudo. Foi salientado que a recusa em participar do estudo não implicaria em prejuízo no seu acompanhamento médico.

Os participantes não foram expostos a nenhum fator de risco adicional, visto que a coleta de sangue em veia periférica de pacientes acompanhados nos ambulatórios de hepatologia faz parte da rotina de investigação e definição de conduta clínica, independentemente da pesquisa. Foi assegurada confidencialidade quanto aos resultados ou quaisquer outros dados obtidos durante o período da pesquisa.

Todas as fichas clínicas, TCLE assinados e arquivos digitais da pesquisa foram arquivados pela pesquisadora principal, em local próprio, no ambulatório de hepatologia do HC/UFPE, e serão preservados pelo período de cinco anos.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 – Modelos Metabonômicos por RMN H1 para Predição de Fibrose Hepática em Pacientes com Hepatite C Crônica

**Autores:** Andrea Dória Batista<sup>1,2</sup>; Carlos Jonnatan Pimentel Barros<sup>3</sup>; Tássia Brena Barroso Carneiro Costa<sup>3</sup>; Michele Maria Gonçalves de Godoy<sup>1</sup>; Ronaldo Dionísio Silva<sup>3</sup>; Joelma Carvalho Santos<sup>1</sup>, Mariana Montenegro de Melo Lira<sup>4</sup>; Norma Thomé Jucá<sup>4</sup>; Ricardo Oliveira Silva<sup>3</sup>; Edmundo Pessoa Lopes<sup>1,2</sup>.

**Afiliação:**

- 1- Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical. Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.
- 2- Hospital de Clínicas. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.
- 3- Departamento de Química Fundamental. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.
- 4- Departamento de Patologia. Hospital das Clínicas. Universidade Federal de Pernambuco.

**Financiamento:** Não há.

**Lista de Abreviaturas:** APRI- índice da relação aspartato aminotransferase sobre plaquetas ; AUROC- área *under receiver operator characteristic*; HCC- Hepatite C Crônica; FIB-4- índice de fibrose baseado em quatro fatores; RMN H1- ressonância magnética nuclear de hidrogênio; LDA- análise discriminante linear; PC- componente principal; PCA- análise de componentes principais; PLS-DA- análise discriminante por mínimos quadrados parciais; OPLS-DA- análise discriminante ortogonal por mínimos quadrados parciais.

**Autor para correspondência:** Andrea Dória Batista. Endereço: Avenida Professor Moraes Rego, 135. Cidade Universitária, Recife/Pernambuco, Brazil. CEP 50670-901. Email: adoria04@globocom

**Conflito de interesse:** Nada a declarar

**Contribuição dos autores:**

Conceito e desenho: Andrea Dória Batista; Carlos Jonnatan Pimentel Barros; Ricardo Oliveira Silva; Edmundo Pessoa de Almeida Lopes.

Seleção de pacientes e procedimentos clínicos: Andrea Dória Batista; Michele Maria Gonçalves de Godoy; Joelma Carvalho Santos

Otimização dos parâmetros espectrais, obtenção dos espectros de RMN e construção dos modelos metabonômicos: Carlos Jonnatan Pimentel Barros; Ronaldo Dionísio da Silva; Tássia Brena Barroso Carneiro Costa

Análise histopatológicas: Norma Thomé Jucá; Mariana Montenegro de Melo Lira

Análise e discussão dos resultados: Andrea Dória Batista; Carlos Jonnatan Pimentel Barros; Tássia Brena Barroso Carneiro da Costa; Ronaldo Dionísio da Silva; Joelma Carvalho Santos; Michele Maria Gonçalves de Godoy; Ricardo Oliveira Silva; Edmundo Pessoa de Almeida Lopes.

Redação do artigo: Andrea Dória Batista; Carlos Jonnatan Pimentel Barros; Tássia Brena Barroso Carneiro da Costa.

Revisão do artigo: Andrea Dória Batista; Ricardo Oliveira Silva; Edmundo Pessoa de Almeida Lopes.

**Resumo: Introdução:** O padrão-ouro na avaliação de fibrose hepática em pacientes com hepatite C crônica (HCC) é a biópsia, método invasivo, sujeito a complicações e a erros. Alternativamente, biomarcadores vêm sendo testados. A metabonômica é uma estratégia de análise que utiliza espectros de RMN H1 para classificar biofluidos, em função do seu status bioquímico. **Objetivo:** Desenvolver modelos metabonômicos (MM), através de espectros de RMN H1 de soros, para predição de fibrose hepática significativa (FS: METAVIR  $\geq$ F2), avançada (FA: METAVIR  $\geq$ F3) e cirrose (C: METAVIR=F4 ou cirrose clínica), em pacientes com HCC, e comparar com os índices APRI e FIB-4, utilizando a análise histopatológica hepática como referência. **Métodos:** Sessenta e nove pacientes com biópsia nos últimos 12 meses ou cirrose clínica foram incluídos e aqueles com doença hepática por outra etiologia foram excluídos. Espectros de RMN H1 foram obtidos utilizando o espectrômetro *Varian Unity* 300. Os MM construídos usando PLS-DA e LDA, a partir da matriz de escores da PCA, foram testados por validação cruzada, considerando FS, FA e C. **Resultados:** Quarenta e dois

pacientes (61%) apresentaram FS, 28 (40%) FA e 18 (26%) C. Os MM mostraram sensibilidade e especificidade de 97,6% e 92,6% para predição de FS; 96,4% e 95,1% para FA; e 100% e 98,0% para C, com desempenho similar ao APRI e FIB-4. Os MM classificaram corretamente 27 (39,7%) pacientes com valor de APRI entre 0,5 e 1,5, e 25 (38,8%) com FIB-4 entre 1,45 e 3,25. **Conclusão:** Os MM desenvolvidos neste estudo preliminar apresentaram elevada acurácia para predição de FS, FA, C e para predição de fibrose na zona cinza do APRI e FIB-4, em pacientes com HCC, reduzindo a necessidade de biópsia hepática nestes pacientes.

**Palavras-chave:** Metabonômica; Hepatite C/diagnóstico; Fibrose hepática; Biomarcadores/soro; Biópsia/padrão de referência.

### **Introdução:**

Cerca de 130 a 170 milhões de pessoas no mundo estão cronicamente infectadas com o vírus da hepatite C (HCV) (1) e cerca de 500 mil indivíduos morreram em 2010 em decorrência de doenças relacionadas ao vírus (2) No Brasil, a prevalência estimada de hepatite C é 1.450.000 casos (3) e cerca de 8 mil mortes decorreram de doenças relacionadas ao HCV em 2013. (4)

O diagnóstico acurado da fibrose significativa e avançada é importante na prática clínica para determinar a necessidade e urgência do tratamento e para monitorar complicações. A biópsia hepática ainda é considerado padrão-ouro na avaliação da fibrose hepática, porém o procedimento é invasivo, com complicações maiores e morte (5). Erro de amostragem na obtenção do espécime e variabilidade intra e inter-observador na avaliação histopatológica podem levar a resultados discordantes em 33% dos casos (6), tornando a biópsia um padrão de referência imperfeito. Por estes motivos, vários marcadores não invasivos de avaliação de fibrose, sorológicos e físicos, têm sido testados. Dentre os marcadores sorológicos, destacam-se o APRI e FIB-4, por serem não patenteados e baseados em parâmetros clínicos e laboratoriais facilmente obtidos. (7,8). De uma maneira geral, os marcadores sorológicos apresentam boa acurácia para excluir fibrose significativa e confirmar cirrose, mas falham no diagnóstico da fibrose intermediária (9).

A metabonômica é definida como "uma medida quantitativa da resposta metabólica, dinâmica e multiparamétrica, de organismos vivos diante de modificações patológicas ou genéticas" (10). Em função da homeostase, a presença de uma condição patológica altera o perfil de metabólitos endógenos, o que pode ser monitorado pela espectroscopia de RMN H1 (11). O método procura discriminar as amostras em grupos associados ao seu status bioquímico, associando esse status a uma determinada doença (11,12). A metabonômica tem sido estudada

em várias doenças hepáticas, incluindo as hepatites virais (13). Em nosso meio, Godoy et al., utilizando modelo metabonômico construído a partir de espectro de RMN H1 de amostras de urina, conseguiram discriminar pacientes com HCC de indivíduos saudáveis (14). Munshi et al, usando MM por PCA, através de espectroscopia de RMN H1 de soro e urina, discriminou pacientes com hepatite B e hepatite E aguda de 18 voluntários saudáveis (15). Existem estudos mostrando que a metabonômica pode identificar carcinoma hepato-celular em pacientes com cirrose, com boa acurácia (16–18). O objetivo deste estudo foi desenvolver modelos metabonômicos, utilizando espectro de RMN H1 de amostras de soro, como método não invasivo para predição de fibrose hepática significativa, fibrose avançada e cirrose em pacientes com HCC, e comparar com os índices APRI e FIB-4.

### **Pacientes e Métodos:**

#### **Tipo de estudo e seleção de pacientes:**

Trata-se de estudo transversal, do tipo validação de teste diagnóstico fase II (19), com inclusão prospectiva, por demanda espontânea, de pacientes com idade superior a 18 anos, diagnóstico de HCC (anti-HCV e HCV-RNA detectáveis no soro) e biópsia hepática percutânea realizada nos 12 meses anteriores à inclusão no estudo, ou com diagnóstico clinicamente firmado de cirrose hepática na inclusão. Os pacientes foram atendidos no ambulatório de hepatologia do Hospital das Clínicas/Universidade Federal de Pernambuco (HC/UFPE), entre outubro/2012 e dezembro/2015. O diagnóstico de cirrose foi definido por características clínicas e de imagem. Os pacientes em tratamento antiviral ou com diagnóstico de esquistossomose hepatoesplênica, doença hepática metabólica, autoimune ou colestática, coinfeção com HBV ou HIV, neoplasia ou exposição à etanol > 20 g/dia para mulheres e 30 g/dia para homens foram excluídos. Todos os pacientes assinaram termo de consentimento livre e esclarecido e o estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da instituição.

#### **Análise laboratorial, determinação dos índices APRI e FIB-4:**

Os pacientes realizaram coleta de sangue em jejum, por punção de veia periférica. Os testes laboratoriais foram realizados por método automatizado. O RNA do HCV foi detectado e o genótipo determinado por técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real, utilizando COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® (versão 2, Roche, Pleasanton, CA, EUA) com o limite de 15 UI/mL de detecção. Os índices APRI e FIB-4 foram calculados conforme previamente descrito (7,8).

**Análise de Ressonância Magnética Nuclear H1:**

As amostras de soro estocadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  foram descongeladas à temperatura ambiente e preparadas adicionando-se 200  $\mu\text{L}$  de água deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ ) à 400  $\mu\text{L}$  de soro. Os espectros de RMN foram obtidos utilizando espectrômetro *Varian Unity Plus 300*, operando a 299,95 MHz para núcleo de H1, a 300 K. As amostras foram analisadas usando uma sequência de pulsos com supressão da ressonância da água e Sequência *Carr-Purcell-Meiboom-Gill* como filtro T2 (PRESAT-CPMG), como se segue: tempo de pré-saturação igual a 2,0 s, tempo de aquisição igual a 1704 s, 128 repetições e largura espectral de 4,8 kHz. Cada decaimento livre da indução foi multiplicado por uma função exponencial de 0,3 Hz antes da transformação de Fourier. O sinal atribuído ao grupo metila do lactato, em  $\delta$  1,33 ppm, foi utilizado como referência interna de deslocamento químico. A linha de base dos espectros foi corrigida manualmente.

**Biópsias hepáticas e alocação dos pacientes:**

As biópsias hepáticas percutâneas, guiadas por US, foram realizadas utilizando agulha Menghini 16G x 90 mm em, no máximo, 2 punções. Foram incluídos na análise os fragmentos com pelo menos 15 mm e/ou 6 espaços portais completos. A fibrose foi classificada segundo METAVIR (20) de F0 a F4, de forma independente, por dois patologistas experientes, cegos em relação aos resultados clínicos e laboratoriais. Os pacientes foram alocados em três grupos: FS (METAVIR  $F \geq 2$ ), FA (METAVIR  $F \geq 3$ ) e C (METAVIR  $F = 4$  ou cirrose clínica).

**Análise estatística da casuística:**

A análise descritiva e comparativa da casuística foi realizada com os programas STATA (versão 12.0, StataCorp, College Station, Texas), GraphPad Prism (versão 5.0 para Windows, *GraphPad Software*, La Jolla, California) e Excel 2010 (Microsoft Office 2010). As variáveis qualitativas foram apresentadas como frequências absolutas e relativas. e as variáveis quantitativas como médias e desvio padrão, ou medianas e percentil 25 e 75. O teste de Qui-quadrado foi usado para comparar variáveis categóricas, aplicando-se o teste exato de Fisher quando necessário. O teste de Mann-Whitney e o teste T de Student foram utilizados para a análise comparativa de medidas contínuas não paramétricas e paramétricas, respectivamente. Todos os testes foram aplicados com 95% de confiança (valor de  $p \leq 0,05$ ).

**Análise estatística multivariada dos dados espectrais e desenvolvimento dos MM:**

Todos os espectros foram processados usando o software *MestreNova* (versão 9.0.1, *MestreLab Research*). Os espectros foram divididos em 250 regiões de 0,04 ppm, denominadas bins, usadas para construir o banco de dados. A região contendo os bins centrados entre  $\delta$  4,52 - 5.12 ppm foi excluída para eliminar o sinal residual de água. Os espectros foram normalizados, usando a seguinte expressão:

$$x = \frac{x_i - \bar{x}}{\sigma}$$

Onde  $x_i$  é a intensidade em cada bin, enquanto  $\bar{x}$  é a média aritmética das intensidades observadas nos bins e  $\sigma$  é o desvio-padrão.

O formalismo PCA foi aplicado inicialmente a todo o conjunto de dados, para explorar agrupamentos inerentes e identificar a presença de *outliers*. A PCA não apresentou agrupamento nas classes de interesse. Foram utilizados, então, os formalismos supervisionados PLS-DA e LDA. Três modelos PLS-DA foram construídos, para predição de FS, FA e C, respectivamente, utilizando-se a plataforma online *MetaboAnalyst 3.0* (21). Os modelos foram validados por *leave-one-out cross validation* (LOOCV) e por teste de permutações. Três modelos LDA foram desenvolvidos com a matriz de escores da PCA como dado de entrada, para a predição da FS, utilizando cinco PCs; para predição de FA, utilizando quatro PCs; e para predição de C, utilizando cinco PCs. Os modelos foram validados por LOOVC, usando o software *STATISTICA* (versão 10.0, Quest software)

**Análise de desempenho dos MM e índices APRI e FIB-4:**

Para cada modelo LDA e para os escores APRI e FIB-4, uma tabela de contingência 2x2 foi utilizada para o cálculo de sensibilidade (S), especificidade (E), razão de verossimilhança positiva (RVP), razão de verossimilhança negativa (RVN) e acurácia (A). Uma curva ROC foi construída para os índices APRI e FIB-4.

### **Resultados:**

Dos 80 pacientes inicialmente selecionados, 11 (14%) foram excluídos, sendo 5 por diagnóstico ultrassonográfico de esquistossomose hepatoesplênica; 1 por diagnóstico tomográfico de carcinoma hepato-celular; 1 por consumo excessivo de etanol e 4 por fragmento hepático inadequado. Portanto, 69 pacientes foram avaliados, 59,4% do sexo feminino, com idade média de  $57 \pm 12$  anos. O genótipo do HCV foi determinado em 67 pacientes, sendo mais frequente o genótipo 1b, presente em 36 (53,7%) pacientes, seguido pelo genótipo 3 em 16 (23,9%), genótipo 1/1a em 13 (19,4%), genótipo 2 em 1 (1,5%) e genótipo 4 em 1 (1,5%) paciente. Em 68 pacientes, foi possível determinar o valor do APRI e do FIB-4. As principais características da casuística são descritas na Tabela 1.

**Tabela 1. Principais características demográficas e laboratoriais de 69 pacientes com hepatite C crônica, em Recife/PE, no período de 2012 a 2015**

<b>Características</b>	<b>Total (n=69)</b>
Sexo (n, %)	
Masculino	28 (40,6%)
Feminino	41 (59,4%)
Idade (anos)*	57,5 $\pm$ 11,9
IMC (kg/m <sup>2</sup> )*	27,7 $\pm$ 4,7
AST (U/L)**	51,5 (33,7-88)
ALT (U/L)**	54 (32,6-106)
AST/ALT*	1,03 $\pm$ 0,44
GGT (U/L)**	81,8 (46,5-155)
Plaquetas (10 <sup>9</sup> /mm <sup>3</sup> )*	191 $\pm$ 78
Albumina (g/dl)*	4,08 $\pm$ 0,56
Bilirrubina total (mg/dL)**	0,7 (0,50-1,09)
Fosfatase alcalina (U/L)*	94,6 $\pm$ 49,2
INR*	1,09 $\pm$ 0,14
APRI**	0,8 (0,44-2,18)
FIB-4**	2,18 (1,29-4,72)
Fragmentos da biópsia (cm)**	1,50 (1,30-1,80)
Número de espaços porta**	15,0 (12,0-20,0)
Grau de fibrose (n, %)	
F0	2 (2,9%)
F1	25 (36,2%)
F2	14 (20,3%)
F3	10 (14,5%)
F4	18 (26,1%)

\*Média  $\pm$  desvio padrão; \*\*Mediana (P<sub>25</sub>-P<sub>75</sub>); IMC: Índice de massa corporal; ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase; GGT: gama glutamil transferase; INR: Razão normalizada internacional; APRI: índice da relação aspartato aminotransferase sobre plaquetas; FIB-4: índice de fibrose baseado em quatro fatores.

Biópsia hepática foi realizada em 54 (78%) pacientes. Não houve complicações graves ou óbito relacionados ao procedimento. O fragmento apresentou extensão mediana de 15 mm (P<sub>25</sub> 1,3- P<sub>75</sub> 1,8 cm), e 15 espaços portais (P<sub>25</sub> 12- P<sub>75</sub> 20). Os pacientes foram assim distribuídos, de acordo com a classificação METAVIR: F0 em 2 pacientes; F1 em 25, F2 em 14; F3 em 10 e F4 em 3 pacientes. O diagnóstico de cirrose foi clinicamente estabelecido em 15 (21,7%) pacientes. Portanto, 42 (60,9%) pacientes foram classificados como FS, 28 (40,6%) como FA e 18 (26,1%) como C. Os pacientes com fibrose significativa, avançada e cirrose apresentaram idade média e valor médio de INR superiores, mediana de bilirrubina, gama-glutamil transferase, APRI e FIB-4 superiores, além de nível sérico médio de plaquetas e albumina inferiores, quando comparados com os grupos de menor grau de fibrose (Tabela 2).

**Tabela 2. Principais características demográficas e laboratoriais de 69 pacientes com hepatite C crônica, de acordo com o grupo de fibrose, em Recife/PE, no período de 2012 a 2015.**

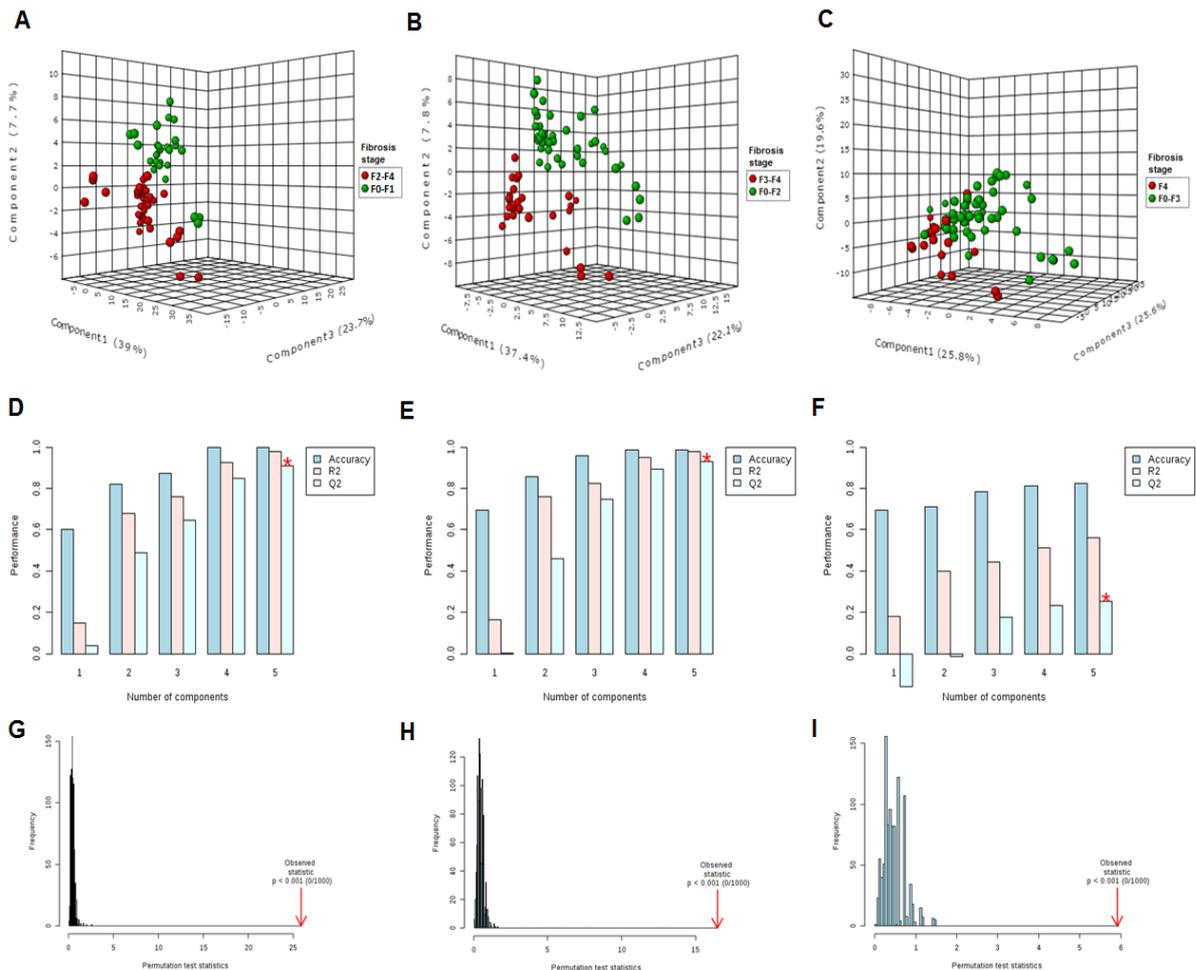
Características	Grupo de fibrose		p
	Significativa (≥F2) n = 42	Não significativa (<F2) n = 27	
Sexo (M/F, %)	16/26 (40,6/59,4)	12/15 (38,1/61,9)	0,600 <sup>a</sup>
Idade (anos)*	62,16 ± 9,46	50,22 ± 11,86	<0,0001 <sup>b</sup>
IMC (kg/m <sup>2</sup> )*	28,6 ± 4,9	26,3 ± 3,8	0,051 <sup>b</sup>
AST (U/L)**	61,5 (45,5-103)	34 (29,6-47)	<0,0001 <sup>c</sup>
ALT (U/L)**	57,5 (41,7-108)	39,1 (26-81)	0,04 <sup>c</sup>
AST/ALT*	1,12 ± 0,47	0,91 ± 0,36	<0,0001 <sup>b</sup>
GGT (U/L)**	107,5 (65,8-168)	56 (32,8-82,9)	0,001 <sup>c</sup>
Plaquetas (10 <sup>9</sup> /mm <sup>3</sup> )*	162 ± 72	239 ± 61	<0,0001 <sup>b</sup>
Albumina (g/dL)*	3,91 ± 0,62	4,35 ± 0,30	0,001 <sup>b</sup>
Bilirrubina total (mg/dL)**	0,72 (0,60-1,30)	0,50 (0,40-0,80)	0,005 <sup>c</sup>
Fosfatase alcalina (U/L)*	103,3 ± 55,6	79,2 ± 30,3	0,059 <sup>b</sup>
INR*	1,13 ± 0,17	1,03 ± 0,06	0,002 <sup>b</sup>
APRI**	1,14 (0,75-2,84)	0,48 (0,27-0,79)	<0,0001 <sup>c</sup>
FIB-4**	3,45 (2,01-6,19)	1,37 (0,84-1,89)	<0,0001 <sup>c</sup>

	Avançada ( $\geq$ F3) n = 28		Não avançada (<F3) n = 41		
Sexo (M/F, %)	14/14	(50,0/50,0)	14/27	(34,1-65,9)	0,188 <sup>a</sup>
Idade (anos)*	62,23	$\pm$ 9,42	54,25	$\pm$ 12,46	<b>0,004<sup>b</sup></b>
IMC (kg/m <sup>2</sup> )*	27,6	$\pm$ 3,9	27,9	$\pm$ 5,2	0,802 <sup>b</sup>
AST (U/L)**	79	(52,4-130)	40	(31,4-63)	<b>0,001<sup>c</sup></b>
ALT (U/L)**	62	(42,5-113,3)	43	(29-84,8)	0,078 <sup>c</sup>
AST/ALT*	1,19	$\pm$ 0,54	0,93	$\pm$ 0,33	<b>0,031<sup>b</sup></b>
GGT (U/L)**	110,5	(76,1-159,3)	66,5	(36,2-137,8)	<b>0,005<sup>c</sup></b>
Plaquetas (10 <sup>9</sup> /mm <sup>3</sup> )*	138	$\pm$ 65	228	$\pm$ 63	<b>&lt;0,0001<sup>b</sup></b>
Albumina (g/dL)*	3,75	$\pm$ 0,66	4,33	$\pm$ 0,29	<b>&lt;0,0001<sup>b</sup></b>
Bilirrubina total (mg/dL)**	0,94	(0,70-1,48)	0,50	(0,44-0,70)	<b>&lt;0,0001<sup>c</sup></b>
Fosfatase alcalina (U/L)*	99,5	$\pm$ 38,9	90,9	$\pm$ 56,1	0,490 <sup>b</sup>
INR*	1,18	$\pm$ 0,17	1,03	$\pm$ 0,07	<b>&lt;0,0001<sup>b</sup></b>
APRI**	2,13	(0,99-3,75)	0,59	(0,39-0,92)	<b>&lt;0,0001<sup>c</sup></b>
FIB-4**	4,80	(2,56-9,30)	1,72	(1,10-2,21)	<b>&lt;0,0001<sup>c</sup></b>
	Cirrose (F4) n = 18		Sem cirrose (<F4) n = 51		
Sexo (M/F, %)	7/11	(38,9/61,1)	21/30	(41,2/58,8)	0,865 <sup>a</sup>
Idade (anos)*	63,70	$\pm$ 11,11	55,29	$\pm$ 11,51	<b>0,009<sup>b</sup></b>
IMC (kg/m <sup>2</sup> )*	27,7	$\pm$ 3,4	27,7	$\pm$ 5,1	0,983 <sup>b</sup>
AST (U/L)**	69	(54,1-101,5)	43,2	(32,5-80)	0,059 <sup>c</sup>
ALT (U/L)**	54	(36,4-71)	50	(31-114)	0,637 <sup>c</sup>
AST/ALT*	1,38	$\pm$ 0,56	0,91	$\pm$ 0,31	<b>0,003<sup>b</sup></b>
GGT (U/L)**	108,5	(73,8-156,3)	74,5	(41,3-151,2)	<b>0,068<sup>c</sup></b>
Plaquetas (10 <sup>9</sup> /mm <sup>3</sup> )*	123	$\pm$ 72	216	$\pm$ 64	<b>&lt;0,0001<sup>b</sup></b>
Albumina (g/dL)*	3,41	$\pm$ 0,63	4,31	$\pm$ 0,29	<b>&lt;0,0001<sup>b</sup></b>
Bilirrubina total (mg/dL)**	1,27	(0,70-2,88)	0,60	(0,47-0,80)	<b>&lt;0,0001<sup>c</sup></b>
Fosfatase alcalina (U/L)*	107,2	$\pm$ 41,3	89,7	$\pm$ 51,5	0,202 <sup>b</sup>
INR*	1,21	$\pm$ 0,20	1,05	$\pm$ 0,08	<b>0,003<sup>b</sup></b>
APRI**	2,35	(1,04-4,36)	0,69	(0,40-1,11)	<b>&lt;0,0001<sup>c</sup></b>
FIB-4**	5,63	(4,37-11,27)	1,85	(1,17-2,38)	<b>0,001<sup>c</sup></b>

\*Média  $\pm$  desvio padrão; \*\*Mediana (P<sub>25</sub>-P<sub>75</sub>); <sup>a</sup>Teste Qui-quadrado. <sup>b</sup>Teste T. <sup>c</sup>Teste de Mann-Whitney. ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase; GGT: gama glutamil transferase; INR: Razão normalizada internacional; APRI: índice da relação aspartato aminotransferase sobre plaquetas; FIB-4: índice de fibrose baseado em quatro fatores.

O MM por PLS-DA para predição de FS mostrou uma clara discriminação entre as amostras quando foram utilizadas três componentes latentes (Figura 1, A). O modelo apresentou 100% de acurácia e R2 de 0,98 quando cinco componentes latentes foram utilizadas (Figura 1, D). Também foram realizados testes com até 1000 permutações, que indicaram, com  $p < 0,001$ , que nenhum modelo permutado apresentou resultado superior ao modelo original (Figura 1, G).

**Figura 1. Análise PLS-DA dos modelos metabonômicos para predição de fibrose significativa, avançada e cirrose em 69 pacientes com hepatite C crônica, em Recife/PE, no período de 2012 a 2015.** Modelos PLS-DA para predição de FS (A, D, G), FA (B, E, H) e cirrose (C, F, I). Gráfico de escores 3D (A, B, C); Validação cruzada utilizando diferentes números de componentes latentes para classificação do modelo metabonômico com acurácia=1,0/1,0/0,84,  $R^2=0,98/0,98/0,56$  e  $Q^2=0,92/0,93/0,27$ , utilizando 5 componentes latentes (D, E, F); Estatísticas do teste de permutação para 1000 permutações com estatística observada do modelo de predição da acurácia com  $p < 0,001$  (G, H, I).



Os resultados do MM construído para predição de FS, usando o formalismo LDA e validado por LOOCV, são apresentados na Tabela 3 e foram comparados àqueles observados usando o índice APRI, com pontos de corte 0,5 e 1,5. O MM mostrou S de 97,6% (IC 95%: 87,4-99,9%), similar à do APRI com ponto de corte 0,5, que apresentou S de 85,7% (IC 95%: 71,5-94,6%). A RVN do MM para excluir FS foi 0,03 (IC 95%: 0,004-0,2), enquanto que a RVN para valores de APRI  $\leq 0,5$  foi 0,3 (IC 95%: 0,1-0,7). O MM apresentou E 92,6% (IC 95%: 75,7-99,1%) e RVP 13,2 (IC 95%: 3,5-50,1), similares à do APRI com ponto de corte 1,5, que mostrou E 90,5% (IC 95%: 69,6-98,8%), e RVP 5,9 (IC 95%: 1,5-23,2) para valores  $> 1,5$ .

**Tabela 3. Desempenho dos modelos metabonômicos, APRI e FIB-4 para predição de fibrose significativa, avançada e cirrose em 69 pacientes com hepatite C crônica, em Recife/PE, no período de 2012 a 2015.**

Fibrose significativa												
Modelo (N=69)	Biópsia		<i>p</i> <sup>a</sup>	Sensibilidade		Especificidade		RVP	RVN		A (%)	
	F2-F4	F0-F1		(%)	IC <sub>95%</sub>	(%)	IC <sub>95%</sub>	IC <sub>95%</sub>	IC <sub>95%</sub>	IC <sub>95%</sub>		
≥ F2	41	2	<0,001	<b>97,6</b>	87,4-99,9	<b>92,6</b>	75,7-99,1	<b>13,2</b>	3,5-50,1	<b>0,03</b>	0,004-0,2	<b>95,7</b>
< F2	1	25										
APRI (N=68)												
> 0,5	36	13	0,001 <sup>b</sup>	<b>85,7</b>	71,5-94,6	50,0	29,9-0,70	1,71	1,2-2,6	<b>0,3</b>	0,1-0,7	<b>72,0</b>
≤ 0,5	6	13										
> 1,5	19	2	0,001	45,2	29,9-61,3	<b>92,3</b>	74,9-99,0	<b>5,9</b>	1,5-23,2	0,6	0,4-0,8	63,2
≤ 1,5	23	24										
Fibrose avançada												
Modelo (N=69)	Biópsia		<i>p</i> <sup>a</sup>	Sensibilidade		Especificidade		RVP	RVN		A (%)	
	F3-F4	F0-F2		(%)	IC <sub>95%</sub>	(%)	IC <sub>95%</sub>	IC <sub>95%</sub>	IC <sub>95%</sub>	IC <sub>95%</sub>		
≥ F3	27	2	<0,001	<b>96,4</b>	81,7-99,1	<b>95,1</b>	83,5-99,4	<b>19,8</b>	5,1-76,5	<b>0,04</b>	0,005-0,3	<b>95,7</b>
< F3	1	39										
FIB-4 (N=68)												
> 1,45	25	24	0,012	<b>89,3</b>	71,8-97,7	40,0	24,9-56,7	1,5	1,1-2,0	<b>0,3</b>	0,1-0,8	60,3
≤ 1,45	3	16										
>3,25	21	3	<0,001	75,0	55,1-89,3	<b>92,5</b>	79,6-98,4	<b>10</b>	3,3-30,3	0,3	0,1-0,5	<b>85,3</b>
≤ 3,25	7	37										
Cirrose												
Modelo (N=69)	Biópsia		<i>p</i> <sup>a</sup>	Sensibilidade		Especificidade		RVP	RVN		A (%)	
	F4	F0-F3		(%)	IC <sub>95%</sub>	(%)	IC <sub>95%</sub>	IC <sub>95%</sub>	IC <sub>95%</sub>	IC <sub>95%</sub>		
F4	18	1	<0,001	<b>100</b>	81,5-100	<b>98,0</b>	89,6-99,9	<b>33,8</b>	6,9-163,7	<b>0,03</b>	0,002-0,4	<b>98,6</b>
< F4	0	50						*		*		
APRI (N=68)												
> 1,00	14	16	0,002	<b>77,8</b>	52,4-93,6	68,0	53,3-80,5	2,4	1,5-3,9	<b>0,3</b>	0,1-0,8	70,6
≤ 1,00	4	34										
> 2,00	9	9	0,008 <sup>b</sup>	50,0	26,0-74,0	<b>82,0</b>	68,6-91,4	<b>2,8</b>	1,3-5,9	0,6	0,4-1,0	<b>73,5</b>
≤ 2,00	9	41										

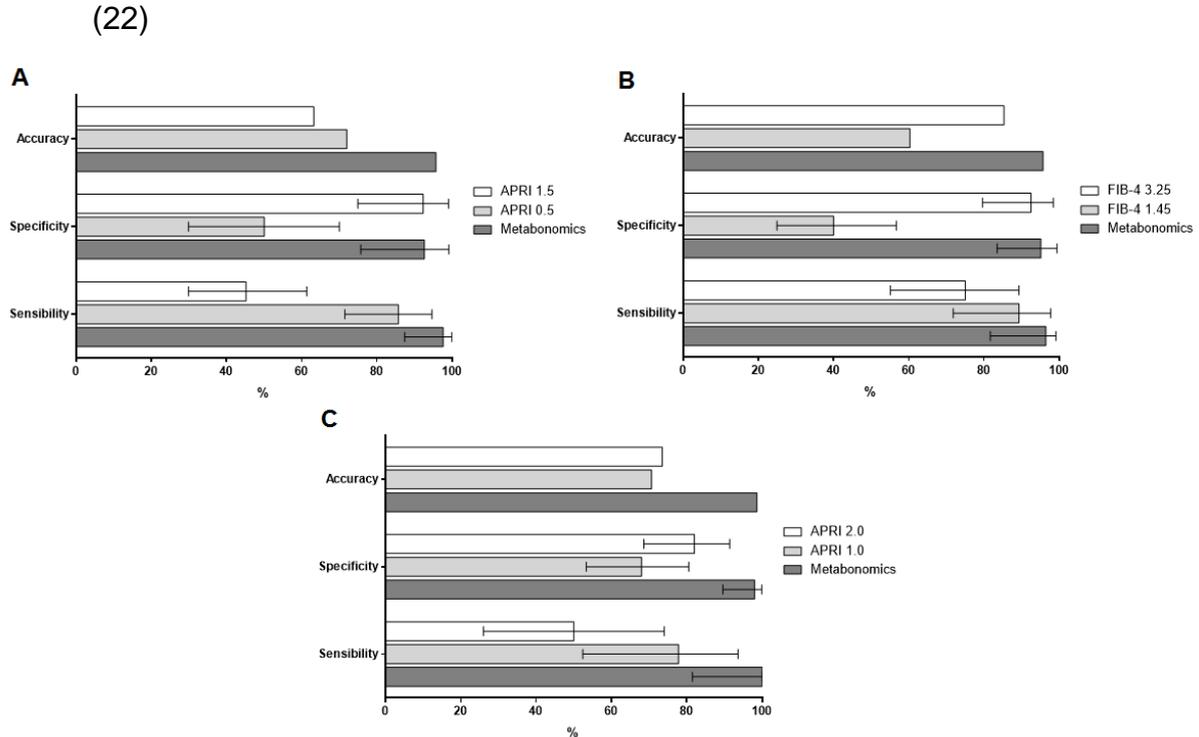
<sup>a</sup>Teste Exato de Fisher; <sup>b</sup>Teste do qui-quadrado; \*Valor estimado; RVP: Razão de Verossimilhança Positiva; RVN: Razão de Verossimilhança Negativa.

O MM por PLS-DA para predição de FA, usando três componentes latentes, discriminou bem as amostras, alcançando acurácia de 100% com 5 componentes latentes. O teste de permutações indicou que os modelos permutados não foram melhores que o modelo original (Figura 1 B, E, H). O MM por LDA para predição de FA apresentou S de 96,4% (IC 95%: 81,7-99,1%) e RVN de 0,04 (IC 95%: 0,005-0,3), semelhante ao resultado do FIB-4 com ponto de corte 1,45, que mostrou S de 89,3% (IC 95%: 71,8-97,7%) e VPN de 0,3 (IC 95%: 0,1-0,5) para valores < 1,45. Os dois métodos também apresentaram bom desempenho na predição de presença de FA, com E de 95,1% (IC 95%: 83,5-99,4%) e RVP de 19,8 (IC 95%: 5,1-76,5) para o MM, e E de 92,5% (IC 95%: 79,6-98,4%) para o FIB-4 com ponto de corte 3,25 e RVP de 10 (IC 95%: 3,3-30,3) para valores > 3,25 (Tabela 3).

O modelo PLS-DA para predição de C, usando três componentes latentes também discriminou adequadamente as amostras, alcançando acurácia da ordem de 84,0% com 5 componentes latentes. O teste de permutações indicou que o modelo original não foi superado por nenhum dos modelos permutados (Figura 1 C, F, I). O modelo LDA para predição de C mostrou S de 100% (IC 95%: 81,5-100%) e RVN de 0,03 (IC 95%: 0,002-0,4), similar ao resultado do APRI com ponto de corte 1,0, que apresentou S de 77,8% (IC 95%: 52,4-93,6) e RVN 0,3 (IC 95%: 0,1-0,8) para valores < 1,0. O MM apresentou ainda E 98% (IC 95%: 89,6-99,9%), similar à do APRI com ponto de corte 2,0, que mostrou E 82% (IC 95%: 68,6-91,4), porém com RVP de 33,8 (IC 95%: 6,9-163,7), superior à de valores de APRI > 2,0, que apresentou RVP 2,8 (IC 95%: 1,3-5,9). Este resultado indica que, dado um teste positivo pelo MM, a probabilidade de presença de cirrose foi de 33 vezes a probabilidade de ausência de cirrose, enquanto que, pelo APRI, foi de 2,8 vezes. (Tabela 3).

De uma forma geral, os MM apresentaram elevada acurácia e desempenho similar ao do APRI, para predição de FS e C, e similar ao do FIB-4, para predição de FA (Figura 2).

**Figura 2. Comparação de desempenho dos modelos metabonômicos, APRI e FIB-4, em 69 pacientes com hepatite C crônica, em Recife/PE, no período de 2012 a 2015. (A) Comparação de desempenho do MM e APRI para FS; (B) Comparação de desempenho do MM e FIB-4 para FA; (C) Comparação de desempenho do MM e APRI para cirrose.**



A AUROC do APRI para predição de FS e C foi 0,79 (IC 95%: 0,68-0,90) e 0,76 (IC 95%: 0,61-0,91), respectivamente, enquanto que a AUROC do FIB-4 para predição de FA foi de 0,84 (IC 95%: 0,74-0,95).

Dos 68 pacientes com determinação do índice APRI, 27 (39,7%) tinham valores do índice entre o ponto de corte inferior e superior ( $> 0,5$  e  $\leq 1,5$ ), a chamada zona cinza, quando não é possível excluir ou confirmar FS. Destes, 17 (63%) tinham FS pelo METAVIR. Todos os pacientes foram corretamente classificados pelo MM. Da mesma forma, dentre 25 (36,8%) pacientes com valores de FIB-4 na zona cinza ( $> 1,45$  e  $\leq 3,25$ ), o MM identificou corretamente 4 (16%) com FA. Desta forma, os MMs apresentaram acurácia de 100% para predição de FS e FA quando os valores do índice APRI e FIB-4 encontravam-se na zona cinza. Considerando-se 39,7% de pacientes não classificados e 11,8% de pacientes incorretamente classificados, utilizando-se apenas o APRI como preditor de FS, a biópsia hepática teria sido corretamente evitada em 48,5% dos pacientes, enquanto que, utilizando-se apenas o MM, a biópsia teria sido corretamente evitada em 95,7% dos pacientes. Em relação ao FIB-4, considerando-se 36,8% de pacientes não classificados e 8,8% de pacientes incorretamente classificados, utilizando-se

apenas esse índice como preditor de FA, a biópsia teria sido corretamente evitada em 54,4% dos pacientes, enquanto que o MM teria evitado a biópsia em 95,7% dos pacientes.

### **Discussão:**

Observou-se neste estudo que quanto mais avançado o estágio de fibrose hepática, maior a média de idade e maior o comprometimento da função hepática. De fato, esses achados indicam a progressão da fibrose e refletem a história natural da doença, que é principalmente fibrosante e que, em média, progride para cirrose em cerca de 30 anos, nos pacientes não tratados (22).

Os MMs desenvolvidos neste estudo para predição de FS, FA e C, em pacientes com HCC, apresentaram elevada acurácia, com valor de S, E e A acima de 90%. Na prática, considerando-se os intervalos de confiança, os resultados poderiam ser classificados como similares aos dos índices APRI e FIB-4. Entretanto, quando comparado ao APRI, o MM mostrou maior poder preditivo positivo pós teste para o diagnóstico da cirrose. Adicionalmente, o método foi capaz de discriminar corretamente todos os pacientes que apresentaram valores de APRI e FIB-4 na zona cinza para predição de FS e FA, respectivamente, quando estes índices não podem determinar ausência ou presença de fibrose. Isso poderia evitar grande número de biópsias nesses pacientes.

A metabolômica têm provado ser promissora na avaliação da gravidade da doença hepática e na cirrose e suas complicações. De fato, Amathieu et al. correlacionaram a gravidade da insuficiência hepática em pacientes com doença hepática crônica por álcool, medida pelo MELD, com deficiência no metabolismo de lípido, glicose e aminoácidos(23). Os mesmos autores, usando MM por OPS-DA, através de RMN H1 de soro, separaram 93 pacientes com cirrose alcoólica compensada de 30 pacientes com falência hepática crônica agudizada, com  $Q^2$  0,73 e  $R^2$  de 0,63 (24). Além disso, Jimènes et al., utilizando espectro de RMN H1 de soro de pacientes cirróticos, conseguiram discriminar aqueles com encefalopatia mínima daqueles sem encefalopatia. (25). Yu e colaboradores, estudando 24 pacientes com doença hepática crônica por hepatite B crônica e 23 controles saudáveis, desenvolveu modelo por cromatografia gasosa/espectrometria de massa que discriminou pacientes com maior grau de comprometimento hepático (MELD > 30) daqueles com MELD entre 20 e 30 e MELD < 20 (26) Achado similar foi descrito por Qi e colaboradores, que demonstraram que modelo por OPLS-DA, baseado em RMN H1 de amostras de soro, discriminou 30 pacientes com cirrose compensada de 30 pacientes com cirrose descompensada, com 85% de acurácia (27) .

Em relação à avaliação de fibrose hepática, as estratégias metabonômica e metabolômica também têm se mostrado promissoras. Sands et al., analisando espectro de RMN H1 de soro de controles saudáveis e de pacientes com HCC, construíram MM por OPLS-DA, utilizando classificação de fibrose por METAVIR e índice ELF como padrão de referência, e demonstraram que foi possível discriminar 6 pacientes sem fibrose (F0) de 34 pacientes com fibrose moderada (F1-F2) e de 22 pacientes com fibrose avançada (F3-F4), na coorte de validação (28). Embade et al., diferenciaram 27 pacientes com HCC e cirrose (F4) de 30 pacientes com HCC sem fibrose (F0), utilizando modelo PLS-DA, através de análise de espectro de soro por RMN H1 (29). Adicionalmente, Sarfaraz et al, utilizando espectroscopia de RMN H1 de soro de 45 pacientes com HCC e classificação histopatológica de fibrose, construíram modelo metabonômico por PLS-DA que discriminou pacientes F0-F2 de pacientes F3-F4, com bom poder preditivo ( $R^2$  0,673).(30).

Este estudo corrobora os achados desses autores e sugere que a estratégia metabonômica é capaz de discriminar pacientes com HCC e estágio de fibrose F0-F1 de pacientes F2-F4; pacientes F0-F2 de pacientes F3-F4 e pacientes F0-F3 de pacientes F4. Adicionalmente, o método mostrou-se capaz de discriminar corretamente todos os pacientes que apresentaram valores de APRI e FIB-4 na zona cinza, quando estes índices não conseguem determinar ausência ou presença de fibrose significativa e avançada, respectivamente.

Como limitação do estudo, o pequeno o número de pacientes testados pode restringir a aplicabilidade do método. Ressalta-se ainda que os modelos foram validados internamente, o que pode ter super-ajustado os resultados. Desta forma, são necessários novos estudos, com maior número de pacientes e validação externa dos modelos, a fim de confirmar seu desempenho, para posterior incorporação na prática clínica.

### **Conclusão:**

Neste estudo preliminar, a estratégia metabonômica foi capaz de discriminar fibrose hepática significativa, fibrose avançada e cirrose em pacientes com HCC, mostrando-se promissora como ferramenta não invasiva de estadiamento de fibrose hepática. O método apresentou elevada acurácia para o classificação de fibrose na zona cinza dos índices APRI e FIB-4, o que poderia evitar grande números de biópsias nesses pacientes.

### **Agradecimentos:**

Agradecemos ao CNPq e FACEPE, órgãos fomentadores da pesquisa em nosso país e estado.

**Referências:**

1. World Health Organization. Global Burden of Disease (GBD) for Hepatitis C. *J Clin Pharmacol* 2004;44(1):20–9.
2. Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010 : a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 2012;380:2095–128.
3. Brasil. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico-Hepatites Virais. Brasília, Ministério da Saúde 2015;1–25.
4. Ferreira PRA, Brandão-Mello CE, Estes C, Júnior FLG, Coelho HSM, Razavi H, et al. Disease burden of chronic hepatitis C in Brazil. *Brazilian J Infect Dis* 2015;19(4):363–8.
5. Rockey DC, Caldwell SH, Goodman ZD, Nelson RC, Smith AD. Liver biopsy. *Hepatology*. 2009;49(3):1017–44.
6. Regev A, Berho M, Jeffers LJ, Milikowski C, Molina EG, Pyrsopoulos NT, et al. Sampling Error and Intraobserver Variation in Liver Biopsy in Patients With Chronic HCV Infection. *Am J Gastroenterol*. 2002;97(10):2614–8.
7. Wai CT, Greenson JK, Fontana RJ, Kalbfleisch JD, Marrero J a., Conjeevaram HS, et al. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2003;38(2):518–26.
8. Sterling RK, Lissen E, Clumeck N, Sola R, Correa MC, Montaner J, et al. Development of a simple noninvasive index to predict significant fibrosis in patients with HIV/HCV coinfection. *Hepatology*. 2006;43(6):1317–25.
9. EASL, ALEH. EASL-ALEH Clinical Practice Guidelines: Non-invasive tests for evaluation of liver disease severity and prognosis. *J Hepatol* 2015;63:237–64.
10. Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. “Metabonomics”: understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica*. 1999;29(11):1181–9.
11. Dunn WB, Ellis DI. Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. *TrAC Trends Anal Chem* 2005;24(4):285–94.
12. Nicholson JK, Lindon JC. Metabonomics. *Nature*. 2008;455(23):1054–6.
13. Amathieu R. Nuclear magnetic resonance based metabolomics and liver diseases: Recent advances and future clinical applications. *World J Gastroenterol*. 2016;22(1):417–26.

14. Godoy MMG, Lopes EP a, Silva RO, Hallwass F, Koury LC a, Moura IM, et al. Hepatitis C virus infection diagnosis using metabonomics. *J Viral Hepat* . 2010;17(12):854–8.
15. Munshi SU, Taneja S, Bhavesh NS, Shastri J, Aggarwal R, Jameel S. Metabonomic analysis of hepatitis e patients shows deregulated metabolic cycles and abnormalities in amino acid metabolism. *J Viral Hepat*. 2011;18: 591-602
16. Shariff MI, Ladep NG, Cox IJ, Williams HR, Okeke E, Malu A, et al. Characterization of urinary biomarkers of hepatocellular carcinoma using magnetic resonance spectroscopy in a Nigerian population. *J Proteome Res* 2010;9:1096–103.
17. Shariff MIF, Gomaa AI, Cox IJ, Patel M, Williams HRT, Crossey MME, et al. Urinary metabolic biomarkers of hepatocellular carcinoma in an Egyptian population: A validation study. *J Proteome Res*. 2011;10(4):1828–36.
18. Gao H, Lu Q, Liu X, Cong H, Zhao L, Wang H, et al. Application of <sup>1</sup>H NMR-based metabonomics in the study of metabolic profiling of human hepatocellular carcinoma and liver cirrhosis. *Cancer Sci*. 2009;100(4):782–5.
19. Sackett DL. Evidence base of clinical diagnosis: The architecture of diagnostic research. *BMJ* 2002;324(7336):539–41.
20. Bedossa P, Poynard T, METAVIR Cooperative Study Group. An Algorithm for the Grading of Activity in Chronic Hepatitis C. *Hepatology*. 1996;24(2):289–93.
21. Xia J, Sinelnikov I V., Han B, Wishart DS. MetaboAnalyst 3.0--making metabolomics more meaningful. *Nucleic Acids Res* 2015;43(W1):W251-7.
22. Poynard T, Ratziu V, Benmanov Y, Di Martino V, Bedossa P, Opolon P. Fibrosis in patients with chronic hepatitis C: detection and significance. *Semin Liver Dis* 2000;20(1):47–55.
23. Amathieu R, Nahon P, Triba M, Bouchemal N, Trinchet J, Beaugrand M, et al. Metabolomic Approach by <sup>1</sup>H NMR Spectroscopy of Serum for the Assessment of Chronic Liver Failure in Patients with Cirrhosis. *J Proteome Res*. 2011;10:3239–45.
24. Amathieu R, Triba MN, Nahon P, Bouchemal N, Kamoun W, Haouache H, et al. Serum <sup>1</sup>H-NMR metabolomic fingerprints of acute-on-chronic liver failure in intensive care unit patients with alcoholic cirrhosis. *PLoS One* 2014;9(2):e89230.
25. Jiménez B, Montoliu C, Macintyre D a, Serra M a, Wassel A, Romero-gomez M, et al. Serum Metabolic Signature of Minimal Hepatic Encephalopathy by H-Nuclear Magnetic Resonance research articles. *J Proteome Res*. 2010;9(10):5180–7.
26. Yu K, Sheng G, Sheng J, Chen Y, Xu W, Liu X, et al. A metabonomic investigation on the biochemical perturbation in liver failure patients caused by hepatitis B virus. *J Proteome Res*. 2007;6(7):2413–9.

27. Qi SW, Tu ZG, Peng WJ, Wang LX, Ou-Yang X, Cai AJ, et al. <sup>1</sup>H NMR-based serum metabolic profiling in compensated and decompensated cirrhosis. *World J Gastroenterol*. 2012;18(3):285–90.
28. Sands CJ, Guha IN, Kyriakides M, Wright M, Beckonert O, Holmes E, et al. Metabolic Phenotyping for Enhanced Mechanistic Stratification of Chronic Hepatitis C-Induced Liver Fibrosis. *Am J Gastroenterol* 2014;110(1):159–69.
29. Embade N, Mariño Z, Diercks T, Cano A, Lens S, Cabrera D, et al. Metabolic characterization of advanced liver fibrosis in HCV patients as studied by serum <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy. *PLoS One* 2016;11(5):1–19.
30. Sarfaraz MO, Myers RP, Coffin CS, Gao Z-H, Shaheen AAM, Crotty PM, et al. A quantitative metabolomics profiling approach for the noninvasive assessment of liver histology in patients with chronic hepatitis C. *Clin Transl Med* 2016;5(1):33.

## 5.2- Resultados Suplementares

O intuito inicial da pesquisa era desenvolver MMs para predição do estágio de fibrose em pacientes com HCC atendidos em PE, e em seguida, validar os MMs em população de pacientes com HCC de outra área geográfica. Com este objetivo, decidiu-se testar os MMs construídos a partir de amostras de soro de pacientes de PE em uma população de pacientes com HCC atendidos em um centro de referência em hepatologia do RJ. Entretanto, a análise não supervisionada dos espectros de RMN H1 das amostras de soro de todos os pacientes por PCA, mostrou que havia diferenças metabólicas intrínsecas às populações, que as separavam em duas classes distintas (Apêndice D, Figura 1). Desta forma, os MMs desenvolvidos em pacientes de PE não se aplicavam para validação na população do RJ.

As principais características das duas populações são mostradas no Apêndice D, Tabela 1. Observa-se que os pacientes de PE apresentavam idade média superior e níveis mais elevados de glicose, além de níveis séricos de bilirrubina mais elevados, INR mais alargado e maior média do índice FIB-4, enquanto que os pacientes do RJ apresentavam níveis séricos mais elevados de AST, colesterol total e LDL. O percentual de pacientes com fibrose avançada foi superior em PE (40.6% em PE x 28,3% no RJ), visto que o estudo pernambucano incluiu pacientes com cirrose clinicamente diagnosticada, porém essa diferença não apresentou significância estatística.

Decidiu-se, então, criar MMs para predição de fibrose específicos para a população do RJ, que são mostrados no artigo a seguir.

### **5.3 – Validação de Modelos Metabonômicos por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio para Predição de Fibrose Hepática Significativa e Avançada em Pacientes com Hepatite C Crônica.**

**Autores:** Andrea Dória Batista<sup>1,3</sup>; Carlos Jonnatan Pimentel Barros<sup>2</sup>; Ronaldo Dionísio da Silva<sup>2</sup>; Joelma Carvalho Santos<sup>1</sup>; Maria Chiara Chindamo<sup>4</sup>; Cristiane Alves Villela-Nogueira<sup>4</sup>; Renata de Mello Perez<sup>4</sup>; Henrique Sérgio Moraes Coelho<sup>4</sup>; Ricardo Oliveira Silva<sup>2</sup>; Edmundo Pessoa de Almeida Lopes<sup>1,3</sup>

**Afiliação:**

- 1- Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical. Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.
- 2- Departamento de Química Fundamental. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.
- 3- Hospital de Clínicas. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.
- 4- Departamento de Clínica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

**Autor para correspondência:** Andrea Dória Batista. Endereço: Avenida Professor Moraes Rego, 135. Cidade Universitária, Recife/Pernambuco, CEP 50670-901. E-mail: adoria04@globo.com

**Palavras-chave:** Hepatite C/diagnóstico, fibrose hepática; biópsia/padrão de referência; biomarcadores/sangue; espectroscopia por ressonância magnética, metabolômica.

**Lista de Abreviaturas:** HCC: Hepatite C Crônica; RMN H1: ressonância magnética nuclear de hidrogênio; APRI: índice da relação aspartato aminotransferase sobre plaquetas; FIB-4: índice de fibrose baseado em quatro fatores; PCA: análise de componentes principais; LDA: análise discriminante linear; PLS-DA: análise discriminante por mínimos quadrados parciais; PC: componente principal; OPLS-DA: análise discriminante ortogonal por mínimos quadrados parciais; AUROC: área *under receiver operator characteristic*

**Conflito de interesse:** Nada a declarar

**Financiamento:** Não há.

**Contribuição dos autores:**

Conceito e desenho: Andrea Dória Batista; Tássia Brena Barroso Carneiro Costa; Ricardo Oliveira Silva; Edmundo Pessoa de Almeida Lopes.

Seleção de pacientes e procedimentos clínicos: Andrea Dória Batista; Joelma Carvalho Santos; Maria Chiara Chindamo; Cristiane Alves Villela-Nogueira, Renata de Mello Perez, Henrique Sérgio Moraes Coelho.

Otimização dos parâmetros espectrais, obtenção dos espectros de RMN e construção dos modelos metabonômicos: Carlos Jonnatan Pimentel Barros; Ronaldo Dionísio da Silva; Tássia Brena Barroso Carneiro Costa

Análise dos dados: Andrea Dória Batista; Carlos Jonnatan Pimentel Barros; Ronaldo Dionísio da Silva; Joelma Carvalho Santos; Maria Chiara Chindamo; Ricardo Oliveira Silva; Edmundo Pessoa de Almeida Lopes.

Redação do artigo: Andrea Dória Batista; Carlos Jonnatan Pimentel Barros

Revisão do artigo: Andrea Dória Batista; Maria Chiara Chindamo; Ricardo Oliveira Silva; Edmundo Pessoa de Almeida Lopes.

**Resumo: Introdução:** O padrão-ouro na avaliação de fibrose em pacientes com hepatite C crônica (HCC) é a biópsia hepática, método invasivo, sujeito a complicações e a erros. Alternativamente, biomarcadores vêm sendo testados. A metabonômica é uma estratégia de análise, que utiliza dados espectrais de RMN H1 para classificar biofluidos, em função do seu status bioquímico. **Objetivo:** Desenvolver modelos metabonômicos (MM), através de espectros de RMN H1 de amostras de soro, para predição de fibrose hepática significativa (FS) e avançada (FA) em pacientes com HCC, e comparar com os escores APRI e FIB-4, utilizando a biópsia como padrão de referência. **Métodos:** Dentre 180 pacientes incluídos, 126 (70%) constituíram a população de construção dos modelos e 54 (30%) a população de validação. Pacientes com diagnóstico de doença hepática por outra etiologia, coinfeção HBV/HIV ou ingestão excessiva de etanol foram excluídos. Espectros de RMN H1 foram obtidos utilizando o espectrômetro *Varian Unity 300*. Os MM foram construídos usando PLS-DA e LDA, a partir da matriz de escores da PCA, considerando FS ( $\text{METAVIR} \geq \text{F2}$ ) e FA ( $\text{METAVIR} \geq \text{F3}$ ) e o desempenho foi comparado ao dos índices APRI e FIB-4. **Resultados:** Cento e três pacientes (57,2%) apresentaram FS e 51 (28,3%) FA. Os MM validados externamente apresentaram sensibilidade e especificidade de 100% (IC 95%: 86,8-100%) e 100% (IC 95%: 87,7-100%), para predição de FS, e de 100% (IC 95%: 71,5-100%) e 100% (IC 95%: 91,8-100%), para predição de FA, com desempenho similar ao do APRI e FIB-4. Os MM classificaram corretamente 95 (54,3%) pacientes com valores intermediários de APRI (entre 0,5 e 1,5) e 76 (44,2%) com FIB-4 entre 1,45 e 3,25. **Conclusão:** Os MM desenvolvidos apresentaram elevada acurácia para predição de FS e FA em HCC, com a vantagem de classificar corretamente a fibrose na zona cinza do APRI e FIB-4, reduzindo a necessidade de biópsia nesses pacientes.

## **Introdução:**

Cerca de 130 a 170 milhões de pessoas no mundo estão cronicamente infectadas com o vírus da hepatite C (HCV) (1) e estima-se que cerca 500 mil indivíduos morreram em 2010 em decorrência de doenças relacionadas ao vírus, incluindo cirrose e carcinoma hepatocelular (CHC). (2) No Brasil, a prevalência estimada de hepatite C é 1.450.000 casos (3) e cerca de 8 mil mortes decorreram de doenças relacionadas ao HCV em 2013. (4) A fibrose hepática, resultante de infecção viral crônica, leva a alterações estruturais e funcionais do órgão, com aumento do risco de desenvolvimento da cirrose e suas complicações. (5,6)

O advento dos novos antivirais de ação direta, que atuam em diferentes alvos da replicação viral, mudou drasticamente o cenário do tratamento da hepatite C crônica. O uso combinado das novas drogas permite tratamento por via oral, bem tolerado, por período curto (12 a 24 semanas) e com baixo risco de resistência. A resposta virológica sustentada ocorre em mais de 95% dos pacientes (7,8), e está associada à redução de mortalidade em 2 a 3 vezes e redução do risco de CHC em 5 a 10 vezes, no período de 5 a 10 anos. (9) Os pacientes com fibrose significativa tem maior risco de progressão da doença. Por este motivo o tratamento está formalmente indicado nos pacientes a partir deste estágio de fibrose (7) Entretanto o tratamento não está amplamente disponível pelo sistema público de saúde no Brasil, sendo disponibilizado apenas para pacientes com fibrose hepática avançada (METAVIR  $\geq$ F3) e para aqueles em situação clínica especial, como os coinfectados, transplantados, renais crônicos ou com manifestação extra-hepática da doença (10). Desta forma, o diagnóstico acurado da fibrose significativa e avançada é importante na prática clínica dos serviços públicos de saúde, para determinar a necessidade e urgência do tratamento, e para monitorar complicações da doença.

A biópsia hepática ainda é considerada padrão-ouro na avaliação da fibrose hepática, porém o procedimento é invasivo, com complicações menores, principalmente dor, ocorrendo em 6,5% dos casos (11), complicações maiores, como sangramento moderado a severo, ocorrendo em 0,05 a 5,3% dos casos (12–14) e mortalidade em torno de 0,01% (12,15). Erro de amostragem na obtenção do espécime e variabilidade intra e inter-observador na avaliação histopatológica podem levar a resultados discordantes em 33% dos casos (16), tornando a biópsia um padrão de referência imperfeito. Por estes motivos, vários marcadores não invasivos de avaliação de fibrose, sorológicos e físicos, têm sido testados. Dentre os marcadores sorológicos, destacam-se o APRI e FIB-4, amplamente utilizados em pacientes com HCC, por serem não patenteados e baseados em parâmetros clínicos e laboratoriais facilmente obtidos. (17,18). De uma maneira geral, os marcadores sorológicos apresentam boa acurácia para excluir fibrose significativa e confirmar cirrose, porém não são hepato-específicos e falham no

diagnóstico da fibrose intermediária (19). O intervalo compreendido entre os pontos de corte inferior e superior dos índices é chamado de zona cinza, não sendo possível, nesses casos, excluir ou confirmar fibrose significativa ou avançada. Em metanálise incluindo 14 estudos e vários biomarcadores, incluindo APRI, Fibrotest®, índice Forns e *Enhanced Liver Fibrosis score*® (ELF), Parkes et al. demonstraram que apenas 30 a 35% dos pacientes são corretamente classificados com presença ou ausência de fibrose significativa, podendo dispensar a biópsia (20).

A metabonômica é definida como "uma medida quantitativa da resposta metabólica, dinâmica e multiparamétrica, de organismos vivos diante de modificações patológicas ou genéticas" (21). Em função da homeostase, a presença de uma condição patológica altera o perfil de metabólitos endógenos, o que pode ser monitorado pela espectroscopia de RMN H1, visto que a maioria dos metabólitos conhecidos contém átomos de hidrogênio (22). Desta forma, o método procura discriminar as amostras em grupos associados ao seu status bioquímico, sendo, portanto, específico para uma determinada doença (22,23). A análise dos metabólitos de um biofluido pode ser quantitativa ou qualitativa. Enquanto a metabonômica estuda o perfil bioquímico da amostra, a metabolômica procura identificar e quantificar os principais metabólitos determinantes deste perfil. O processamento e análise dos dados espectrais de RMN H1 utiliza técnicas estatísticas multivariadas (24,25) e o método tem mostrado grande potencial no diagnóstico de doenças, descoberta de novos biomarcadores e identificação de vias bioquímicas alteradas, devido à processos patológicos ou uso de drogas (26). Em nosso meio, Godoy et al., utilizando modelo metabonômico, construído a partir de espectro de RMN H1 de amostras de urina, conseguiram discriminar pacientes com HCC de indivíduos saudáveis (27). Em virtude das alterações bioquímicas que os mecanismos relacionados à fibrose hepática podem ocasionar, o objetivo deste estudo foi desenvolver modelos metabonômicos, utilizando espectro de RMN H1 de amostras de soro, como método não invasivo para predição de fibrose hepática significativa e avançada em pacientes com HCC, e comparar com os índices APRI e FIB-4.

## **Pacientes e Métodos:**

### **Tipo de estudo e seleção de pacientes:**

Trata-se de estudo transversal, do tipo validação de teste diagnóstico fase II (28), com inclusão prospectiva, por demanda espontânea, de pacientes com idade superior a 18 anos, diagnóstico de HCC (anti-HCV e HCV-RNA detectáveis no soro) e que realizaram biópsia hepática percutânea no momento da inclusão no estudo, como rotina de avaliação pré-tratamento. Os pacientes fizeram parte de um estudo desenvolvido no ambulatório de Hepatologia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho/Universidade Federal do Rio de Janeiro (HUCFF/UFRJ), entre 2010 e 2014 (29). Pacientes com tratamento antiviral prévio, doença hepática autoimune, metabólica ou colestática, coinfeção com o vírus da hepatite B ou vírus da imunodeficiência humana, abuso de álcool ou transplante hepático foram excluídos.

### **Alocação dos pacientes:**

Os pacientes foram alocados em dois grupos. O primeiro grupo, denominado modelo, incluiu 70% pacientes e foi utilizado para construção dos MM. O segundo grupo, denominado validação, incluiu 30% pacientes e foi utilizado para validação externa dos MM.

Os pacientes foram ainda agrupados de acordo com o estágio de fibrose hepática, pela classificação histopatológica METAVIR (30) em: fibrose significativa (FS: METAVIR  $\geq$ F2) e fibrose avançada (FA: METAVIR  $\geq$ F3).

### **Análise laboratorial, determinação do APRI e FIB-4:**

Os pacientes realizaram coleta de sangue em jejum, por punção de veia periférica, no dia da realização da biópsia ou com intervalo máximo de 3 meses, que foi centrifugado para obtenção de soro, estocado a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Os testes laboratoriais foram realizados por método automatizado no laboratório do HUCFF/UFRJ. A pesquisa do RNA-HCV e genótipo foram realizados por técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real, utilizando COBAS<sup>®</sup> AmpliPrep/COBAS<sup>®</sup> TaqMan<sup>®</sup> (versão 2, Roche, Pleasanton, CA, EUA) com o limite de 15 UI/mL de detecção.

Os índices APRI e FIB-4 foram calculados de acordo com as fórmulas anteriormente descritas (17,31). Os pontos de corte  $\leq 0,5$  e  $> 1,5$  do APRI foram utilizados para o excluir e confirmar FS. Para o FIB-4, os pontos de corte  $\leq 1,45$  e  $> 3,25$  foram utilizados para excluir e confirmar FA.

### **Análise de Ressonância Magnética Nuclear:**

Amostras de soro estocadas a  $-70^{\circ}\text{C}$ , foram descongeladas à temperatura ambiente, e, em seguida, 200  $\mu\text{L}$  de  $\text{D}_2\text{O}$  (água deuterada) foram adicionados à 400  $\mu\text{L}$  de cada amostra, que, após homogeneização, foram transferidas para tubos de RMN de 5 mm. Os espectros de RMN foram obtidos utilizando espectrômetro *Varian Unity Plus 300*, operando a 299,95 MHz para núcleo  $^1\text{H}$ , a 300 K. As amostras foram analisadas usando uma sequência de pulsos com supressão da ressonância da água (PRESAT), utilizando tempo de pré-saturação igual a 2,0 s, tempo de aquisição igual a 1704 s, 128 repetições e largura espectral de 4,8 kHz. Sequência *Carr-Purcell-Meiboom-Gill* (CPMG) foi utilizada como filtro T2. Cada decaimento livre da indução foi multiplicado por uma função exponencial de 0,3 Hz antes da transformação de Fourier. O sinal atribuído ao grupo metila do lactato, em  $\delta$  1,33 ppm, foi utilizado como referência interna de deslocamento químico. A linha de base dos espectros foi corrigida manualmente.

### **Biópsias hepáticas:**

As biópsias hepáticas percutâneas, guiadas por US, foram realizadas com agulha *Tru Cut* 14 ou 16G (TSK Laboratório, Akasaka, Japão), obtendo fragmento de até 20 mm por punção. Fragmentos com extensão menor que 10 mm ou contendo menos de 6 espaços porta foram considerados inadequados. Os espécimes foram fixados em solução de formol a 10%, adicionados a bloco de parafina, cortados com espessura de 5  $\mu\text{m}$ , e então corados por hematoxilina e eosina, ácido periódico-Schiff, reticulina, tricrômico de Masson e Picrosirius.

A fibrose foi classificada de F0 a F4, segundo METAVIR (30), por patologista experiente, cego em relação aos resultados clínicos e sorológicos.

### **Análise estatística da casuística:**

A análise descritiva e comparativa da casuística foi realizada com os programas *STATA* (versão 12.0, *StataCorp*, *College Station*, Texas), *GraphPad Prism* (versão 5.0 para Windows, *GraphPad Software*, La Jolla, California) e Excel 2010 (Microsoft Office 2010). As variáveis qualitativas foram apresentadas como frequências absolutas e relativas. A normalidade das variáveis foi verificada usando o teste de Kolmogorov-Smirnov. As variáveis quantitativas foram expressas como médias e desvio padrão ou medianas e percentil 25 e 75. O teste de Qui-quadrado foi usado para comparar variáveis categóricas, aplicando o teste exato de Fisher quando necessário. Para a análise comparativa de medidas contínuas não paramétricas, utilizou-

se o teste de Mann-Whitney, e para medidas paramétricas, o teste T de Student. Todos os testes foram aplicados com 95% de confiança (valor de  $p \leq 0,05$ ).

### **Análise estatística multivariada dos dados espectrais e desenvolvimento dos MM:**

Todos os espectros foram processados usando o software *MestreNova* (versão 9.0.1, *MestreLab Research*). Os espectros foram divididos em 250 regiões de 0,04 ppm denominadas “bins”, e usadas para construir uma matriz de amostras versus variáveis (bins). A região contendo os bins centrados entre  $\delta$  4,52 - 5.12 ppm foi excluída para eliminar o sinal residual de água. Os espectros foram normalizados, usando a seguinte expressão:

$$x = \frac{x_i - \bar{x}}{\sigma}$$

Onde  $x_i$  é a intensidade em cada bin, enquanto  $\bar{x}$  é a média aritmética das intensidades observadas nos bins, e  $\sigma$  é o desvio-padrão.

Na construção dos MM, o formalismo PCA foi aplicado, inicialmente, a todo o conjunto de dados, para explorar agrupamentos inerentes e identificar a presença de *outliers*. A PCA não apresentou agrupamento nas classes de interesse. Foram utilizados, então, os formalismos supervisionados PLS-DA e LDA para construir os modelos. Dois modelos PLS-DA, para predição de FS e FA, foram construídos utilizando-se a matriz de dados normalizada, na plataforma online *MetaboAnalyst* 3.0 (32). Os modelos LDA foram construídos no software *STATISTICA* (versão 10.0, Quest software), a partir da matriz de escores da PCA como dado de entrada e utilizando o lambda de Wilks, para selecionar os componentes principais (PCs) a serem utilizadas nas funções discriminantes. Com estes modelos, uma melhor separação dos grupos foi conseguida. Dois modelos LDA foram construídos: para a predição de FS, utilizando três PCs e para predição de FA, também utilizando três PCs.

### **Análise de desempenho dos MM e índices APRI e FIB-4:**

Os MM LDA foram testados na população modelo por validação cruzada “*leave-one-out-cross-validation*” (LOOCV) e na população validação por validação externa. Tabelas de contingência 2x2 foram utilizadas para o cálculo de sensibilidade (S), especificidade (E), razão de verossimilhança positiva (RVP), razão de verossimilhança negativa (RVN), e acurácia (A) dos MM e dos índices APRI, com os pontos de corte inferior de 0,5 e superior de 1,5, e FIB-4, com pontos de corte 1,45 e 3,25. Uma curva ROC foi construída para os índices APRI e FIB-4.

**Considerações Éticas:**

Todos os participantes assinaram termo de consentimento livre e esclarecido. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde/ Universidade Federal de Pernambuco, sob o número 93.127/2012

**Resultados:**

Foram incluídos 180 pacientes, 59,4% do sexo feminino, com idade mediana de 54 anos. Em 151 pacientes o genótipo foi determinado, sendo mais frequente o genótipo 1a, presente em 57 (37,7%) pacientes, seguido do 1b em 52 (34,4%), genótipo 1 em 23 (15,2%), 3a em 14 (9,3%), genótipo 2 em 3 (2%) e genótipo 3 em 2 (1,3%) pacientes.

O grupo modelo incluiu 126 (70%) pacientes e o grupo validação incluiu 54 (30%) pacientes. A Tabela 1 mostra que as principais características clínicas e laboratoriais dos dois grupos foram semelhantes.

**Tabela 1. Principais características demográficas e laboratoriais de 180 pacientes com hepatite C crônica, de acordo com o tipo de população (modelo e validação) no Rio de Janeiro/RJ, no período de 2010 a 2014.**

Características	Total (n=180)	Modelo (n=126)	Validação (n=54)	<i>p</i>
Sexo (n, %)				
Masculino	73 (40,6%)	56 (44,4%)	17 (31,5%)	0,105 <sup>a</sup>
Feminino	107 (59,4%)	70 (55,6%)	37 (68,5%)	
IMC (kg/m <sup>2</sup> )*	26,7 ± 5,1	26,7 ± 5,26	26,7 ± 4,56	0,980 <sup>b</sup>
Idade (anos)**	54 (47-59,8)	55 (48-60)	53,5 (43-59,2)	0,213 <sup>c</sup>
AST (U/L)**	51 (38-78)	53 (38,2-83,2)	48 (33-67,5)	0,085 <sup>c</sup>
ALT (U/L)**	74,5 (57,8-126,2)	76,5 (57-127)	70,5 (58-116,5)	0,605 <sup>c</sup>
GGT (U/L)**	87 (48-145)	88 (49-154)	78 (44-144)	0,585 <sup>c</sup>
Plaquetas (10 <sup>9</sup> /mm <sup>3</sup> )*	202 ± 62	200 ± 62	216 ± 62	0,110 <sup>b</sup>
Albumina (g/dl)**	4 (3,8-4,2)	4,1 (3,8-4,3)	4,0 (3,8-4,2)	0,490 <sup>c</sup>
Bilirrubina total (mg/dL)**	0,6 (0,40-0,70)	0,6 (0,4-0,7)	0,5 (0,4-0,7)	0,233 <sup>c</sup>
Fosfatase alcalina (U/L)**	96,5 (78-119,2)	98 (77-127)	95 (82-112)	0,566 <sup>c</sup>
INR**	1,00 (1,00-1,02)	1,00 (1,00-1,05)	1,00 (1,00-1,01)	0,585 <sup>c</sup>
Extensão do fragmento hepático (cm)*	1,52 ± 0,36	1,53 ± 0,34	1,52 ± 0,41	0,929 <sup>b</sup>
Número de EP*	15,9 ± 5,54	15,83 ± 5,19	16,31 ± 6,30	0,608 <sup>b</sup>
Fibrose significativa (n, %)				
F2-F4	103 (57,2%)	77 (61,1%)	26 (48,1%)	0,107 <sup>a</sup>
Fibrose avançada (n, %)				
F3-F4	51 (28,3%)	40 (31,7%)	11 (20,4%)	0,121 <sup>a</sup>

\*Média ± desvio padrão; \*\*Mediana (P<sub>25</sub>-P<sub>75</sub>); <sup>a</sup>Teste Qui-quadrado; <sup>b</sup>Teste T; <sup>c</sup>Teste de Mann-Whitney; IMC: Índice de massa corporal; ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase; GGT: gama glutamil transferase; INR: Razão normalizada internacional; EP: espaços porta.

O fragmento hepático apresentou tamanho médio de 15,2 mm ± 3,6 mm, com 15,98 ± 5,54 espaços portais. O estágio de fibrose pela classificação METAVIR foi assim distribuído: F0 em 3 (1,7%) pacientes; F1 em 74 (41,1%); F2 em 52 (28,9%); F3 em 37 (20,6%) e F4 em 14 (7,8%). Portanto, 103 (57,2%) pacientes foram classificados como FS e 51 (28,3%) como FA.

Os pacientes com fibrose significativa e avançada apresentaram idade mais avançada, níveis mais elevados de AST, ALT, GGT e FA, valores de APRI e FIB-4 mais elevados, além de menor contagem de plaquetas, em relação aos grupos com menor estágio de fibrose. Os pacientes com fibrose avançada apresentaram ainda maior relação AST/ALT, níveis mais elevados de BT e maior valor de INR, em relação aos pacientes com menor estágio de fibrose (Tabela 2).

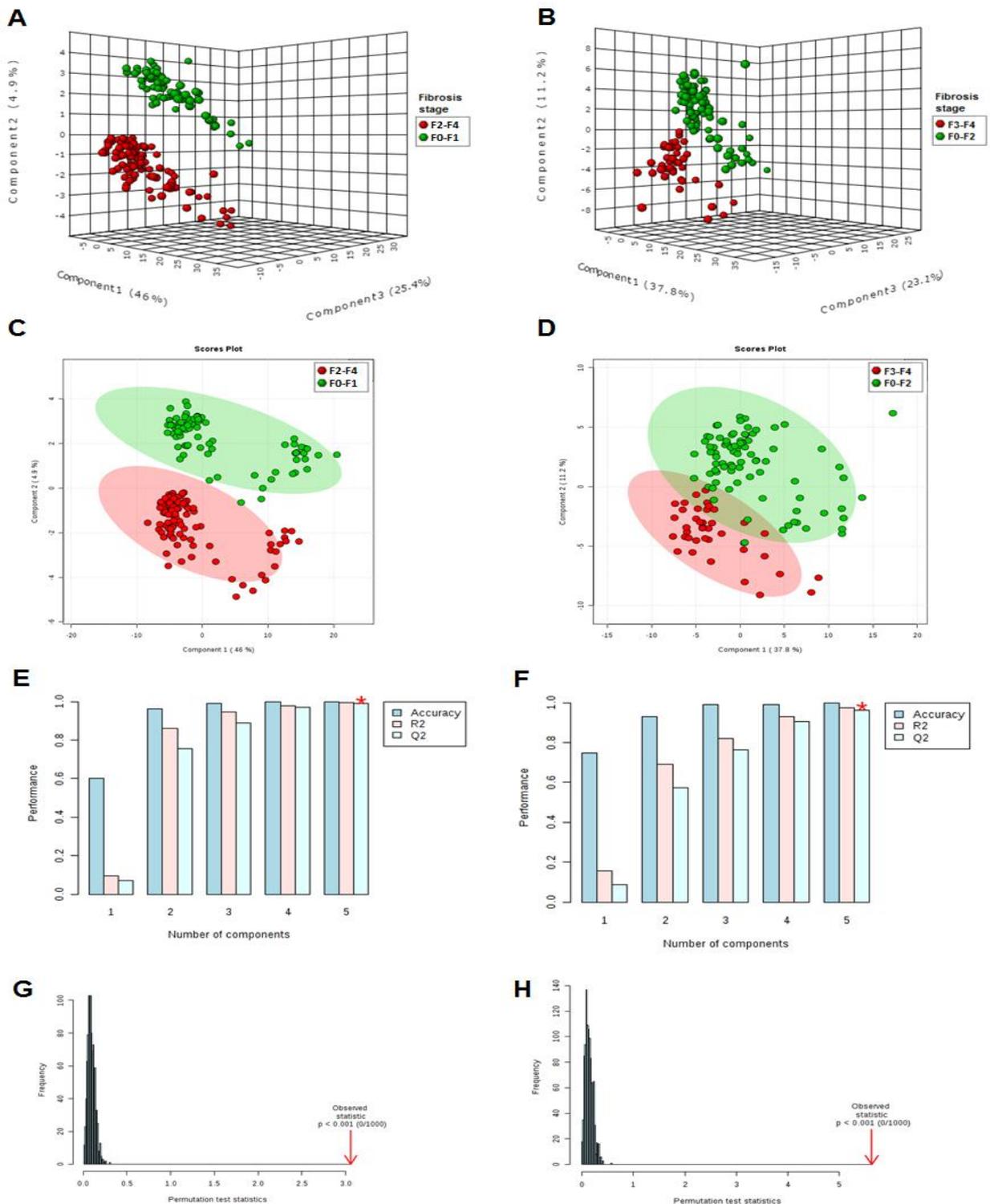
**Tabela 2. Principais características demográficas e laboratoriais de 180 pacientes com hepatite C crônica, de acordo com o grupo de fibrose, no Rio de Janeiro/RJ, no período de 2010 a 2014.**

Características	Grupo de fibrose		p
	Significativa ( $\geq$ F2) n = 103	Não significativa (<F2) n = 77	
Sexo (M/F, %)	43/60 (41,7/58,3)	30/47 (39,0/61,0)	0,706 <sup>a</sup>
IMC (kg/m <sup>2</sup> )*	26,8 ± 5,2	26,6 ± 4,88	0,832 <sup>b</sup>
Idade (anos)**	57 (52-62)	50 (37-56)	<0,0001 <sup>c</sup>
AST (U/L)**	57,5 (44-105,5)	45 (32-56)	<0,0001 <sup>c</sup>
ALT (U/L)**	87 (64,3-152)	68 (53-87)	0,001 <sup>c</sup>
AST/ALT*	0,67 ± 0,23	0,68 ± 0,22	0,880 <sup>b</sup>
GGT (U/L)**	106 (57-161)	60 (39,5-10,5)	<0,0001 <sup>c</sup>
Plaquetas (10 <sup>9</sup> /mm <sup>3</sup> )*	185 ± 53	230 ± 64	<0,0001 <sup>b</sup>
Albumina (g/dL)**	4,0 (3,7-4,2)	4,1 (3,9-4,3)	0,023 <sup>c</sup>
BT (mg/dL)**	0,60 (0,50-0,75)	0,50 (0,40-0,70)	0,209 <sup>c</sup>
FA (U/L)**	102 (83-130,5)	89 (71-107,5)	0,005 <sup>c</sup>
INR**	1,00 (1,00-1,05)	1,00 (1,00-1,00)	0,073 <sup>c</sup>
APRI**	0,95 (0,62-1,61)	0,55 (0,36-0,77)	<0,0001 <sup>c</sup>
FIB-4**	2,20 (1,48-3,23)	1,17 (0,77-1,63)	<0,0001 <sup>c</sup>
	Avançada ( $\geq$ F3) n = 51	Não avançada (<F3) n = 129	
Sexo (M/F, %)	19/32 (37,3/62,7)	54/75 (41,9/58,1)	0,571 <sup>a</sup>
IMC (kg/m <sup>2</sup> )*	57 (53-61)	53 (45-59)	0,014 <sup>c</sup>
Idade (anos)*	27,5 ± 5,8	26,3 ± 4,7	0,180 <sup>b</sup>
AST (U/L)**	79,5 (46,8-140,3)	48 (36-63)	<0,0001 <sup>c</sup>
ALT (U/L)**	95 (66-181)	71 (55-103,5)	0,001 <sup>c</sup>
AST/ALT**	0,70 (0,61-0,92)	0,63 (0,53-0,74)	0,001 <sup>c</sup>
GGT (U/L)**	126,5 (88,3-224,5)	65,5 (44-120,5)	<0,0001 <sup>c</sup>
Plaquetas (10 <sup>9</sup> /mm <sup>3</sup> )*	167 ± 52	220 ± 59	<0,0001 <sup>b</sup>
Albumina (g/dL)**	3,9 (3,6-4,1)	4,1 (3,9-4,3)	0,001 <sup>c</sup>
BT (mg/dL)**	0,60 (0,50-0,80)	0,50 (0,40-0,70)	0,027 <sup>c</sup>
FA (U/L)**	102,5 (76,8-131,2)	93 (72,2-114)	0,010 <sup>c</sup>
INR**	1,00 (1,00-1,09)	1,00 (1,00-1,00)	0,014 <sup>c</sup>
APRI**	1,26 (0,80-2,84)	0,64 (0,38-0,94)	<0,0001 <sup>c</sup>
FIB-4**	2,95 (1,74-4,02)	1,35 (0,84-1,98)	<0,0001 <sup>c</sup>

\*Média ± desvio padrão; \*\*Mediana (P<sub>25</sub>-P<sub>75</sub>); <sup>a</sup>Teste Qui-quadrado; <sup>b</sup>Teste T; <sup>c</sup>Teste de Mann-Whitney; IMC: Índice de massa corporal; ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase; GGT: gama glutamil transferase; FA: fostase alcalina; BT: bilirrubina total; INR: Razão normalizada internacional; APRI: índice da relação aspartato aminotransferase sobre plaquetas; FIB-4: índice de fibrose baseado em quatro fatores; EP: espaços porta.

A Figura 1 apresenta os resultados dos MM, construídos com o formalismo PLS-DA, para predição de FS e FA. O MM para predição de FS mostrou uma clara discriminação entre as amostras quando foram utilizadas duas (Figura 1, C) e três componentes latentes (Figura 1, A). A figura de mérito do modelo com 5 componentes latentes mostrou acurácia de 100%. O gráfico de calibração, com o coeficiente de determinação  $R^2$ , apresenta os valores previstos pelo modelo versus os valores reais, e o gráfico da validação cruzada, com o coeficiente de determinação  $Q^2$ , apresenta os valores previstos pelo modelo (com a retirada de uma ou mais amostras) versus os valores reais. Um modelo PLS-DA com alto poder discriminatório apresenta valores de  $R^2$  e  $Q^2$  próximos de 1. O MM para FS obteve  $R^2$  e  $Q^2 \approx 0,98$ , sugerindo alto poder preditivo (Figura 1, E). O gráfico de teste com até 1000 permutações, mostrou  $p \leq 0,001$ , indicando que nenhuma das distribuições formadas pelos dados permutados foi melhor do que a estatística observada com base nos dados originais (Figura 1, G).

**Figura 1. Análise PLS-DA dos modelos metabonômicos para predição de fibrose significativa e avançada em 126 pacientes com hepatite C crônica, no Rio de Janeiro/RJ, no período de 2010 a 2014.**



Modelos PLS-DA para FS (A, C, E, G) e avançada (B, D, F, H). Gráfico de escores 3D (A, B); Gráfico de escores 2D (C, D). Validação cruzada utilizando diferentes números de componentes latentes para classificação do modelo metabonômico com acurácia=1,0/1,0; R<sup>2</sup>=0,98/0,97; Q<sup>2</sup>=0,98/0,96, utilizando 5 componentes latentes (D, F); Estatísticas do teste de permutação para 1000 permutações com estatística observada do modelo de predição da acurácia com p < 0,001 (G, H).

Os resultados do MM para predição de FS, construído usando o formalismo LDA e validado por LOOCV e externamente, são apresentados na Tabela 3 e foram comparados com aqueles observados usando o índice APRI, com pontos de corte 0,5 e 1,5. O MM foi capaz de identificar todos os pacientes com FS tanto no grupo modelo como no grupo validação, com S de 100% (IC 95%: 95,3-100%) no grupo modelo, superior ao APRI com ponto de corte 0,5, que apresentou S de 85,7% (IC 95%: 77,2-92%), e S de 100% (IC95%: 86,8-100%) no grupo validação, similar à do APRI.

**Tabela 3. Desempenho dos modelos metabonômicos, APRI e FIB-4 para predição de fibrose significativa e avançada em pacientes com hepatite C crônica, no Rio de Janeiro/RJ, no período de 2010 a 2014.**

Fibrose significativa												
Modelo (n=126)	Biópsia		<i>p</i> <sup>a</sup>	Sensibilidade		Especificidade		RVP		RVN		A
	F2-F4	F0-F1		(%)	IC <sub>95%</sub>	(%)	IC <sub>95%</sub>	IC <sub>95%</sub>	IC <sub>95%</sub>	IC <sub>95%</sub>	(%)	
≥ F2	77	0	<0,001	<b>100</b>	95,3-100	<b>100</b>	92,8-100	154,4*	9,8-2447,6	0,01*	0,001-0,2	<b>100</b>
< F2	0	49										
<b>Validação (n=54)</b>												
≥ F2	26	0	<0,001	<b>100</b>	86,8-100	<b>100</b>	87,7-100	56,9*	3,7-888,9	0,02*	0,001-0,3	<b>100</b>
< F2	0	28										
<b>APRI (n=175)</b>												
> 0,5	85	41	<0,001 <sup>b</sup>	<b>85,9</b>	77,4-92,0	46,0	34,6-57,9	1,59	1,3-2,0	0,31	0,2-0,5	<b>68,6</b>
≤ 0,5	14	35										
> 1,5	28	3	<0,001	28,3	19,7-38,2	<b>96,0</b>	88,9-99,2	7,16	2,3-22,7	0,75	0,7-0,9	57,7
≤ 1,5	71	73										
Fibrose avançada												
Modelo (n=126)	Biópsia		<i>p</i> <sup>a</sup>	Sensibilidade		Especificidade		RVP		RVN		A
	F3-F4	F0-F2		(%)	IC <sub>95%</sub>	(%)	IC <sub>95%</sub>	IC <sub>95%</sub>	IC <sub>95%</sub>	IC <sub>95%</sub>	(%)	
≥ F3	40	1	<0,001	<b>100</b>	91,2-100	<b>98,8</b>	93,7-99,9	57,3*	11,7-280,1	0,01*	0,001-0,2	<b>99,2</b>
< F3	0	85										
<b>Validação (n=54)</b>												
≥ F3	11	0	<0,001	<b>100</b>	71,5-100	<b>100</b>	91,8-100	84,3*	5,4-1330,5	0,04*	0,003-0,6	<b>99,2</b>
< F3	0	43										
<b>FIB-4 (n=172)</b>												
> 1,45	43	55	<0,001 <sup>b</sup>	<b>86,0</b>	73,3-94,2	54,9	45,7-63,9	1,91	1,5-2,4	0,26	0,1-0,5	64,0
≤ 1,45	7	67										
> 3,25	19	3	<0,001	38,0	24,7-52,8	<b>97,5</b>	93,0-99,5	15,5	4,8-49,9	0,64	0,5-0,8	<b>80,2</b>
≤ 3,25	31	119										

<sup>a</sup>Teste Exato de Fisher; <sup>b</sup>Teste do qui-quadrado; \*Valor estimado; RVP: Razão de Verossimilhança Positiva; RVN: Razão de Verossimilhança Negativa. A: Acurácia.

A razão de verossimilhança indica a razão entre a probabilidade de resultados positivos (RVP) ou resultados negativos (RVN) em pacientes com fibrose, e a probabilidade do mesmo resultado em pacientes sem fibrose, e foi utilizada por não depender da prevalência do estágio de fibrose na população em estudo, fornecendo um valor de predição do teste mais fidedigno para esta análise. Considera-se que um teste tem bom poder preditivo positivo quando  $RVP > 10$  e bom poder preditivo negativo quando  $RVN < 0,1$ .

A RVN para excluir FS do MM foi 0,02 (IC95%: 0,01-0,3) para o grupo validação, indicando que, dado que o teste é negativo pelo MM, a probabilidade de ausência de FS é 50 vezes a probabilidade de presença de FS. A RVN do APRI  $\leq 0,5$  foi de 0,31 (IC95%: 0,2-0,5), indicando que, dado que o teste é negativo pelo APRI, a probabilidade de ausência de FS é 3,2 vezes a probabilidade de presença de FS. Este resultado sugere superioridade do MM em relação ao APRI para exclusão de FS, porém, pelo IC, é considerado similar ao do APRI. Uma validação com maior número de pacientes poderia confirmar esta superioridade. Para predição de presença FS, no grupo validação, o MM apresentou E de 100% (IC95%: 87,7-100%) e RVP 56,9 (IC95%: 3,7-888,9), desempenho similar ao APRI 1,5, que mostrou E de 96% (IC95%: 88,8-99,2%) e RVP 7,14 (IC95%: 2,3-22,6) para valores  $> 1,5$ . A AUROC do APRI para predição de FS foi de 0,76 (IC95%: 0,68-0,83).

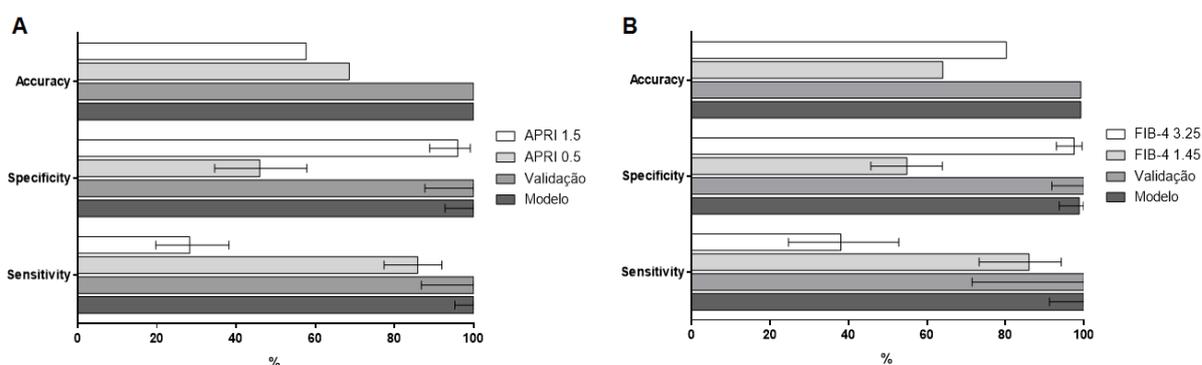
Quanto à FA, a Figura 1 B, D, F e H mostra que o modelo PLS-DA discriminou bem as amostras, usando três componentes latentes (Figura 1, B). As figuras de mérito, com cinco componentes latentes, resultaram em 100% de acurácia,  $R^2$  de 0,97 e  $Q^2$  de 0,96, demonstrando alto valor preditivo (Figura 1, F). Também foram realizados testes com até 1000 permutações, que indicaram, com  $p < 0,001$ , que nenhum modelo permutado apresentou resultado melhor que o modelo original (Figura 1, H).

O modelo LDA para predição de FA também diagnosticou corretamente todos os pacientes com e sem FA, no grupo validação, e errou apenas um caso no grupo modelo (Tabela 3). Para predição de ausência de FA, o MM, no grupo validação, mostrou S de 100% (IC95%: 71,5-100%) e RVN 0,04 (IC95%: 0,003-0,6), desempenho similar ao do FIB-4  $< 1,45$ , que apresentou S de 85,7% (IC95%: 72,8-94,1%) e RVN 0,26 (IC95%: 0,1-0,5). Da mesma forma, para predição de presença de FA, no grupo validação, o MM apresentou E de 100% (IC95%: 91,8-100%) e RVP 84,3 (IC95%: 5,4-1330). Esses resultados foram considerados similares aos obtidos com FIB-4  $> 3,25$ , que apresentou E de 97,5% (IC95%: 92,9-99,5%) e RVP 15,6 (IC95%: 4,9-50,5). A AUROC do FIB-4 para predição de FA foi 0,80 (IC95%: 0,73-0,88).

A fim de comparar o desempenho destes três métodos não invasivos para predição de FS e FA, seus valores de S, E e acurácia são mostrados na Figura 2. De uma forma geral, os

MM apresentaram elevada acurácia, com desempenho similar ao do APRI, para predição de FS, e ao FIB-4, para predição de FA.

**Figura 2. Comparação de desempenho dos modelos metabonômicos, APRI e FIB-4 nas populações modelo e validação, em pacientes com hepatite C crônica, no Rio de Janeiro/RJ, no período de 2010 a 2014.**



Legenda: (A) Comparação de desempenho do MM e APRI para predição de FS. (B) Comparação de desempenho do MM e FIB-4 para predição de fibrose avançada.

Dos 175 pacientes com determinação do APRI, 95 (54,3%) apresentavam valores na zona cinza ( $> 0,5$  e  $\leq 1,5$ ), quando não é possível excluir ou confirmar FS. Destes, 57 apresentavam FS pela classificação histopatológica. O MM classificou corretamente todos os casos. Da mesma forma, dos 172 pacientes com determinação de FIB-4, 76 (44,2%) apresentavam valores na zona cinza ( $> 1,45$  e  $\leq 3,25$ ). Destes, 25 apresentavam FA. O MM também classificou corretamente todos os casos. Desta forma, o MM apresentou acurácia de 100% para predição de FS, quando os valores do índice APRI encontravam-se na zona cinza, o mesmo ocorrendo para predição de FA, em relação aos valores intermediários do índice FIB-4. Considerando-se que 54,3% dos pacientes não foram classificados pelo APRI e que, dos pacientes com valores abaixo e acima dos pontos de corte inferior e superior, 9,8% foram classificados incorretamente, utilizando-se apenas o APRI como preditor de FS, a biópsia hepática teria sido corretamente evitada em apenas 35,7% dos pacientes. Em relação ao FIB-4, 44,2% dos pacientes não foram classificados e 5,8% foram incorretamente classificados. Desta forma, utilizando-se apenas o FIB-4 como preditor de FA, a biópsia hepática teria sido corretamente evitada em 50% dos pacientes. Ao contrário, os MM não apresentaram nenhum erro de classificação na população no grupo validação. Portanto, utilizando-se apenas os MM como preditores de FS e FA, a biópsia teria sido evitada em 100% dos pacientes deste grupo.

### **Discussão:**

Cento e três pacientes (57,2%) mostraram estágio de fibrose F2-F4, similar ao descrito por de Oliveira et al. que, em estudo com 525 pacientes brasileiros com HCC, demonstraram que 68% apresentam fibrose significativa (33). Observou-se neste estudo que, quanto mais avançado o estágio de fibrose hepática, maior a média de idade e, evidentemente, maior comprometimento da função hepática, representada pelo alargamento do INR, níveis séricos superiores de bilirrubina e inferiores de plaquetas e albumina, o que indica a progressão da fibrose. Achados que refletem a história natural da doença, que é principalmente fibrosante e que, em média, progride para cirrose em cerca de 30 anos, nos pacientes não tratados (34).

A qualidade e a confiabilidade da análise histopatológica dependem da largura e extensão do fragmento. Visto que o fragmento de biópsia por agulha representa 1/50.000 do órgão total, o potencial de erro de amostragem é substancial. O fragmento hepático obtido nesse estudo apresentou extensão e número de espaços porta dentro da média encontrada na literatura (35). Apesar de um estudo, usando modelagem gerada por computador, sugerir que o fragmento de 15 mm está associado à erro de classificação em 35% dos casos, enquanto o fragmento de 25 mm, considerado ideal, está associado à erro de classificação em 25% dos casos (36), Poynard et al. demonstraram que, na prática, fragmento hepático com extensão acima de 20 mm só é obtida em 14% dos pacientes com HCC (37). Em uma revisão sistemática com 10.027 biópsias hepáticas percutâneas, Cholongitas et al. mostraram que o fragmento hepático médio tem  $17,7 \text{ mm} \pm 5,8 \text{ mm}$  de extensão e  $7,5 \pm 3,4$  espaços portais completos (35). Além disso, estudo com 352 pacientes com HCC, mostrou que fragmento com extensão mínima de 15 mm e contendo mais de 5 espaços portais é adequado para diagnóstico da fibrose significativa (38).

Nesta casuística, o APRI mostrou acurácia moderada para o diagnóstico da fibrose significativa [AUROC de 0,76 (IC95%: 0,68-0,83)]. Esta acurácia é um pouco inferior à descrita por Wai et al., de 0,88 na população de validação do estudo (17), mas a mesma descrita em metanálise com 22 estudos e 4266 pacientes, que revelou AUROC 0,76 para o diagnóstico da fibrose significativa (39). Em estudos envolvendo pacientes brasileiros, o desempenho do método foi superior para predição de cirrose, com AUROC variando de 0,84 a 0,82, que para fibrose significativa, com AUROC variando de 0,76 a 0,92 (40–43).

O FIB-4 apresentou bom desempenho para o diagnóstico de fibrose avançada nos pacientes estudados, com AUROC 0,80 (IC95%: 0,73-0,88). O índice foi inicialmente descrito para pacientes coinfectados HCV/HIV, com AUROC 0,76 para o diagnóstico da fibrose avançada, utilizando pontos de corte inferior e superior de 1,45 e 3,25. (18). Estudo de validação posterior, em pacientes mono infectados pelo HCV, mostrou AUROC de 0,91 para cirrose, e

72,8% dos pacientes com valores  $\leq 1,45$  e  $> 3,25$  corretamente classificados. (31). A acurácia do FIB-4 tem sido descrita como superior à do APRI para o diagnóstico da fibrose avançada (44). Este achado é confirmado por Silva Junior et al., que estudando 51 pacientes brasileiros, demonstraram que FIB-4 foi superior ao APRI no diagnóstico da cirrose (AUROC 0,86 x 0,82) (43).

Os modelos metabonômicos aqui apresentados são métodos não invasivos desenvolvidos para o diagnóstico e classificação da fibrose hepática. Neste estudo, o MM para a predição de FS não apresentou nenhum erro de classificação. Para predição de presença de FA, o MM apresentou apenas um erro de classificação, sugerindo tratar-se de método robusto de classificação de fibrose, com potencial para ser incluído na prática clínica. De forma global, os MM gerados para predição de FS e FA, em pacientes com HCC, apresentaram valores de sensibilidade, especificidade e acurácia superiores a 90% e desempenho semelhantes ao do APRI e FIB-4. Adicionalmente, o método mostrou-se capaz de discriminar corretamente o estágio de fibrose de todos os pacientes que apresentaram valores de APRI e FIB-4 na zona cinza, quando estes índices não conseguem determinar presença ou ausência de fibrose.

Amathieu, em revisão recente, destaca a metabonômica e a metabolômica como ferramentas úteis em várias doenças hepáticas, como no diagnóstico da hepatite autoimune, hepatotoxicidade, na diferenciação de hepatocarcinoma de doença hepática não maligna e na falência do enxerto pós-transplante hepático (45).

Este método também mostrou-se promissor na investigação das hepatites virais. Em nosso meio, Godoy et al., em estudo piloto utilizando espectroscopia por RMN H1 de urina de pacientes infectados pelo HCV e posterior análise estatística por PCA e LDA, demonstrou sensibilidade de 94% e especificidade de 97% do MM para o diagnóstico da infecção, com valor preditivo positivo de 97% e valor preditivo negativo de 94% (27). Através de RMN de imagem do fígado com espectroscopia de P31, Zhang et al. demonstraram, em 60 pacientes com HCC tratados com interferon peguilado e ribavirina, que a relação fosfoester/ fosfatidil-ester diminuiu após 6 meses e 1 ano do término do tratamento dos pacientes com resposta virológica, enquanto que esta relação manteve-se estável no grupo dos não-respondedores. (46)

O método tem sido ainda investigado na avaliação da gravidade da doença hepática e na cirrose e suas complicações. Amathieu et al. correlacionaram a gravidade do comprometimento da função hepática em pacientes com doença hepática crônica por álcool, medida pelo MELD, com deficiência no metabolismo de lípido, glicose e aminoácidos. (47) Jimènes et al., utilizando espectro de RMN H1 de soro de pacientes cirróticos, conseguiram discriminar aqueles com encefalopatia mínima daqueles sem encefalopatia. (48)

Em relação à avaliação de fibrose hepática, as estratégias metabonômica e metabolômica também têm se mostrado promissoras. Sands et al., analisando espectro de RMN H1 de soro de controles saudáveis e de pacientes com HCC, construíram MM por OPLS-DA, utilizando classificação de fibrose por METAVIR e índice ELF como padrão de referência, e demonstraram que foi possível discriminar pacientes sem fibrose (F0) daqueles com fibrose moderada (F1-F2) e daqueles com fibrose avançada (F3-F4) e que as substâncias discriminantes relacionadas à fibrose estavam ligadas ao metabolismo dos aminoácidos e lipídios. Pacientes com fibrose hepática avançada apresentaram aumento dos níveis séricos de tirosina, fenilalanina, metionina, citrato e VLDL e diminuição dos níveis de creatina, LDL, fosfatidilcolina e N-acetil-alfa 1 glicoproteína ácida (49). Os autores demonstraram também que o MM criado, utilizando o índice ELF como padrão de referência, discriminou melhor os estágios menos avançados de fibrose, quando comparado ao MM que utilizou a biópsia como padrão de referência (49).

Embade et al., diferenciaram 27 pacientes com HCC e cirrose (F4) de 30 pacientes com HCC sem fibrose (F0), utilizando modelo PLS-DA, através de análise de espectro de soro por RMN H1. Os autores demonstraram que colina, acetato e LDL apresentam concentração reduzida nos pacientes cirróticos e são importantes biomarcadores preditores de fibrose. Construíram, então, um escore derivado de uma combinação linear destes três metabólitos, que alcançou AUROC de 0,92 para o diagnóstico da cirrose. (50). Sarfaraz et al., utilizando espectroscopia de RMN H1 de soro de 45 pacientes com HCC e classificação histopatológica de fibrose, construíram modelo metabonômico por PLS-DA que discriminou pacientes F0-F2 de pacientes F3-F4, com bom poder preditivo ( $R^2=0,673$ ). (51)

Vale salientar que, paralelamente a este estudo, estamos publicando outro com a mesma metodologia e resultados semelhantes, envolvendo pacientes de outra região do Brasil. O nosso intuito inicial era criar MM para predição de FS e FA em pacientes com HCC de uma região e validar os MM em pacientes de outra região. Contudo, isto não foi possível, visto que, na análise inicial das duas populações por PCA, foi constatado que os pacientes eram metabolicamente diferentes. Desta forma, foi necessário criar modelos específicos para pacientes de cada região, em virtude das possíveis diferenças genéticas e alimentares de cada população. Todavia, nosso estudo corrobora os achados desses autores e sugere que a estratégia metabonômica é capaz de discriminar o estágio de fibrose hepática em pacientes com infecção crônica pelo HCV, podendo vir a contribuir, futuramente, para o estadiamento não invasivo da fibrose nestes pacientes.

### **Limitações do estudo**

Como limitação do estudo, ressalta-se o pequeno número de pacientes testados na validação externa, o que limita a aplicabilidade dos resultados na prática médica, e o fato do estudo ter sido realizado em centro terciário de atenção à saúde, o que pode ter provocado viés de seleção de pacientes com maior grau de acometimento da doença hepática crônica. Por fim, vale destacar que a RMN H1 de biofluido ainda não é uma técnica comercialmente utilizada, estando restrita à centros acadêmicos e de pesquisa, porém, o desenvolvimento da estratégia metabonômica poderá, futuramente, mudar este panorama e permitir que esta ferramenta possa ser utilizada na rotina clínica. Também serão necessários estudos maiores, multicêntricos, que incluam pacientes de várias regiões do Brasil e de diferentes regiões do mundo, para que se possa desenvolver modelos que sirvam para predição de FS e FA de todos os pacientes com HCC.

### **Conclusão:**

Neste estudo preliminar, os MM foram capazes de discriminar FS e FA em pacientes com HCC, com elevada acurácia e desempenho similar ao APRI e FIB-4. Adicionalmente, a estratégia metabonômica permitiu o estadiamento de fibrose nas zonas cinzas destes índices, mostrando-se promissora como marcador não invasivo de fibrose hepática nesses pacientes. Porém, serão necessários novos estudos, com maior número de pacientes na validação externa dos modelos, a fim de confirmar seu desempenho, para posterior incorporação na prática clínica.

Referências:

1. World Health Organization. Global Burden of Disease (GBD) for Hepatitis C. *J Clin Pharmacol*. 2004;44(1):20–9.
2. Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010 : a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 2012;380:2095–128.
3. Brasil. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico-Hepatites Virais. Brasília, *Ministério da Saúde*, 2015.
4. Ferreira PRA, Brandão-Mello CE, Estes C, Júnior FLG, Coelho HSM, Razavi H, et al. Disease burden of chronic hepatitis C in Brazil. *Brazilian J Infect Dis*. 2015;19(4):363–368.
5. Poynard T, Bedossa P, Opolon P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. *Lancet*. 1997;349:825–32.
6. Seeff LB. Natural History of Chronic Hepatitis C. *Hepatology*. 2002;36(5):535–46.
7. EASL. EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2016. *J Hepatol*. 2016;66(1):153–94.
8. Schinazi RF, Asselah T. From HCV To HBV Cure. *Liver Int*. 2017; 37:73–80.
9. Shiffman ML, Benhamou Y. Cure of HCV related liver disease. *Liver Int*. 2015;35(s1):71–7.
10. Brasil. Ministério da Saúde. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite C e Co-infecções. Brasília: *Ministério da Saúde*, 2015.
11. Kalambokis G, Manousou P, Vibhakorn S, Marelli L, Cholongitas E, Senzolo M, et al. Transjugular liver biopsy - Indications, adequacy, quality of specimens, and complications - A systematic review. *J Hepatol*. 2007;47(2):284–94.
12. Rockey DC, Caldwell SH, Goodman ZD, Nelson RC, Smith AD. Liver biopsy. *Hepatology*. 2009;49(3):1017–44.
13. Gunneson TJ, Menon N, Wiesner RH, et al. Ultrasound-Assisted Percutaneous Liver Biopsy Performed by a Physician Assistant. *Am J Gastroenterol*. 2002;97(6):1472–5.
14. Cadranet J-F, Rufat P, Degos F. Practices of Liver Biopsy in France : Results of a Prospective Nationwide Survey. *Hepatology*. 2000;32(3):477–81.
15. Myers RP, Fong A, Shaheen AAM. Utilization rates , complications and costs of percutaneous liver biopsy : a population-based study including 4275 biopsies. *Liver Int*. 2008;28(5):705–12.
16. Regev A, Berho M, Jeffers LJ, Milikowski C, Molina EG, Pyrsopoulos NT, et al.

- Sampling Error and Intraobserver Variation in Liver Biopsy in Patients With Chronic HCV Infection. *Am J Gastroenterol*. 2002;97(10):2614–8.
17. Wai CT, Greenson JK, Fontana RJ, Kalbfleisch JD, Marrero J a., Conjeevaram HS, et al. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2003;38(2):518–26.
  18. Sterling RK, Lissen E, Clumeck N, Sola R, Correa MC, Montaner J, et al. Development of a simple noninvasive index to predict significant fibrosis in patients with HIV/HCV coinfection. *Hepatology*. 2006;43(6):1317–25.
  19. EASL, ALEH. EASL-ALEH Clinical Practice Guidelines: Non-invasive tests for evaluation of liver disease severity and prognosis. *J Hepatol*. 2015;63:237–64.
  20. Parkes J, Guha IN, Roderick P, Rosenberg W. Performance of serum marker panels for liver fibrosis in chronic hepatitis C. *J Hepatol*. 2006;44(3):462–74.
  21. Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. “Metabonomics”: understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica*. 1999;29(11):1181–9.
  22. Dunn WB, Ellis DI. Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. *Trends Anal Chem* 2005;24(4):285–94.
  23. Nicholson JK, Lindon JC. Metabonomics. *Nature*. 2008;455(23):1054–6.
  24. Zhang S, Nagana Gowda G a, Ye T, Raftery D. Advances in NMR-based biofluid analysis and metabolite profiling. *Analyst*. 2010;135(7):1490–8.
  25. Bharti SK, Roy R. Quantitative <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. *Trends Anal Chem*. 2012;35:5–26.
  26. Emwas AHM, Salek RM, Griffin JL, Merzaban J. NMR-based metabolomics in human disease diagnosis: Applications, limitations, and recommendations. *Metabolomics*. 2013;9(5):1048–72.
  27. Godoy MMG, Lopes EP a, Silva RO, Hallwass F, Koury LC a, Moura IM, et al. Hepatitis C virus infection diagnosis using metabonomics. *J Viral Hepat*. 2010;17(12):854–8.
  28. Sackett DL. Evidence base of clinical diagnosis: The architecture of diagnostic research. *BMJ*. 2002;324:539–41.
  29. Chindamo MC, Nunes-pannain VL, Araújo-neto JM, Moraes-coelho HS, Luiz RR, Villela-nogueira CA, et al. Intermediate fibrosis staging in hepatitis C : a problem not overcome by optimal samples or pathologists ’ expertise. *Ann Hepatol*. 2015;14(5):652–7.
  30. Bedossa P, Poynard T, METAVIR Cooperative Study Group. An Algorithm for the Grading of Activity in Chronic Hepatitis C. *Hepatology*. 1996;24(2):289–93.

31. Vallet-Pichard A, Mallet V, Nalpas B, Verkarre V, Nalpas A, Dhalluin-Venier V, et al. FIB-4: An inexpensive and accurate marker of fibrosis in HCV infection. Comparison with liver biopsy and FibroTest. *Hepatology*. 2007;46(1):32–6.
32. Xia J, Sinelnikov I V., Han B, Wishart DS. MetaboAnalyst 3.0--making metabolomics more meaningful. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(W1):W251-7.
33. de Oliveira AC, Bortotti AC, Nunes NN, El Bacha I a H, Parise ER. Association between age at diagnosis and degree of liver injury in hepatitis C. *Braz J Infect Dis*. 2014;18(5):507–11.
34. Poynard T, Ratziu V, Benmanov Y, Di Martino V, Bedossa P, Opolon P. Fibrosis in patients with chronic hepatitis C: detection and significance. *Semin Liver Dis*. 2000;20(1):47–55.
35. Cholongitas E, Senzolo M, Standish R, Marelli L, Quaglia A, Patch D, et al. A Systematic Review of the Quality of Liver Biopsy. *Am J Clin* 2006; (125):710–21.
36. Bedossa P, Dargère D, Paradis V. Sampling Variability of Liver Fibrosis in Chronic Hepatitis C. *Hepatology*. 2003;38(6):1449–56.
37. Poynard T, Munteanu M, Imbert-Bismut F, Charlotte F, Thabut D, Le Calvez S, et al. Prospective analysis of discordant results between biochemical markers and biopsy in patients with chronic hepatitis C. *Clin Chem*. 2004;50(8):1344–55.
38. Poynard T, Mchutchison J, Manns M, Myers RP, Albrecht J. Biochemical Surrogate Markers of Liver Fibrosis and Activity in a Randomized Trial of Peginterferon Alfa-2b and Ribavirin. *Hepatology*. 2003;38:481–92.
39. Shaheen AAM, Myers RP. Diagnostic accuracy of the aspartate aminotransferase-to-platelet ratio index for the prediction of hepatitis C-related fibrosis: A systematic review. *Hepatology*. 2007;46(3):912–21.
40. Amorim TGF, Staub GJ, Lazzarotto C, Silva AP, Manes J, Ferronato M da G, et al. Validation and comparison of simple noninvasive models for the prediction of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *Ann Hepatol*. 2012;11(6):855–61.
41. Parise ER, Oliveira AC, Figueiredo-Mendes C, Lanzoni V, Martins J, Nader H, et al. Noninvasive serum markers in the diagnosis of structural liver damage in chronic hepatitis C virus infection. *Liver Int*. 2006;26:1095–9.
42. Silva Jr RG Da, Fakhouri R, Nascimento TVB, Santos IM, Barbosa LMM. Aspartate aminotransferase-to-platelet ratio index for fibrosis and cirrhosis prediction in chronic hepatitis C patients. *Braz J Infect Dis*. 2008;12(1):15–9.
43. Silva Junior RG, Schmillevitch J, Nascimento Mde F, Miranda ML, Brant PE, Schulz PO, et al. Acoustic radiation force impulse elastography and serum fibrosis markers in chronic hepatitis C. *Scand J Gastroenterol*. 2014;49(8):986–92.

44. Houot M, Ngo Y, Munteanu M, Marque S, Poynard T. Systematic review with meta-analysis: direct comparisons of biomarkers for the diagnosis of fibrosis in chronic hepatitis C and B. *Aliment Pharmacol Ther*. 2016;43(1):16–29.
45. Amathieu R. Nuclear magnetic resonance based metabolomics and liver diseases: Recent advances and future clinical applications. *World J Gastroenterol*. 2016;22(1):417–26.
46. Zhang C-Y, Zhang Q, Zhang H-M, Yang H-S. 3.0T 31P MR spectroscopy in assessment of response to antiviral therapy for chronic hepatitis C. *World J Gastroenterol*. 2014;20(8):2107–12.
47. Amathieu R, Triba MN, Nahon P, Bouchemal N, Kamoun W, Haouache H, et al. Serum 1H-NMR metabolomic fingerprints of acute-on-chronic liver failure in intensive care unit patients with alcoholic cirrhosis. *PLoS One*. 2014;9(2):e89230.
48. Jiménez B, Montoliu C, Macintyre D a, Serra M a, Wassel A, Romero-gomez M, et al. Serum Metabolic Signature of Minimal Hepatic Encephalopathy by H-Nuclear Magnetic Resonance research articles. *J Proteome Res*. 2010;9(10):5180–7.
49. Sands CJ, Guha IN, Kyriakides M, Wright M, Beckonert O, Holmes E, et al. Metabolic Phenotyping for Enhanced Mechanistic Stratification of Chronic Hepatitis C-Induced Liver Fibrosis. *Am J Gastroenterol* 2014;110(1):159–69.
50. Embade N, Mariño Z, Diercks T, Cano A, Lens S, Cabrera D, et al. Metabolic characterization of advanced liver fibrosis in HCV patients as studied by serum 1H-NMR spectroscopy. *PLoS One*. 2016;11(5):1–19.
51. Sarfaraz MO, Myers RP, Coffin CS, Gao Z-H, Shaheen AAM, Crotty PM, et al. A quantitative metabolomics profiling approach for the noninvasive assessment of liver histology in patients with chronic hepatitis C. *Clin Transl Med*. 2016;5(1):33.

## **6. RECOMENDAÇÕES**

Recomendamos que os achados desta pesquisa sejam reavaliados em estudos de validação de teste diagnóstico fase III, com cálculo amostral e validação externa dos MMs, a fim de confirmar seu desempenho, para posterior incorporação na prática clínica.

Recomendamos ainda a realização de estudos multicêntricos, que incluam pacientes de várias regiões do Brasil e de diferentes regiões do mundo, com grande número de participantes, para que se possa desenvolver modelos que sirvam para predição de fibrose hepática significativa e fibrose hepática avançada de todos os pacientes com HCC.

## 7. CONCLUSÃO

Os dados apresentados no presente estudo mostraram que os MMs desenvolvidos foram capazes de discriminar FS, FA e C em pacientes com HCC de PE, com elevada acurácia e desempenho similar ao do APRI e FIB-4.

Da mesma forma, os modelos desenvolvidos com amostras de soro de pacientes com HCC do RJ foram capazes de discriminar FS e FA nesses pacientes, também com elevada acurácia e desempenho similar ao do APRI e FIB-4.

Adicionalmente, os MMs permitiram o estadiamento de fibrose nas zonas cinzas destes índices, para as duas populações, o que poderia evitar grande número de biópsias nesses pacientes.

Os resultados sugerem que a estratégia metabonômica é promissora como método não invasivo de avaliação de fibrose hepática em pacientes com HCC.

**REFERÊNCIAS**

- AFDHAL, N. H.; NUNES, D. Evaluation of liver fibrosis: A concise review. **American Journal of Gastroenterology**, v. 99, n. 6, p. 1160–1174, 2004.
- ALBERTI, A. et al. Natural history of hepatitis C. **Journal of Hepatology**, v. 31, n. Supplement 1, p. 17–24, 1999.
- ALTER, M.J. et al. The Prevalence Of Hepatitis C Virus Infection In The United States, 1988 Through 1994. **The New England Journal of Medicine**, v. 341, n. 8, p. 556–562, 1999.
- AMATHIEU, R. et al. Nuclear magnetic resonance based metabolomics and liver diseases: Recent advances and future clinical applications. **World Journal of Gastroenterology**, v. 22, n. 1, p. 417–426, 2016.
- AMATHIEU, R. Nuclear magnetic resonance based metabolomics and liver diseases: Recent advances and future clinical applications. **World Journal of Gastroenterology**, v. 22, n. 1, p. 417–426, 2016.
- ARENA, U. et al. Acute viral hepatitis increases liver stiffness values measured by transient elastography. **Hepatology**, v. 47, n. 2, p. 380–384, 2008.
- BATALLER, R.; BRENNER, D. Liver fibrosis. **The journal of clinical investigation**, v. 115, n. 2, p. 209–218, 2005.
- BEDOSSA, P.; POYNARD, T.; METAVIR COOPERATIVE STUDY GROUP. An Algorithm for the Grading of Activity in Chronic Hepatitis C. **Hepatology**, v. 24, n. 2, p. 289–293, 1996.
- BERZIGOTTI, A.; CASTERA, L. Update on ultrasound imaging of liver fibrosis. **Journal of Hepatology**, v. 59, n. 1, p. 180–182, 2013.
- BEYOĞLU, D.; IDLE, J. R. The metabolomic window into hepatobiliary disease. **Journal of Hepatology**, v. 59, n. 4, p. 842–858, 2013.
- BISSELL, D. M. Assessing Fibrosis Without a Liver Biopsy: Are We There Yet? **Gastroenterology**, v. 127, n. 6, p. 1847–1849, 2004.
- BOTA, S. et al. Intra- and Interoperator Reproducibility of Acoustic Radiation Force Impulse (ARFI) Elastography-Preliminary Results. **Ultrasound in Medicine and Biology**, v. 38, n. 7, p. 1103–1108, 2012.
- BOTA, S. et al. Meta-analysis: ARFI elastography versus transient elastography for the evaluation of liver fibrosis. **Liver International**, v. 33, n. 8, p. 1138–1147, 2013.
- BOURSIER, J. et al. Comparison of eight diagnostic algorithms for liver fibrosis in hepatitis C: New algorithms are more precise and entirely noninvasive. **Hepatology**, v. 55, n. 1, p. 58–67, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico-Hepatites Virais. Brasília: **Ministério da Saúde**, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite C e Co-infecções. Brasília: **Ministério da Saúde**, 2015.

BUZATTO, A. Z. et al. Metabolomic investigation of human diseases biomarkers by CE and LC coupled to MS. **Electrophoresis**, v. 35, n. 9, p. 1285–1307, 2014.

CASSINOTTO, C. et al. Non-invasive assessment of liver fibrosis with impulse elastography: Comparison of Supersonic Shear Imaging with ARFI and FibroScan. **Journal of Hepatology**, v. 61, n. 3, 2014.

CASTERA, L. et al. Prospective comparison of transient elastography, Fibrotest, APRI, and liver biopsy for the assessment of fibrosis in chronic hepatitis C. **Gastroenterology**, v. 128, n. 2, p. 343–350, 2005.

CHINDAMO, M. C. et al. Intermediate fibrosis staging in hepatitis C : a problem not overcome by optimal samples or pathologists ' expertise. **Annals of Hepatology**, v. 14, n. 5, p. 652–657, 2015.

CHOU, ROGER; NGOC, W. Annals of Internal Medicine Review Blood Tests to Diagnose Fibrosis or Cirrhosis in Patients With Chronic. **Annals of Internal Medicine**, v. 158, n. 11, p. 807–820, 2013.

COLLOREDO, G. et al. Impact of liver biopsy size on histological evaluation of chronic viral hepatitis : the smaller the sample , the milder the disease. **Journal of Hepatology**, v. 39, p. 239–244, 2003.

DAVIS, G. L. et al. Aging of Hepatitis C Virus (HCV)-Infected Persons in the United States: A Multiple Cohort Model of HCV Prevalence and Disease Progression. **Gastroenterology**, v. 138, n. 2, p. 513–521.e6, 2010.

DEGOS, F. et al. Diagnostic accuracy of FibroScan and comparison to liver fibrosis biomarkers in chronic viral hepatitis: A multicenter prospective study (the FIBROSTIC study). **Journal of Hepatology**, v. 53, n. 6, p. 1013–1021, 2010.

DUFOUR, D. R. Assessment of liver fibrosis: Can serum become the sample of choice? **Clinical Chemistry**, v. 51, n. 10, p. 1763–1764, 2005.

EASL. EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2016. **Journal of Hepatology**, v. 66, n. 1, p. 153–194, 2016.

EMWAS, A. H. M. et al. NMR-based metabolomics in human disease diagnosis: Applications, limitations, and recommendations. **Metabolomics**, v. 9, n. 5, p. 1048–1072, 2013.

FERREIRA, P. R. A. et al. Disease burden of chronic hepatitis C in Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 19, n. 4, p. 363–368, 2015.

FIEHN, O. Metabolomics - the link between genotypes and phenotypes. **Plant Molecular Biology**, v. 48, p. 155–171, 2002.

FRIEDMAN, S. L. Liver fibrosis- from bench to bedside. **Journal of Hepatology**, v. 38, p. S38–S53, 2003.

FRIEDRICH-RUST, M. et al. Performance of Acoustic Radiation Force Impulse imaging for the staging of liver fibrosis: A pooled meta-analysis. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 19, n. 2, p. 212–219, 2012.

GAO, H. et al. Application of <sup>1</sup>H NMR-based metabonomics in the study of metabolic profiling of human hepatocellular carcinoma and liver cirrhosis. **Cancer Science**, v. 100, n. 4, p. 782–785, 2009.

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

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.

HUWART, L. et al. Magnetic Resonance Elastography for the Noninvasive Staging of Liver Fibrosis. **Gastroenterology**, v. 135, n. 1, p. 32–40, 2008.

JIMÉNEZ, B. et al. Serum Metabolic Signature of Minimal Hepatic Encephalopathy by H-Nuclear Magnetic Resonance research articles. **Journal of Proteome Research**, v. 9, n. 10, p. 5180–5187, 2010.

LEROY, V. et al. Prospective comparison of six non-invasive scores for the diagnosis of liver fibrosis in chronic hepatitis C. **Journal of hepatology**, v. 46, n. 5, p. 775–82, 2007.

LIAN, J. SHAN et al. A serum metabonomic study on the difference between alcohol- and HBV-induced liver cirrhosis by ultraperformance liquid chromatography coupled to mass spectrometry plus quadrupole time-of-flight mass spectrometry. **Chinese Medical Journal**, v. 124, n. 9, p. 1367–1373, 2011.

LINDON, J.C.; HOLMES, E.; NICHOLSON, J. K. So What's the Deal With Metabonomics? **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 17, p. 385A–391A, 2003.

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

LOZANO, R. et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010 : a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. **The Lancet**, v. 380, p. 2095–2128, 2012.

MANNING, D. S.; AFDHAL, N. H. Diagnosis and Quantitation of Fibrosis. **Gastroenterology**, v. 134, n. 6, p. 1670–1681, 2008.

MILLONIG, G. et al. Extrahepatic cholestasis increases liver stiffness (fibroScan) irrespective of fibrosis. **Hepatology**, v. 48, n. 5, p. 1718–1723, 2008.

MYERS, R. P.; FONG, A.; SHAHEEN, A. A. M. Utilization rates, complications and costs of percutaneous liver biopsy: a population-based study including 4275 biopsies. **Liver International**, v. 28, n. 5, p. 705–712, 2008.

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

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

PARKES, J. et al. Performance of serum marker panels for liver fibrosis in chronic hepatitis C. **Journal of Hepatology**, v. 44, n. 3, p. 462–474, 2006.

PATEL, N. R. et al. Biofluid metabonomics using <sup>1</sup>H NMR spectroscopy: the road to biomarker discovery in gastroenterology and hepatology. **Expert Review of Gastroenterology & Hepatology**, v. 6, n. 2, p. 239–251, 2012.

PETZ, D. et al. Feasibility of histological grading and staging of chronic viral hepatitis using specimens obtained by thin-needle biopsy. **Virchows Archiv**, v. 442, p. 238–244, 2003.

PICCININO, F. et al. Complications following percutaneous liver biopsy. A multicentre retrospective study on 68,276 biopsies. **Journal of Hepatology**, v. 2, n. 2, p. 165–173.

POYNARD, T. et al. Fibrosis in patients with chronic hepatitis C: detection and significance. **Seminars in liver disease**, v. 20, n. 1, p. 47–55, 2000.

POYNARD, T. et al. Impact of pegylated interferon alfa-2b and ribavirin on liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. **Gastroenterology**, v. 122, n. 5, p. 1303–1313, 2002.

POYNARD, T. et al. Biochemical Surrogate Markers of Liver Fibrosis and Activity in a Randomized Trial of Peginterferon Alfa-2b and Ribavirin. **Hepatology**, v. 38, p. 481–492, 2003.

POYNARD, T. et al. Overview of the diagnostic value of biochemical markers of liver fibrosis (FibroTest, HCV FibroSure) and necrosis (ActiTest) in patients with chronic hepatitis C. **Comparative hepatology**, v. 3, n. 1, p. 8, 2004a.

POYNARD, T. et al. Prospective analysis of discordant results between biochemical markers and biopsy in patients with chronic hepatitis C. **Clinical Chemistry**, v. 50, n. 8, p. 1344–1355, 2004b.

QI, S. W. et al. <sup>1</sup>H NMR-based serum metabolic profiling in compensated and decompensated cirrhosis. **World journal of gastroenterology : WJG**, v. 18, n. 3, p. 285–290, 2012.

REGEV, A. et al. Sampling Error and Intraobserver Variation in Liver Biopsy in Patients With Chronic HCV Infection. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 97, n. 10, p. 2614–2618, 2002.

ROCKEY, D. C. et al. Liver biopsy. **Hepatology**, v. 49, n. 3, p. 1017–1044, 2009.

ROSSI, E. et al. Assessing liver fibrosis with serum marker models. **Clin Biochem Rev**, v. 28, n. 1, p. 3–10, 2007.

SACKETT, D. L. Evidence base of clinical diagnosis: The architecture of diagnostic research. **BMJ**, v. 324, n. 7336, p. 539–541, 2002.

SANDRIN, L. et al. Transient elastography: a new noninvasive method for assessment of hepatic fibrosis. **Ultrasound in medicine & biology**, v. 29, n. 12, p. 1705–1713, 2003.

SANDRIN L, et al. Shear elasticity probe for soft tissues with 1-D transient elastography. **IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control**, v. 49, n. 4, p. 436–446, 2002.

SCHIAVON, L. DE L.; NARCISO-SCHIAVON, J. L.; DE CARVALHO-FILHO, R. J. Non-invasive diagnosis of liver fibrosis in chronic hepatitis C. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 11, p. 2854–2866, 2014.

SCHINAZI, R. F.; ASSELAH, T. From HCV To HBV Cure. **Liver International**, v. 37, n. November 2016, p. 73–80, 2017.

SEBASTIANI, G. Non-invasive assessment of liver fibrosis in chronic liver diseases: Implementation in clinical practice and decisional algorithms. **World Journal of Gastroenterology**, v. 15, n. 18, p. 2190–2203, 2009.

SHAHEEN, A. A. M.; WAN, A. F.; MYERS, R. P. FibroTest and FibroScan for the prediction of hepatitis C-related fibrosis: A systematic review of diagnostic test accuracy. **American Journal of Gastroenterology**, v. 102, n. 11, p. 2589–2600, 2007.

SHARIFF, M. I. F. et al. Characterization of urinary biomarkers of hepatocellular carcinoma using magnetic resonance spectroscopy in a Nigerian population. **Journal of Proteome Research**, v. 9, n. 2, p. 1096–1103, 2010.

SHARIFF, M. I. F. et al. Urinary metabolic biomarkers of hepatocellular carcinoma in an Egyptian population: A validation study. **Journal of Proteome Research**, v. 10, n. 4, p. 1828–1836, 2011.

SHIFFMAN, M. L.; BENHAMOU, Y. Cure of HCV related liver disease. **Liver International**, v. 35, n. s1, p. 71–77, 2015.

SMITH, B. D. et al. Recommendations for the identification of chronic hepatitis C virus infection among persons born during 1945–1965. **MMWR. Recommendations and reports : Morbidity and mortality weekly report. Recommendations and reports / Centers for Disease Control**, v. 61, n. RR-4, p. 1–32, 2012.

SPOREA, I. et al. Acoustic Radiation Force Impulse Elastography for fibrosis evaluation in patients with chronic hepatitis C: An international multicenter study. **European Journal of Radiology**, v. 81, n. 12, p. 4112–4118, 2012.

STERLING, R. K. et al. Development of a simple noninvasive index to predict significant fibrosis in patients with HIV/HCV coinfection. **Hepatology**, v. 43, n. 6, p. 1317–1325, 2006.

THE METABOLOMICS INNOVATION CENTRE. **The Human Metabolome Database**. Disponível em: <<http://www.hmdb.ca/>>. Acesso em: 11 fev. 2017.

TSOCHATZIS, E. A. et al. Elastography for the diagnosis of severity of fibrosis in chronic liver disease: A meta-analysis of diagnostic accuracy. **Journal of Hepatology**, v. 54, n. 4, p. 650–659, 2011.

VALLET-PICHARD, A. et al. FIB-4: An inexpensive and accurate marker of fibrosis in HCV infection. Comparison with liver biopsy and FibroTest. **Hepatology**, v. 46, n. 1, p. 32–36, 2007.

VAN DER POORTEN, D. et al. Twenty-year audit of percutaneous liver biopsy in a major Australian teaching hospital. **Internal Medicine Journal**, v. 36, n. 11, p. 692–699, 2006.

WAI, C. T. et al. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. **Hepatology**, v. 38, n. 2, p. 518–526, 2003.

WATERS, N. J. et al. Integrated metabolomic analysis of bromobenzene-induced hepatotoxicity: Novel induction of 5-oxoprolinosis. **Journal of Proteome Research**, v. 5, n. 6, p. 1448–1459, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Burden of Disease (GBD) for Hepatitis C. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 44, n. 1, p. 20–29, 2004.

WU, W. et al. Artificial neural networks in classification of NIR spectral data: Design of the training set. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 33, n. 1, p. 35–46, 1996.

XIA, J. et al. MetaboAnalyst 3.0--making metabolomics more meaningful. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. W1, p. W251-7, 2015.

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

ZHAO, H. et al. Noninvasive assessment of liver fibrosis using ultrasound-based shear wave measurement and comparison to magnetic resonance elastography. **Journal of ultrasound in medicine**. v. 33, n. 9, p. 1597–604, 2014.

## APÊNDICES

### APÊNDICE A- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



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

DMC

DQF

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

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

Você receberá uma cópia deste documento onde se encontra o telefone e endereço dos pesquisadores responsáveis e do Comitê de Ética e Pesquisa (CEP), podendo tirar dúvidas de sua participação e outras que tiver. **ENDEREÇO DO CEP:** Av. da Engenharia, S/N, 1º andar, Cid Universitária, Recife, PE. Telefone: 2126858. **PESQUISADORES RESPONSÁVEIS:** Michele Godoy e Andrea Dória Batista. **ENDEREÇO:** Hospital das Clínicas, Ambulatório de Hepatologia. Av Prof. Moraes Rego, S/N. Cid. Uiversitária, Recife, PE. **TELEFONE:** 21263510 **OBJETIVOS:** Esta pesquisa tem o objetivo de diferenciar, através do exame de sua urina, os indivíduos com hepatite B, hepatite C, doença gordurosa do fígado e os indivíduos saudáveis por uma nova técnica chamada metabonômica. Esta mesma técnica será também avaliada na diferenciação do estágio de fibrose do fígado em indivíduos com hepatite B e hepatite C, através de exame de sangue.

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

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

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

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

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

**Assinatura do Pesquisador Responsável:** \_\_\_\_\_

**CONSENTIMENTO DE PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO**

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

**LOCAL E DATA:****NOME E ASSINATURA DO VOLUNTÁRIO:**\_\_\_\_\_  
(Nome por extensor)\_\_\_\_\_  
(Assinatura)

Testemunhas: 1. \_\_\_\_\_

2. \_\_\_\_\_

**APÊNDICE B – Ficha Clínica**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**DEPARTAMENTO DE MEDICINA TROPICAL– CCS**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FUNDAMENTAL – CCEN**

**1. Dados Pessoais:**

Nome: \_\_\_\_\_

Reg: \_\_\_\_\_

Data de nascimento: \_\_\_\_\_

Sexo: \_\_\_\_\_

Cor: \_\_\_\_\_

**1. Diagnóstico:**Hep B crônica:  sim  nãoHep C crônica:  sim  nãoCirrose por HBV/HVC:  sim  não**2. História Clínica:**Uso de álcool:  sim  nãoHemotransusão:  sim  nãoCirurgia:  sim  nãoTatuagem:  sim  nãoUso de droga IV:  sim  nãoTto anti-viral:  sim  não Qual: \_\_\_\_\_

Período de tto: \_\_\_\_\_

Dor abd:  sim  nãoIcterícia:  sim  nãoAstenia:  sim  não

**3. Exame Físico:**

Spiders:  sim  não

Eritema palmar:  sim  não

Ginecomastia:  sim  não

Ascite:  sim  não

Flapping:  sim  não

Hepatomegalia:  sim  não

Esplenomegalia:  sim  não

**4. EDA:**

Varizes de esôfago:  sim  não

Varizes de estômago:  sim  não

Gastropatia hipertensiva:  sim  não

Data: \_\_\_\_\_

**5. USG:**

Doença hepática crônica:  sim  não

Esteatose:  sim  não

Aumento de veia porta:  sim  não

Circulação colateral:  sim  não

Esplenomegalia:  sim  não

Ascite:  sim  não

Data: \_\_\_\_\_

**6. Laboratório:**

AST\_\_\_\_\_ ALT\_\_\_\_\_ GGT\_\_\_\_\_ FA\_\_\_\_\_

Alb\_\_\_\_\_ INR\_\_\_\_\_ BT\_\_\_\_\_ BD\_\_\_\_\_ Plq\_\_\_\_\_

Anti-HCV  sim  não      HCV RNA  sim  não      Gen\_\_\_\_\_ CV\_\_\_\_\_

HBsAg  sim  não      HBV DNA  sim  não      CV\_\_\_\_\_

HBeAg  sim  não

Anti-HBe  sim  não

Anti-HIV  sim  não

**7. Biópsia Hepática**

MetavirA1  sim  não      F1  sim  não

    A2  sim  não      F2  sim  não

    A3  sim  não      F3  sim  não

    A4  sim  não      F4  sim  não

Esteatose:  sim  não      Num de fragmentos: \_\_\_\_\_

Siderose:  sim  não      Tamanho maior fragmento (cm): \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_\_      Num de espaços portais: \_\_\_\_\_

## APÊNDICE C – Protocolo de Biossegurança



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**DEPARTAMENTO DE MEDICINA TROPICAL – DMC/CCS**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FUNDAMENTAL – DQF/CCEN**

Os vírus das hepatites B e C são considerados agentes infecciosos do grupo de risco 3, entretanto apresentam risco limitado de infecção para os pesquisadores envolvidos, visto que não são transmitidos por via aérea. Adicionalmente, a quantidade do agente biológico nas amostras é pequena. Desta forma, serão adotadas as seguintes medidas de biossegurança de nível 2:

- Treinamento dos pesquisadores envolvidos em práticas de biossegurança.
- Acesso ao laboratório restrito aos pesquisadores envolvidos.
- Laboratório com tranca e aviso de risco biológico.
- Imunização dos pesquisadores contra hepatite B.
- Uso de material de proteção individual: bata, sapatos fechados e luvas de látex durante o manuseio do material biológico.
- Lavagem das mãos, antes e após o manuseio do material biológico.
- As amostras de soro serão transportadas do Laboratório Central do HC/UFPE para o Laboratório de Química Fundamental em tubos plásticos com tampa (ependorf), acomodados em caixas de eppendorf com tampa, e estas acomodadas em caixa impermeável com tampa.
- Todos os resíduos de material biológico serão armazenados em recipiente impermeável, anti-perfurante, com tampa, e re-encaminhados ao Laboratório Central do HC/UFPE, para destinação de material infeccioso.
- Em caso de derrame do material biológico, o seguinte processo de desinfecção será efetuado: utilizar luvas e vestuário protetor antes de iniciar o processo; cobrir o derrame com papel; colocar solução de hipoclorito de sódio a 2% no papel e área circundante; após 30 minutos, remover o material e utilizar hipoclorito de sódio a 2% na área; descartar os resíduos em recipiente estanque e impermeável; encaminhar o recipiente para o Laboratório Central do HC/UFPE para destinação de material infeccioso.
  - Em caso de acidente com o pesquisador envolvendo contato do material biológico com mucosa ou pele não íntegra, entrar em contato imediatamente com a Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) ou com o médico plantonista do HC/UFPE, no telefone 81-21263633, para orientação e providências.

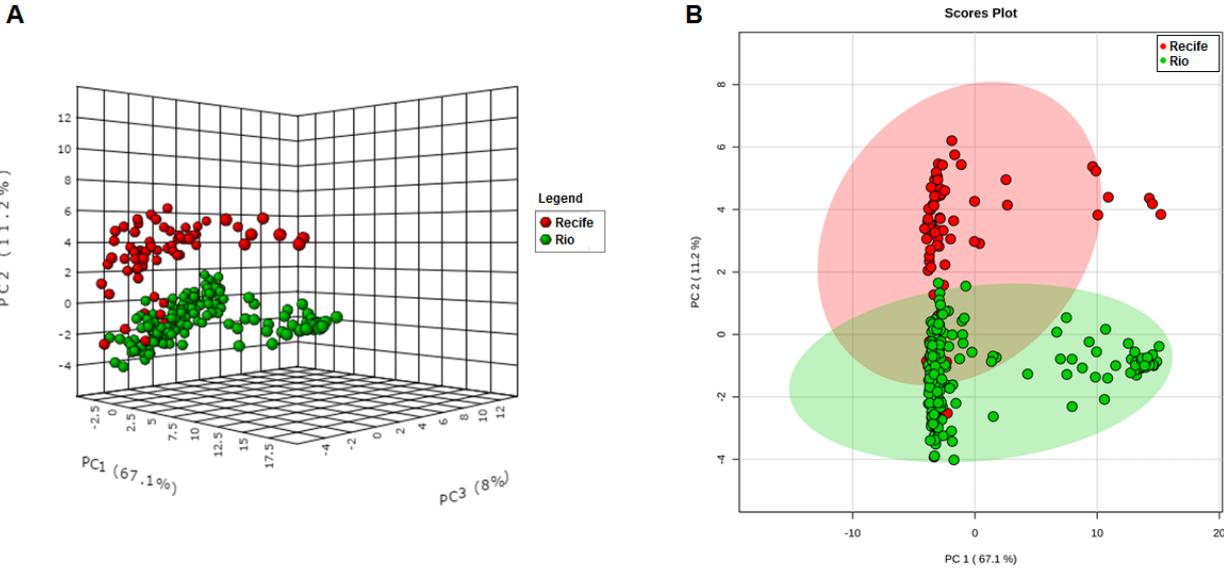
## APÊNDICE D - Tabelas e figuras dos resultados suplementares

**Tabela 1- Principais características demográficas e laboratoriais de pacientes com hepatite C crônica, de acordo com o tipo de população (RJ e PE), no período de 2010 a 2015.**

Características	RJ (n=180)	PE (n=69)	P
Sexo (n, %)			
Masculino	73 (40,6%)	28 (40,6%)	0,997 <sup>a</sup>
Feminino	107 (59,4%)	41 (59,4%)	
IMC (kg/m <sup>2</sup> )*	26,7 ± 5,1	27,7 ± 4,7	0,144 <sup>b</sup>
Idade (anos)**	54 (47-59,8)	58,8 (50,8-65)	<b>0,002<sup>c</sup></b>
AST (U/L)**	51 (38-78)	51,5 (33,7-88)	0,085 <sup>c</sup>
ALT (U/L)**	74,5 (57,8-126,2)	54 (32,6-106)	<b>&lt;0,001<sup>c</sup></b>
GGT (U/L)**	87 (48-145)	81,8 (46,5-155)	0,772 <sup>c</sup>
Plaquetas (10 <sup>9</sup> /mm <sup>3</sup> )*	204 ± 62	191 ± 78	0,219 <sup>b</sup>
Albumina (g/dl)**	4,0 (3,8-4,2)	4,2 (3,9-4,5)	<b>0,035<sup>c</sup></b>
Bilirrubina total (mg/dL)**	0,6 (0,40-0,70)	0,7 (0,50-1,09)	<b>0,012<sup>c</sup></b>
INR**	1,00 (1,00-1,02)	1,06 (1,00-1,14)	<b>&lt;0,001<sup>c</sup></b>
Glicose (mg/dL)**	86 (78-97,5)	94 (70-126,5)	<b>0,002<sup>c</sup></b>
Colesterol total (mg/dL)*	179,4 ± 40,3	160,2 ± 43,6	<b>0,002<sup>b</sup></b>
HDL (mg/dL)*	52,1 ± 16,9	50,5 ± 16,9	0,552 <sup>b</sup>
LDL (mg/dL)*	109,6 ± 34,5	87,6 ± 36,7	<b>&lt;0,001<sup>b</sup></b>
Triglicerídeos (mg/dL)**	94 (70-126,5)	103 (76,5-136,6)	0,270 <sup>c</sup>
APRI**	0,76 (0,46-1,17)	0,8 (0,44-2,18)	0,271 <sup>c</sup>
FIB-4**	1,62 (1,08-2,50)	2,18 (1,29-4,72)	<b>0,003<sup>c</sup></b>
Fibrose significativa (n, %)			
F2-F4	103 (52,2%)	42 (60,9%)	0,601 <sup>a</sup>
F0-F1	77 (42,8%)	27 (39,1%)	
Fibrose avançada (n, %)			
F3-F4	51 (28,3%)	28 (40,6%)	0,063 <sup>a</sup>
F0-F2	129 (71,7%)	41 (59,4%)	

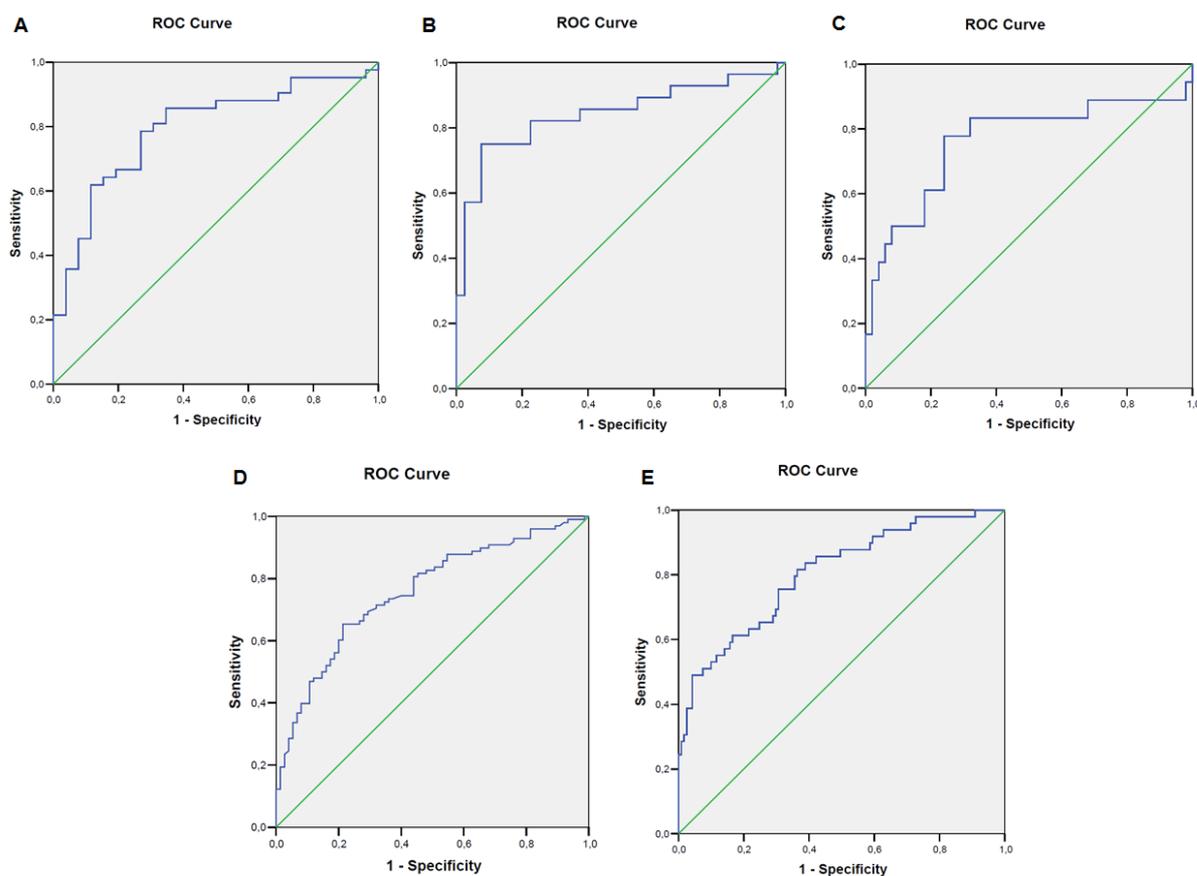
\*Média ± desvio padrão; \*\*Mediana (P<sub>25</sub>-P<sub>75</sub>); <sup>a</sup>Teste Qui-quadrado; <sup>b</sup>Teste T; <sup>c</sup>Teste de Mann-Whitney; IMC: Índice de massa corporal; ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase; GGT: gama glutamil transferase; INR: Razão normalizada internacional; HDL: lipoproteína de alta densidade; LDL: lipoproteína de baixa densidade; APRI: índice da relação aspartato aminotransferase sobre plaquetas; FIB-4: índice de fibrose baseado em quatro fatores.

Figura 1- Modelo metabonômico por PCA em 69 pacientes com HCC de PE e de 180 pacientes com HCC do RJ, no período de 2010 a 2015.



Legenda: (A) Modelo 3D. (B) Modelo 2D.

**Figura 2- Curvas ROC do APRI e FIB-4 em pacientes com hepatite C crônica de PE e do RJ, no período de 2010 a 2015.**



Legenda: Curvas ROC do APRI e FIB-4 nas populações Recife (A-C) e Rio (D-E). (A, D) Curvas ROC do APRI para predição de FS. (B, E) Curvas ROC do FIB-4 para predição de FA. (C) Curva ROC do APRI para predição de cirrose.

**APÊNDICE E - Versão do artigo 1 em inglês**

**Title:** <sup>1</sup>H NMR-based Metabonomics to Predict Liver Fibrosis in Chronic Hepatitis C Patients

**Authors:** Andrea Dória Batista<sup>1,2</sup>; Carlos Jonnatan Pimentel Barros<sup>3</sup>; Tássia Brena Barroso Carneiro Costa<sup>3</sup>; Michele Maria Gonçalves de Godoy<sup>1</sup>; Ronaldo Dionísio Silva<sup>3</sup>; Joelma Carvalho Santos<sup>1</sup>, Mariana Montenegro de Melo Lira<sup>4</sup>; Norma Thomé Jucá<sup>4</sup>; Ricardo Oliveira Silva<sup>3</sup>, Edmundo Pessoa Lopes<sup>1,2</sup>.

**Affiliation:**

- 1- Postgraduate Program in Tropical Medicine. Center for Health Sciences. Universidade Federal de Pernambuco. Recife, Pernambuco, Brazil.
- 2- Department of Gastroenterology and Hepatology. Hospital das Clínicas. Universidade Federal de Pernambuco. Recife, Pernambuco, Brazil.
- 3- - Department of Fundamental Chemistry. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.
- 4- Department of Pathology. Hospital das Clínicas. Universidade Federal de Pernambuco.

**Grant Support:** None

**Abbreviations:**

APRI: aspartate aminotransferase to platelet ratio index; AUROC- area under receiver operator characteristic CHC: Chronic Hepatitis C; FIB-4: fibrosis index based on four factors; <sup>1</sup>H-NMR: nuclear magnetic resonance of hydrogen; LDA: linear discriminant analysis; PC: principal component; PCA: principal components analysis; PLS-DA: partial least squares discriminant analysis; OPLS-DA orthogonal partial least squares discriminant analysis.

**Correspondence:**

Andrea Dória Batista. Address: Avenida Professor Moraes Rego, 135. Cidade Universitária, Recife/Pernambuco, Brazil. Zip code 50670-901. E-mail: adoria04@globo.com

**Disclosures:**

We have no conflict of interest to declare.

**Authors contributions:**

- Concept and design: Andrea Dória Batista; Carlos Jonnatan Pimentel Barros; Ricardo Oliveira Silva; Edmundo Pessoa Lopes.
- Patient selection and clinical procedures: Andrea Dória Batista; Michele Maria Gonçalves de Godoy; Joelma Carvalho Santos
- Optimization of the spectral parameters, obtaining the NMR spectra and construction of the metabonomics models: Carlos Jonnatan Pimentel Barros; Ronaldo Dionísio Silva; Tássia Brena Barroso Carneiro Costa
- Histopathological analysis: Norma Thomé Jucá; Mariana Montenegro de Melo Lira
- Analysis and discussion of the results: Andrea Dória Batista; Carlos Jonnatan Pimentel Barros; Tássia Brena Barroso Carneiro Costa; Ronaldo Dionísio Silva; Joelma Carvalho Santos; Michele Maria Gonçalves de Godoy; Ricardo Oliveira Silva; Edmundo Pessoa Lopes.
- Writing of article: Andrea Dória Batista; Carlos Jonnatan Pimentel Barros; Tássia Brena Barroso Carneiro Costa.
- Revision of article: Andrea Dória Batista; Tássia Brena Barroso Carneiro Costa Ricardo Oliveira Silva; Edmundo Pessoa Lopes.

**Abstract:**

**Background & Aims:** The gold standard in assessing liver fibrosis in chronic hepatitis C (CHC) is biopsy, an invasive method, subject to complications and errors. Alternatively, biomarkers have been tested. Metabonomics is an analytical strategy that uses  $^1\text{H}$  NMR spectra to classify biofluids based on their biochemical status. We aimed to develop metabonomics models (MM) using  $^1\text{H}$  NMR spectra of serum to predict significant hepatic fibrosis (SF: METAVIR  $\geq$  F2), advanced fibrosis (AF: METAVIR  $\geq$  F3) and cirrhosis (C: METAVIR = F4 or clinical cirrhosis) in CHC patients, and compare to APRI and FIB-4 scores, using hepatic histopathology as reference standard. **Methods:** Sixty-nine patients with biopsy in the last 12 months or clinical cirrhosis were included and those with liver disease due to another etiology were excluded.  $^1\text{H}$  NMR spectra were obtained using the Varian Unity 300 spectrometer. The MMs constructed using PLS-DA and LDA from the matrix of PCA scores were tested by cross-validation, considering SF, AF and C. **Results:** Forty-two patients (61%) presented SF, 28 (40%) AF and 18 (26%) C. MMs showed sensitivity and specificity of 97.6% and 92.6% for predicting SF; 96.4% and 95.1% for AF; and 100% and 98.0% for C, similar to APRI and FIB-4. The MMs correctly classified all 27 (39.7%) patients with APRI score between 0.5 and 1.5, and 25 (38.8%) with FIB-4 between 1.45 and 3.25. **Conclusions:** MMs developed in this preliminary study presented high performance in predicting SF, AF, C and in predicting fibrosis in gray zone of APRI and FIB-4 in CHC patients, reducing the need for liver biopsy.

**Keywords:** Metabolomics; Hepatitis C/diagnosis; Liver fibrosis; Biomarkers/ blood; Biopsy/ standards.

**Introduction:**

Approximately 130-170 million people worldwide are chronically infected with the hepatitis C virus (HCV) (1) and an estimated 500.000 individuals died in 2010 from virus-related illnesses (2). In Brazil, the estimated prevalence of hepatitis C is 1.450.000 cases (3) and about 8.000 deaths were due to HCV-related diseases in 2013 (4).

The accurate diagnosis of significant fibrosis (SF), advanced fibrosis (AF) and cirrhosis (C) is important to determine the urgency of treatment, and to monitor complications of the disease. Hepatic histopathology assessment by liver biopsy is still considered the gold standard for evaluating liver fibrosis, but the procedure is invasive, with major complications and death (5). Sampling error, intra and inter-observer variability may lead to discordant results in 33% of cases (6), making biopsy an imperfect reference standard. For these reasons, several non-invasive fibrosis markers have been evaluated. Among the serological markers, APRI and FIB-4 scores stand out because they are based on easily obtained clinical and laboratory parameters (7,8). In general, serologic markers have good accuracy at excluding SF and confirming C, but they fail to diagnose intermediate fibrosis (9).

Metabonomics is defined as "a quantitative measure of the dynamic and multiparametric metabolic response of living organisms to pathological or genetic modifications" (10). As a result of homeostasis, the presence of a pathological condition changes the profile of endogenous metabolites, which can be monitored by  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy (11). This method seeks to discriminate the samples in groups according to their biochemical status, associating this status to a given disease (11,12). Metabonomics has been studied in various liver conditions, including viral hepatitis (13). Godoy et al, using a metabonomics model (MM), based on  $^1\text{H}$  NMR spectra of urine, discriminated hepatitis C patients from healthy volunteers, with 94% sensitivity and 97% specificity (14). Munshi et al., using PCA MM, from  $^1\text{H}$  NMR of serum and urine, discriminated acute hepatitis E and B patients, from 18 healthy volunteers (15). There are also studies showing that metabonomics can identify hepatocellular carcinoma in patients with liver cirrhosis, with good performance (16–18). The objective of this study was to develop MMs, using  $^1\text{H}$  NMR spectrum of serum samples, as a non-invasive method for predicting SF, AF and C, in patients with chronic hepatitis C (CHC), and to compare to the APRI and FIB-4 scores.

## **Patients and Methods:**

### **Study design and patient selection**

This was a cross-sectional study, of the type of a phase II validation diagnostic test (19), with prospective inclusion, by spontaneous demand, of CHC adult patients (anti-HCV and HCV-RNA detectable in serum) and percutaneous liver biopsy performed within 12 months prior to inclusion or liver cirrhosis clinically diagnosed at inclusion. Patients were attended to at the hepatology outpatient clinic of the Hospital das Clínicas/Federal University of Pernambuco (HC/UFPE) between October/2012 and December/2015. Diagnosis of cirrhosis was defined by clinical and image features. Patients undergoing antiviral treatment or with diagnosis of hepatosplenic schistosomiasis, metabolic, autoimmune or cholestatic liver disease, coinfection with HBV or HIV, neoplasia, or consume of ethanol > 20 g/day for women and > 30 g/day for men were excluded. All patients signed an informed consent form and the study was approved by the Ethics Committee of the Institution.

### **Laboratory analysis, determination of APRI and FIB-4 scores**

Patients underwent fasting blood collection by peripheral vein puncture. The laboratory tests were performed by automated method. The HCV RNA was detected and the genotype was determined by real-time polymerase chain reaction using COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® (version 2, Roche, Pleasanton, CA, USA) with detection limit of 15 IU/mL. The APRI and FIB-4 scores were calculated as previously described (7,8).

### **<sup>1</sup>H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**

Serum samples, stored at -20°C, were thawed at room temperature and prepared adding 200 µL of D<sub>2</sub>O to 400 µL of serum. <sup>1</sup>H NMR spectra were obtained using a Varian Unity Plus 300 spectrometer, operating at 299.95 MHz, at 300 K. The samples were analyzed using a pulse sequence with suppression of the resonance of water and T<sub>2</sub> filter (PRESAT-CPMG), as follows: pre-saturation time of 2.0 s, acquisition time of 1.704 s, 128 repetitions and a spectral width of 4.8 kHz. Spectra were processed using line broadening equal to 0.3 Hz. The signal attributed to the methyl group of the lactate, in δ 1.33 ppm, was used as internal reference of chemical shift. The baseline of the spectra was corrected manually.

### **Liver biopsies and patients' allocation**

The ultrasonography-guided percutaneous liver biopsies were performed using a 16 G x 90 mm Menghini needle in, at most, 2 punctures. Fragments with at least 15 mm and / or 6 complete portal tracts were included in the analysis. Fibrosis was classified as F0 to F4, in accordance with METAVIR (20), by two experienced pathologist, blinded to the clinical and serological results. The patients were allocated into three groups: SF (METAVIR F  $\geq$  2), AF (METAVIR F  $\geq$  3) and C (METAVIR F = 4 or clinical cirrhosis).

### **Statistical analysis of the casuistry**

The descriptive and comparative analysis of the data was carried out using STATA programs (version 12.0, StataCorp, College Station, Texas) and GraphPad Prism (version 5.0 for Windows, GraphPad Software, La Jolla, California). The qualitative variables were presented as absolute and relative frequencies and quantitative variables as means and standard deviation or medians and 25<sup>th</sup> and 75<sup>th</sup> percentile. The chi-square test was used to compare categorical variables and Fisher's exact test was applied, when necessary. The Mann-Whitney and Student's t-test were used to compare non-parametric and parametric continuous measurements, respectively. All tests were applied with 95% confidence (p value  $\leq$  0.05).

### **Multivariate statistical analysis of spectral data and MM development**

All spectra were processed using the MestreNova software (version 9.0.1, MestreLab Research). The spectra were divided into 250 regions of 0.04 ppm, called bins, used to construct a dataset. The region containing the bins centered between  $\delta$  4.52 - 5.12 ppm was excluded to eliminate the residual signal of water. The spectra were normalized using the following expression:

$$x = \frac{x_i - \bar{x}}{\sigma}$$

Where  $x_i$  is the intensity in each bin, while  $\bar{x}$  is the arithmetic mean of the intensities observed in the bins and  $\sigma$  is the standard deviation.

PCA formalism was initially applied to dataset, to explore inherent clusters and to identify the presence of outliers. PCA did not present natural grouping in the classes of interest. Then, PLS-DA and LDA supervised formalisms were used. Three PLS-DA models were constructed for predicting FS, FA and C, respectively, using the platform MetaboAnalyst 3.0 (21). The models were validated by leave-one-out-cross-validation (LOOCV) and by permutations test. Three LDA models were developed, with the PCA score matrix as input data,

for predicting SF, using five principal components (PCs); AF, using four PCs; and C, using five PCs. The models were constructed and validated by LOOCV, using STATISTICA software (version 10.0, Quest software).

### **Analysis of the performance of the MMs and of the APRI and FIB-4 scores**

For each LDA MM, and for APRI and FIB-4 scores, a 2 x 2 contingency matrix was used to calculate sensitivity (SN), specificity (SP), positive likelihood ratio (LR+), negative likelihood ratio (LR-) and accuracy (A). A ROC curve was also constructed for APRI and FIB-4 scores.

### **Results:**

Of the 80 patients initially selected, 11 (14%) were excluded because of diagnosis of hepatosplenic schistosomiasis in 5 and hepatocellular carcinoma in 1; abuse of ethanol in 1 and inadequate liver fragment in 4. Therefore, 69 patients were evaluated, 59.4% were female, with mean age of  $57 \pm 12$  years. The HCV genotype was determined in 67 patients, the most frequent being genotype 1b, which was present in 36 (53.7%) patients, followed by genotype 3 in 16 (23.9%), genotype 1/1a in 13 (19, 4%), genotype 2 in 1 (1.5%) and genotype 4 in 1 (1.5%) patients. The main characteristics of the casuistry are described in Table 1.

**Table 1. Main demographic and laboratory characteristics of 69 CHC patients from Pernambuco/ Brazil.**

Characteristics	Total (n=69)
Gender (n, %)	
Male	28 (40.6%)
Female	41 (59.4%)
Age (years)*	57.5 ± 11.9
BMI (kg/m <sup>2</sup> )*	27.7 ± 4.7
AST (U/L)**	51.5 (33.7-88)
ALT (U/L)**	54 (32.6-106)
AST/ALT*	1.03 ± 0.44
GGT (U/L)**	81.8 (46.5-155)
Platelets (10 <sup>9</sup> /mm <sup>3</sup> )*	191 ± 78
Albumin (g/dl)*	4.08 ± 0.56
Total bilirubin (mg/dL)**	0.7 (0.50-1.09)
Alkaline phosphatase (U/L)*	94.6 ± 49.2
INR*	1.09 ± 0.14
APRI**	0.8 (0.44-2.18)
FIB-4**	2.18 (1.29-4.72)
Liver fragment length (cm)**	1.50 (1.30-1.80)
Number of portal tracts**	15.0 (12.0-20.0)
Stage of fibrosis (n, %)	
F0	2 (2.9%)
F1	25 (36.2%)
F2	14 (20.3%)
F3	10 (14.5%)
F4	18 (26.1%)

\* Mean ± standard deviation; \*\* Median (P<sub>25</sub>-P<sub>75</sub>); ALT: alanine aminotransferase; AST: aspartate aminotransferase; BMI: Body Mass Index; GGT: gamma glutamyl transferase; INR: International normalized ratio; APRI: aspartate aminotransferase to platelet ratio score; FIB-4: fibrosis score based on four factors.

Liver biopsy was performed on 54 (78%) patients. There were no serious complications or deaths related to the procedure. The median fragment had 15 mm length (P<sub>25</sub> 13 - P<sub>75</sub> 18 mm), and 15 portal tracts (P<sub>25</sub> 12 - P<sub>75</sub> 20). The METAVIR fibrosis stage was distributed as follow: F0 in 2; F1 in 25; F2 in 14; F3 in 10 and F4 in 3 patients. The diagnosis of cirrhosis was clinically established in 15 (21.7%) patients. Therefore, 42 (60.9%) patients were classified as SF, 28 (40.6%) as AF and 18 (26.1%) as C. Patients with SF, AF and C presented a superior mean age, an upper mean value of INR and upper median value of bilirubin, gamma-glutamyl transferase, APRI and FIB-4, as well as a lower mean platelets count and serum level of albumin, when compared to the groups of a lower stage of fibrosis (Table 2).

**Table 2. Main demographic and laboratory characteristics of 69 CHC patients, in accordance with the fibrosis group, from Pernambuco/ Brazil.**

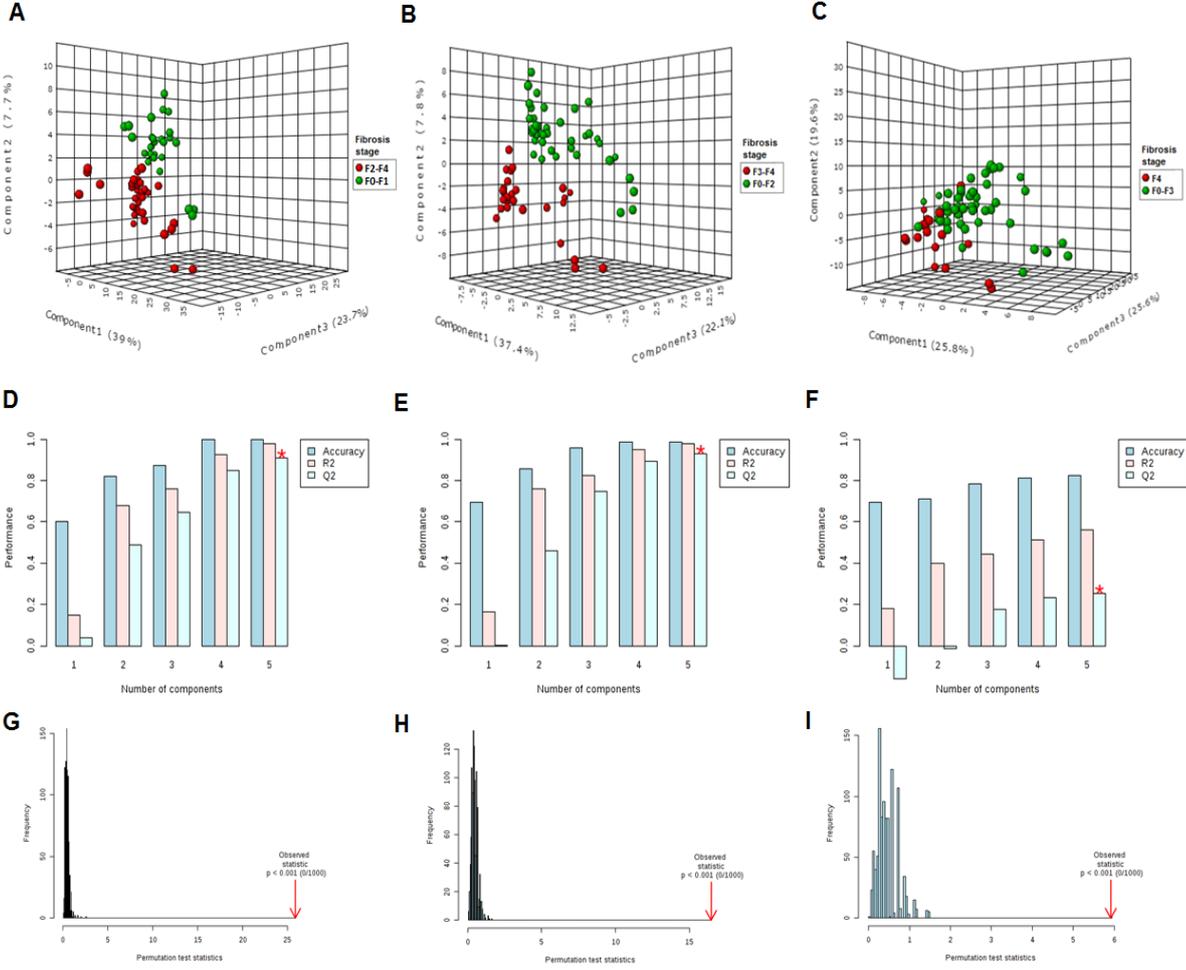
	Fibrosis group		<i>p</i>
	Significant ( $\geq$ F2) <b>n = 42</b>	Non-significant (< F2) <b>n = 27</b>	
Gender (M/F. %)	16/26 (40.6/59.4)	12/15 (38.1/61.9)	0.600 <sup>a</sup>
Age (years)*	62.16 $\pm$ 9.46	50.22 $\pm$ 11.86	<b>&lt;0.0001<sup>b</sup></b>
BMI (kg/m <sup>2</sup> )*	28.6 $\pm$ 4.9	26.3 $\pm$ 3.8	0.051 <sup>b</sup>
AST (U/L)**	61.5 (45.5-103)	34 (29.6-47)	<b>&lt;0.0001<sup>c</sup></b>
ALT (U/L)**	57.5 (41.7-108)	39.1 (26-81)	<b>0.04<sup>c</sup></b>
AST/ALT*	1.12 $\pm$ 0.47	0.91 $\pm$ 0.36	<b>&lt;0.0001<sup>b</sup></b>
GGT (U/L)**	107.5 (65.8-168)	56 (32.8-82.9)	<b>0.001<sup>c</sup></b>
Platelets (10 <sup>9</sup> /mm <sup>3</sup> )*	162 $\pm$ 72	239 $\pm$ 61	<b>&lt;0.0001<sup>b</sup></b>
Albumin (g/dL)*	3.91 $\pm$ 0.62	4.35 $\pm$ 0.30	<b>0.001<sup>b</sup></b>
Total bilirubin (mg/dL)**	0.72 (0.60-1.30)	0.50 (0.40-0.80)	<b>0.005<sup>c</sup></b>
Alkaline phosphatase (U/L)*	103.3 $\pm$ 55.6	79.2 $\pm$ 30.3	0.059 <sup>b</sup>
INR*	1.13 $\pm$ 0.17	1.03 $\pm$ 0.06	<b>0.002<sup>b</sup></b>
APRI**	1.14 (0.75-2.84)	0.48 (0.27-0.79)	<b>&lt;0.0001<sup>c</sup></b>
FIB-4**	3.45 (2.01-6.19)	1.37 (0.84-1.89)	<b>&lt;0.0001<sup>c</sup></b>
	Advanced ( $\geq$ F3) <b>n = 28</b>	Non-advanced (< F3) <b>n = 41</b>	
Gender (M/F. %)	14/14 (50.0/50.0)	14/27 (34.1-65.9)	0.188 <sup>a</sup>
Age (years)*	62.23 $\pm$ 9.42	54.25 $\pm$ 12.46	<b>0.004<sup>b</sup></b>
BMI (kg/m <sup>2</sup> )*	27.6 $\pm$ 3.9	27.9 $\pm$ 5.2	0.802 <sup>b</sup>
AST (U/L)**	79 (52.4-130)	40 (31.4-63)	<b>0.001<sup>c</sup></b>
ALT (U/L)**	62 (42.5-113.3)	43 (29-84.8)	0.078 <sup>c</sup>
AST/ALT*	1.19 $\pm$ 0.54	0.93 $\pm$ 0.33	<b>0.031<sup>b</sup></b>
GGT (U/L)**	110.5 (76.1-159.3)	66.5 (36.2-137.8)	<b>0.005<sup>c</sup></b>
Platelets (10 <sup>9</sup> /mm <sup>3</sup> )*	138 $\pm$ 65	228 $\pm$ 63	<b>&lt;0.0001<sup>b</sup></b>
Albumin (g/dL)*	3.75 $\pm$ 0.66	4.33 $\pm$ 0.29	<b>&lt;0.0001<sup>b</sup></b>
Total bilirubin (mg/dL)**	0.94 (0.70-1.48)	0.50 (0.44-0.70)	<b>&lt;0.0001<sup>c</sup></b>
Alkaline phosphatase (U/L)*	99.5 $\pm$ 38.9	90.9 $\pm$ 56.1	0.490 <sup>b</sup>
INR*	1.18 $\pm$ 0.17	1.03 $\pm$ 0.07	<b>&lt;0.0001<sup>b</sup></b>
APRI**	2.13 (0.99-3.75)	0.59 (0.39-0.92)	<b>&lt;0.0001<sup>c</sup></b>
FIB-4**	4.80 (2.56-9.30)	1.72 (1.10-2.21)	<b>&lt;0.0001<sup>c</sup></b>

	Cirrhosis (F4) n = 18		Non-cirrhosis (< F4) n = 51		
Gender (M/F. %)	7/11	(38.9/61.1)	21/30	(41.2/58.8)	0.865 <sup>a</sup>
Age (years)*	63.70	± 11.11	55.29	± 11.51	<b>0.009<sup>b</sup></b>
BMI (kg/m <sup>2</sup> )*	27.7	± 3.4	27.7	± 5.1	0.983 <sup>b</sup>
AST (U/L)**	69	(54.1-101.5)	43.2	(32.5-80)	0.059 <sup>c</sup>
ALT (U/L)**	54	(36.4-71)	50	(31-114)	0.637 <sup>c</sup>
AST/ALT*	1.38	± 0.56	0.91	± 0.31	<b>0.003<sup>b</sup></b>
GGT (U/L)**	108.5	(73.8-156.3)	74.5	(41.3-151.2)	<b>0.068<sup>c</sup></b>
Platelets (10 <sup>9</sup> /mm <sup>3</sup> )*	123	± 72	216	± 64	<b>&lt;0.0001<sup>b</sup></b>
Albumin (g/dL)*	3.41	± 0.63	4.31	± 0.29	<b>&lt;0.0001<sup>b</sup></b>
Total bilirubin (mg/dL)**	1.27	(0.70-2.88)	0.60	(0.47-0.80)	<b>&lt;0.0001<sup>c</sup></b>
Alkaline phosphatase (U/L)*	107.2	± 41.3	89.7	± 51.5	0.202 <sup>b</sup>
INR*	1.21	± 0.20	1.05	± 0.08	<b>0.003<sup>b</sup></b>
APRI**	2.35	(1.04-4.36)	0.69	(0.40-1.11)	<b>&lt;0.0001<sup>c</sup></b>
FIB-4**	5.63	(4.37-11.27)	1.85	(1.17-2.38)	<b>0.001<sup>c</sup></b>

\* Mean ± standard deviation; \*\* Median (P<sub>25</sub>-P<sub>75</sub>); Chi-square test. <sup>b</sup>T Test. <sup>c</sup> Mann-Whitney Test ALT: alanine aminotransferase; AST: aspartate aminotransferase; BMI: Body Mass Index; GGT: gamma glutamyl transferase; INR: International normalized ratio; APRI: aspartate aminotransferase to platelet ratio score; FIB-4: fibrosis score based on four factors.

The PLS-DA MM for SF showed a clear discrimination between the samples when three latent components were used (Figure 1, A). The model presented 100% accuracy and coefficient of determination (R<sup>2</sup>) of 0.98 when five latent components were used (Figure 1, D). The permutation tests, using up to 1000 permutations of the model, indicated that there was no permuted model better than the original one, with observed statistics at p < 0.001 (Figure 1, G).

**Figure 1. PLS-DA-metabonomics models for predicting significant fibrosis (A, D, G) advanced fibrosis (B, E, H) and cirrhosis (C, F, I) in 69 CHC patients from Pernambuco/Brazil.** Three-dimensional score plot (A, B, C); classification of MM using different numbers of latent components, with accuracy = 1.0/ 1.0/ 0.84,  $R^2 = 0.98/ 0.98/ 0.56$  and  $Q^2 = 0.91/ 0.93/ 0.27$ , using 5 latent components (D, E, F); permutation tests statistics for 1000 permutations with observed statistic at  $p < 0.001$  (G, H, I).



The results of the LDA MM for SF are presented in Table 3 and were compared to APRI score, with cut-off points 0.5 and 1.5. The MM showed SN of 97.6% (95% CI: 87.4 - 99.9%), similar to APRI at cut-off 0.5, which presented SN of 85.7% (95% CI: 71.5% - 94.6%). The LR- of the MM was 0.03 (95% CI: 0.004 - 0.2), whereas the LR- of the APRI  $\leq$  0.5 was 0.3 (95% CI: 0.1-0.7). The MM presented SP of 92.6% (95% CI: 75.7 - 99.1%) and LR+ 13.2 (95% CI: 3.5 - 50.1), similar to APRI at cut-off 1.5, which showed SP of 92.3% (95% CI: 74.9 - 99.9%), with LR+ 5.9 (95% CI: 1.5 - 23.2) for values  $>$  1.5.

**Table 3. LDA-metabonomics models, APRI and FIB-4 performances in prediction of significant fibrosis, advanced fibrosis and cirrhosis in 69 CHC patients from Pernambuco/ Brazil.**

Significant fibrosis												
Model (N=69)	Biopsy		P	Sensitivity		Specificity		LR+		LR-		A (%)
	F2-F4	F0-F1		(%)	CI <sub>95%</sub>	(%)	CI <sub>95%</sub>					
$\geq$ F2	41	2	$<$ 0.001 <sup>a</sup>	<b>97.6</b>	87.4-99.9	<b>92.6</b>	75.7-99.1	<b>13.2</b>	3.5-50.1	<b>0.03</b>	0.004-0.2	<b>95.7</b>
$<$ F2	1	25										
APRI (N=68)												
$>$ 0.5	36	13	0.001 <sup>b</sup>	<b>85.7</b>	71.5-94.6	50.0	29.9-0.70	1.71	1.2-2.6	<b>0.3</b>	0.1-0.7	<b>72.0</b>
$\leq$ 0.5	6	13										
$>$ 1.5	19	2	0.001 <sup>a</sup>	45.2	29.9-61.3	<b>92.3</b>	74.9-99.0	<b>5.9</b>	1.5-23.2	0.6	0.4-0.8	63.2
$\leq$ 1.5	23	24										
Advanced Fibrosis												
Model (N=69)	Biopsy		P	Sensitivity		Specificity		LR+		LR-		A (%)
	F3-F4	F0-F2		(%)	CI <sub>95%</sub>	(%)	CI <sub>95%</sub>					
$\geq$ F3	27	2	$<$ 0.001 <sup>a</sup>	<b>96.4</b>	81.7-99.1	<b>95.1</b>	83.5-99.4	<b>19.8</b>	5.1-76.5	<b>0.04</b>	0.005-0.3	<b>95.7</b>
$<$ F3	1	39										
FIB-4 (N=68)												
$>$ 1.45	25	24	0.012 <sup>a</sup>	<b>89.3</b>	71.8-97.7	40.0	24.9-56.7	1.5	1.1-2.0	<b>0.3</b>	0.1-0.8	60.3
$\leq$ 1.45	3	16										
$>$ 3.25	21	3	$<$ 0.001 <sup>a</sup>	75.0	55.1-89.3	<b>92.5</b>	79.6-98.4	<b>10</b>	3.3-30.3	0.3	0.1-0.5	<b>85.3</b>
$\leq$ 3.25	7	37										
Cirrhosis												
Model (N=69)	Biopsy		P	Sensitivity		Specificity		LR+		LR-		A (%)
	F4	F0-F3		(%)	CI <sub>95%</sub>	(%)	CI <sub>95%</sub>					
F4	18	1	$<$ 0.001 <sup>a</sup>	<b>100</b>	81.5-100	<b>98.0</b>	89.6-99.9	<b>33.8*</b>	6.9-163.7	<b>0.03*</b>	0.002-0.4	<b>98.6</b>
$<$ F4	0	50										
APRI (N=68)												
$>$ 1.00	14	16	0.002 <sup>a</sup>	<b>77.8</b>	52.4-93.6	68.0	53.3-80.5	2.4	1.5-3.9	<b>0.3</b>	0.1-0.8	70.6
$\leq$ 1.00	4	34										
$>$ 2.00	9	9	0.008 <sup>b</sup>	50.0	26.0-74.0	<b>82.0</b>	68.6-91.4	<b>2.8</b>	1.3-5.9	0.6	0.4-1.0	<b>73.5</b>
$\leq$ 2.00	9	41										

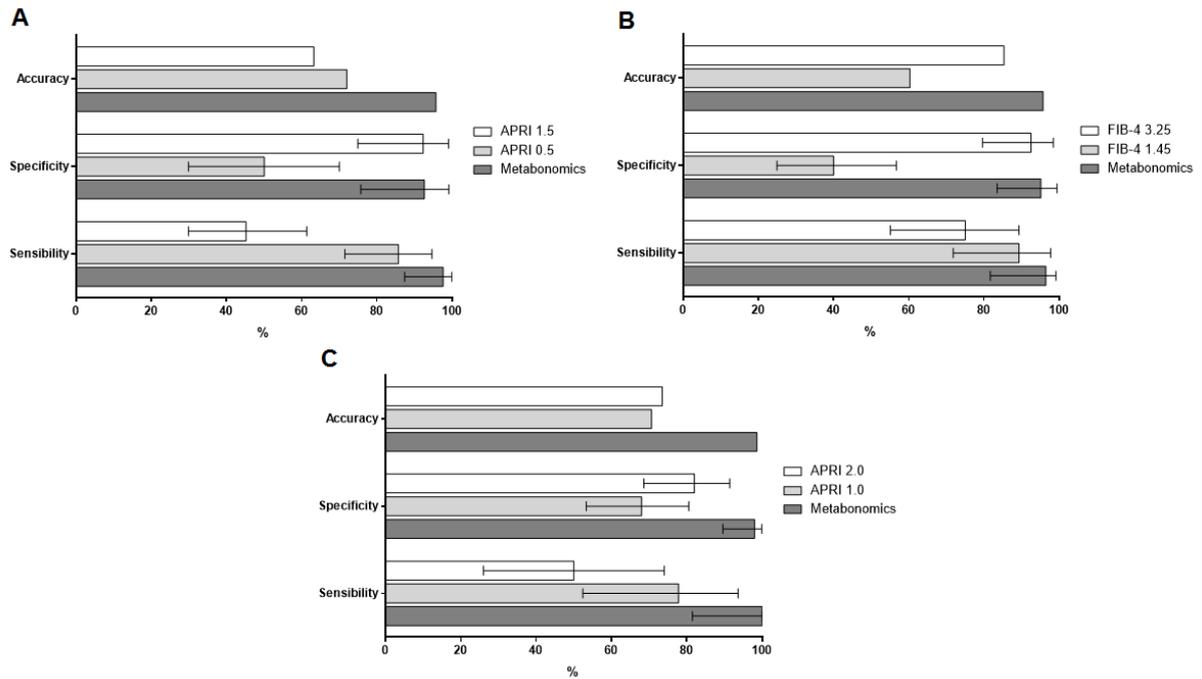
<sup>a</sup>Fisher's exact test; <sup>b</sup>Chi-square test; \*Estimated value; A: Accuracy; LR+: Positive Likelihood Ratio; LR-: Negative Likelihood Ratio

The PLS-DA MM for AF, using three latent components, discriminated all the samples, reaching 100% accuracy,  $R^2$  of 0.98 and correlation coefficient ( $Q^2$ ) of 0.93, with five latent components. Permutation tests indicated that the permuted models are not better than the original model (Figure 1- B, E, H). The LDA MM for AF showed SN of 96.4% (95% CI: 81.7 - 99, 1%) and LR- of 0.04 (95% CI: 0.005 - 0.3), similar to FIB-4 at cut-off 1.45, which showed SN of 89.3% (95% CI: 71.8 - 97.7%) and LR- 0.3 (95% CI: 0.1 - 0.8) for values  $\leq 1.5$ . The two methods also presented high values of SP e LR+, being observed SP of 95.1% (95% CI: 83.5 - 99.4%) and LR+ of 19.8 (95% CI: 5.1 - 76.5) for MM, and SP of 92.5% (95% CI: 79.6 - 98.4%) and LR+ of 10 (95% CI: 3.3 - 30.3) for FIB- 4 at cut-off 3.25 (Table 3).

The PLS-DA MM for C, using three latent components, also adequately discriminated the samples, reaching an accuracy of 84.0% with five latent components. The permutation tests indicated that the original model was not exceeded by any of the permuted models (Figure 1- C, F, I). The LDA MM for C showed SN of 100% (95% CI: 81.5 - 100%) and LR- of 0.03 (95% CI: 0.002 - 0.4), similar to APRI at cut-off 1.0, which presented SN of 77.8% (95% CI: 52.4 - 93.6), with LR- of 0.3 (95% CI: 0.1 - 0.8) for values  $\leq 1.0$ . The MM presented SP of 98% (95% CI: 89.6 - 99.9%), similar to APRI at cut-off 2.0, which showed SP 82% (95% CI: 68.6 - 91.4), but with LR+ of 33.8 (95% CI: 6.9 - 163.7) for MM, higher than the APRI  $> 2.0$  cut-off values, which presented LR+ of 2.8 (95% CI: 1.3 - 5.9). This result indicates that, by MM, the likelihood of positive test in the presence of cirrhosis is 33 times the likelihood of positive test in the absence of cirrhosis, whereas, by the APRI it is 2.8 times. (Table 3).

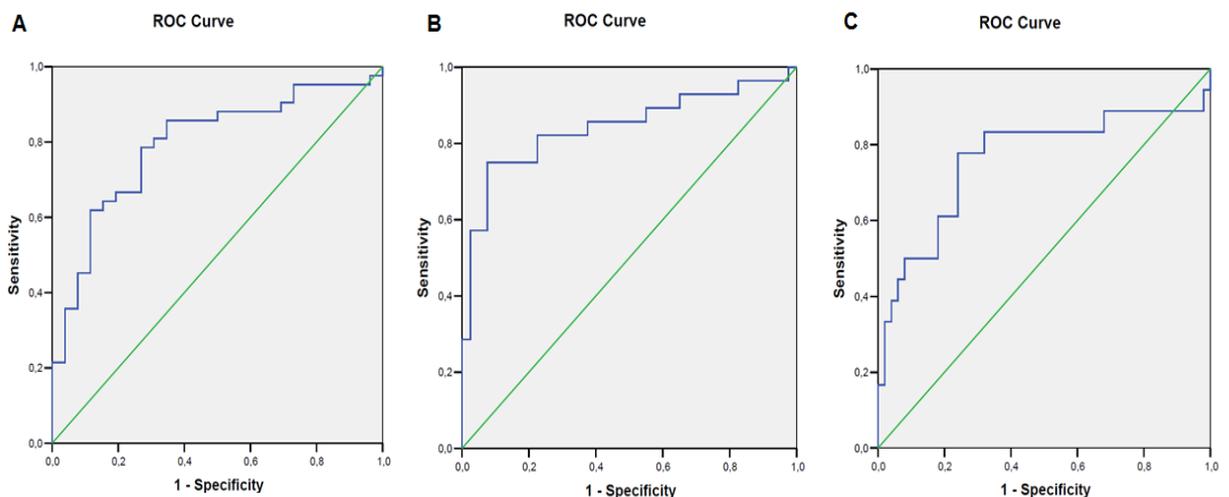
In general, the MM presented a high accuracy and performance similar to APRI score to predict SF and C, and similar to FIB-4 score to predict AF (Figure 2).

**Figure 2. Comparison of performance of the LDA-metabonomics models, APRI and FIB-4 scores, in 69 CHC patients from Pernambuco/ Brazil. MM and APRI for SF e C prediction (A, C); MM and FIB-4 for AF prediction (B).**



The AUROC of APRI for SF and C prediction was 0.79 (95% CI: 0.68 - 0.90) and 0.76 (95% CI: 0.61 - 0.91), respectively, whereas the AUROC of FIB-4 for AF prediction was 0.84 (95% CI: 0.74 - 0.95) (Supplementary Figure 1).

**Supplementary Figure 1. ROC curves of APRI and FIB-4 scores in 69 CHC patients from Pernambuco/ Brazil. APRI for prediction of SF and C (A, C); FIB-4 for prediction of AF (B).**



Of the 68 patients with APRI score, 27 (39.7%) had intermediate test values ( $> 0.5$  and  $\leq 1.5$ ). Of these, 17 (63%) had SF by METAVIR. All patients were correctly classified by the MM. Likewise, among 25 (36.8%) patients with FIB-4 values in the gray zone ( $> 1.45$  and  $\leq 3.25$ ), the MM correctly identified 4 (16%) with AF. Therefore, the MM presented 100% accuracy for predicting SF and AF when APRI and FIB-4 score values were in the gray zone. If we consider the 39.7% of unclassified and 11.8% of incorrectly classified patients, using APRI score as predictor of SF, liver biopsy would have been correctly avoided in 48.5% of cases. For other hand, if the MM were used to this end, the biopsy would have been correctly avoided in 95.7% of the patients. In relation to FIB-4, considering the 36.8% of unclassified and 8.8% of incorrectly classified patients, using this score as only predictor of AF, biopsy would have been correctly avoided in 54.4% of patients, while the MM would have prevented biopsy in 95.7% of patients.

### **Discussion:**

In our study, it was observed that the higher the severity of liver fibrosis, the greater the mean age as well as the impairment of liver function. In fact, this findings indicates the progression of liver fibrosis and reflects the natural history of the disease, which is mainly fibrosing and, on average, progresses to cirrhosis in about 30 years (22).

The MMs developed in this study to predict SF, AF and C in patients with CHC presented high performance, with values of SN, SP and A above 90%. In practice, considering the confidence intervals, the results would be classified as similar to the APRI and FIB-4 scores. However, when compared to APRI, MM showed a higher post-test prediction power for cirrhosis. Additionally, the method was able to correctly discriminate all patients who presented values of APRI and FIB-4 in the gray zone for predicting SF and AF, respectively, when these scores cannot determine absence or presence of fibrosis. That could avoid a large number of biopsies in these patients.

The metabonomics proved to be promising in evaluation of the severity of liver disease and cirrhosis and its complications, which reflects the progression of fibrosis. Indeed, Amathieu et al. correlated the severity of hepatic impairment in 124 patients with chronic alcoholic liver disease, as measured by MELD, with deficient in lipid, glucose and amino acid metabolism, using OPLS-DA model derived from serum  $^1\text{H}$  NMR (23). The same authors, using OPLS-DA model, from  $^1\text{H}$  NMR of serum, separated 93 patients with compensated alcoholic cirrhosis from 30 patients with acute on chronic liver failure, with  $Q^2$  0.73 e  $R^2$  0.63 (24). Furthermore,

Jiménez et al., using the PCA and PLS-DA MM, from  $^1\text{H}$  NMR spectrum of serum of cirrhotic patients, were able to discriminate those with minimal encephalopathy from those without encephalopathy (25). Yu et al., studying 24 patients with HBV chronic liver disease and 23 healthy controls, developed gas chromatography-mass spectrometry model of serum samples that discriminated patients with a higher degree of hepatic impairment (MELD > 30) from those with MELD between 20 and 30 and MELD < 20 (26). A similar finding was described by Qi et al., who demonstrated that OPLS-DA model, based on  $^1\text{H}$  NMR of serum samples, discriminated 30 compensated HBV cirrhotic patients from 30 patients with decompensated cirrhosis, with 85% accuracy (27).

Regarding the evaluation of liver fibrosis, the metabonomics and metabolomics strategies have also showed to be promising. In fact, Sands et al., on analyzing  $^1\text{H}$  NMR serum spectrum of healthy controls and CHC patients, constructed MM by OPLS-DA, using METAVIR and ELF score as references standards, that discriminated 6 patients without fibrosis (F0) from 34 with moderate fibrosis (F1-F2) and from 22 with advanced fibrosis (F3-F4) in validation cohort (28). Embade et al., differentiated 27 cirrhotic patients (F4) from 30 patients without fibrosis (F0), using a PLS-DA model, through serum spectral analysis by  $^1\text{H}$  NMR, in CHC patients. (29). Moreover, Sarfaraz et al., using serum  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy of 45 patients with CHC, constructed a PLS-DA model that discriminated F0-F2 patients from F3-F4 patients with good predictive power ( $R^2$  0.673) (30).

Our study corroborates the findings of these authors and suggests that the metabonomics strategy is capable to discriminate CHC patients with fibrosis stage F0-F1 from F2-F4 patients; F0-F2 from F3-F4 patients, F0-F3 from F4 patients and to identify patients who are in the gray zone of APRI and FIB-4 scores.

As a limitation of our study, the small number of patients tested could restrict the applicability of the methodology. It should be emphasized that the models were validated internally, which may have over-adjusted the results. Therefore, further studies with a larger number of tested patients and external validation of the models are necessary, in order to confirm the performance of the models, for later incorporation into clinical practice.

**Conclusions**

In this preliminary study, the metabonomics strategy was able to discriminate SF, AF and C in CHC patients, showing to be promising as a non-invasive tool to evaluate liver fibrosis. The method presented high accuracy in the gray zone of APRI and FIB-4 scores, which could avoid large numbers of biopsies in CHC patients.

**Acknowledgements**

We are grateful to Brazilian agencies CNPq and FACEPE, which are fomenters of research in our region.

## References

1. World Health Organization. Global Burden of Disease (GBD) for Hepatitis C. *J Clin Pharmacol* 2004;44(1):20–9.
2. Lozano R, Naghavi M, Foreman K, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010 : a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 2012;380:2095–128.
3. Brasil. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico-Hepatites Virais. Brasília, Ministério da Saúde, 2015.
4. Ferreira PRA, Brandão-Mello CE, Estes C, et al. Disease burden of chronic hepatitis C in Brazil. *Brazilian J Infect Dis* 2015;19(4):363–8.
5. Rockey DC, Caldwell SH, Goodman ZD, et al. Liver biopsy. *Hepatology*. 2009;49(3):1017–44.
6. Regev A, Berho M, Jeffers LJ, et al. Sampling Error and Intraobserver Variation in Liver Biopsy in Patients With Chronic HCV Infection. *Am J Gastroenterol*. 2002;97(10):2614–8.
7. Wai CT, Greenson JK, Fontana RJ, et al. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2003;38(2):518–26.
8. Sterling RK, Lissen E, Clumeck N, et al. Development of a simple noninvasive index to predict significant fibrosis in patients with HIV/HCV coinfection. *Hepatology*. 2006;43(6):1317–25.
9. EASL, ALEH. EASL-ALEH Clinical Practice Guidelines: Non-invasive tests for evaluation of liver disease severity and prognosis. *J Hepatol* 2015;63:237–64.
10. Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. “Metabonomics”: understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica*. 1999;29(11):1181–9.
11. Dunn WB, Ellis DI. Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. *Trends Anal Chem* 2005;24(4):285–94.
12. Nicholson JK, Lindon JC. Metabonomics. *Nature*. 2008;455(23):1054–6.
13. Amathieu R. Nuclear magnetic resonance based metabolomics and liver diseases: Recent advances and future clinical applications. *World J Gastroenterol* 2016;22(1):417–26.
14. Godoy MMG, Lopes EP a, Silva RO, et al. Hepatitis C virus infection diagnosis using metabonomics. *J Viral Hepat* 2010;17(12):854–8.
15. Munshi SU, Taneja S, Bhavesh NS, et al. Metabonomic analysis of hepatitis e patients shows deregulated metabolic cycles and abnormalities in amino acid metabolism. *J Viral Hepat*. 2011;18: 591-602

16. Shariff MIF, Ladep NG, Cox IJ, et al. Characterization of urinary biomarkers of hepatocellular carcinoma using magnetic resonance spectroscopy in a Nigerian population. *J Proteome Res.* 2010;9(2):1096–103.
17. Shariff MIF, Gomaa AI, Cox IJ, et al. Urinary metabolic biomarkers of hepatocellular carcinoma in an Egyptian population: A validation study. *J Proteome Res.* 2011;10(4):1828–36.
18. Gao H, Lu Q, Liu X, et al. Application of <sup>1</sup>H NMR-based metabonomics in the study of metabolic profiling of human hepatocellular carcinoma and liver cirrhosis. *Cancer Sci.* 2009;100(4):782–5.
19. Sackett DL. Evidence base of clinical diagnosis: The architecture of diagnostic research. *BMJ* 2002;324(7336):539–41.
20. Bedossa P, Poynard T, METAVIR Cooperative Study Group. An Algorithm for the Grading of Activity in Chronic Hepatitis C. *Hepatology.* 1996;24(2):289–93.
21. Xia J, Sinelnikov I V., Han B, et al. MetaboAnalyst 3.0--making metabolomics more meaningful. *Nucleic Acids Res* 2015;43(W1):W251-7.
22. Poynard T, Ratziu V, Benmanov Y, et al. Fibrosis in patients with chronic hepatitis C: detection and significance. *Semin Liver Dis* 2000;20(1):47–55.
23. Amathieu R, Nahon P, Triba M, et al. Metabolomic Approach by <sup>1</sup>H NMR Spectroscopy of Serum for the Assessment of Chronic Liver Failure in Patients with Cirrhosis. *J Proteome Res.* 2011;10:3239–45.
24. Amathieu R, Triba MN, Nahon P, et al. Serum <sup>1</sup>H-NMR metabolomic fingerprints of acute-on-chronic liver failure in intensive care unit patients with alcoholic cirrhosis. *PLoS One* 2014;9(2):e89230.
25. Jiménez B, Montoliu C, Macintyre D A, et al. Serum Metabolic Signature of Minimal Hepatic Encephalopathy by H-Nuclear Magnetic Resonance research articles. *J Proteome Res.* 2010;9(10):5180–7.
26. Yu K, Sheng G, Sheng J, et al. A metabonomic investigation on the biochemical perturbation in liver failure patients caused by hepatitis B virus. *J Proteome Res.* 2007;6(7):2413–9.
27. Qi SW, Tu ZG, Peng WJ, et al. <sup>1</sup>H NMR-based serum metabolic profiling in compensated and decompensated cirrhosis. *World J Gastroenterol.* 2012;18(3):285–90.
28. Sands CJ, Guha IN, Kyriakides M, et al. Metabolic Phenotyping for Enhanced Mechanistic Stratification of Chronic Hepatitis C-Induced Liver Fibrosis. *Am J Gastroenterol* 2014;110(1):159–69.

29. Embade N, Mariño Z, Diercks T, et al. Metabolic characterization of advanced liver fibrosis in HCV patients as studied by serum <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy. *PLoS One* 2016;11(5):1–19.
30. Sarfaraz MO, Myers RP, Coffin CS, et al. A quantitative metabolomics profiling approach for the noninvasive assessment of liver histology in patients with chronic hepatitis C. *Clin Transl Med* 2016;5(1):33.

**APÊNCIDE F - Versão do artigo 2 em inglês**

**Title: Validation of Metabonomic Models by Nuclear Magnetic Resonance of Hydrogen for Predicting Significant and Advanced Liver Fibrosis in Patients with Chronic Hepatitis C**

**Authors:** Andrea Dória Batista<sup>1,3</sup>; Carlos Jonnatan Pimentel Barros<sup>2</sup>; Ronaldo Dionísio da Silva<sup>2</sup>; Joelma Carvalho Santos<sup>1</sup>; Maria Chiara Chindamo<sup>4</sup>; Cristiane Alves Villela-Nogueira<sup>4</sup>; Renata de Mello Perez<sup>4</sup>; Henrique Sérgio Moraes Coelho<sup>4</sup>; Ricardo Oliveira Silva<sup>2</sup>; Edmundo Pessoa de Almeida Lopes<sup>1,3</sup>

**Affiliation:**

- 1- Postgraduate Program in Tropical Medicine. Center for Health Sciences. Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.
- 2- Department of Fundamental Chemistry. Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.
- 3- Hospital das Clínicas, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.
- 4- Department of Clinical Medicine of the Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

**Corresponding author:** Andrea Dória Batista. Address: Avenida Professor Moraes Rego, 135. Cidade Universitária, Recife/Pernambuco, Brazil. Zip code 50670-901.  
e-mail: adoria04@globo.com

**Keywords:** hepatitis C, chronic; Hepatitis C/diagnosis, fibrosis; biopsy/reference standard; biomarkers/blood; magnetic resonance spectroscopy, metabolomics; predictive value of tests.

**List of Abbreviations:** CHC: Chronic Hepatitis C; <sup>1</sup>H-NMR: hydrogen nuclear magnetic resonance; APRI: aspartate aminotransferase to platelet ratio index; FIB-4: fibrosis index based on four factors; PCA: principal components analysis; LDA: linear discriminant analysis; PLS-DA: partial least squares discriminant analysis; PC: principal component; AUROC: area under receiver operator characteristic curve.

**Abstract: Background & Aims:** The gold standard in assessing fibrosis in patients with chronic hepatitis C (CHC) is liver biopsy, an invasive method, subject to complications and errors. Alternatively, biomarkers have been tested. Metabonomics is an analytical strategy that uses  $^1\text{H}$  NMR spectral data to classify biofluids based on their biochemical status. We aimed to develop metabonomic models (MM) using  $^1\text{H}$  NMR spectra of serum samples to predict significant (SF) and advanced (AF) liver fibrosis in CHC patients, and to compare to APRI and FIB-4 scores, using biopsy as reference standard. **Methods:** Of 180 patients, 126 (70%) were for constructing models and 54 (30%) for validation. Patients diagnosed with liver disease due to another etiology, HBV/HIV coinfection or excessive ethanol intake were excluded.  $^1\text{H}$ -NMR spectra were obtained using the Varian Unity 300 spectrometer. The MMs were constructed using PLS-DA and LDA from the PCA score matrix, considering SF (METAVIR  $\geq$ F2) and AF (METAVIR  $\geq$ F3). The performance of the MMs was compared to APRI and FIB-4 scores. **Results:** 103 patients (57.2%) had SF and 51 (28.3%) had AF. The externally validated MMs presented sensitivity and specificity of 100% (95% CI: 86.8-100%) and of 100% (95% CI: 87.7-100%), for predicting SF, and 100% (95% CI: 71.5-100%) and 100% (95% CI: 91.8-100%), for predicting AF, a performance similar to APRI and FIB-4. The MMs correctly classified 95 (54.3%) patients with APRI between 0.5 and 1.5, and 76 (44.2%) with FIB-4 between 1.45 and 3.25. **Conclusions:** The MMs developed presented high accuracy for SF and AF prediction in CHC patients, a similar performance to APRI and FIB-4 and high accuracy in the gray zone of these scores.

**Introduction:**

Approximately 130-170 million people worldwide are chronically infected with the hepatitis C virus (HCV) (1) and an estimated 500,000 individuals died in 2010 from virus-related illnesses, including cirrhosis and hepatocellular carcinoma (CHC). (2) In Brazil, the estimated prevalence of hepatitis C is 1,450,000 cases (3) and about 8,000 deaths were due to HCV-related diseases in 2013 (4). Liver fibrosis resulting from chronic viral infection leads to structural and functional alterations of the organ, with an increased risk of developing cirrhosis and its complications (5,6)

The advent of new direct-acting antivirals, which act on different targets of viral replication, has drastically changed the scenario of CHC. The combined use of the new drugs allows well-tolerated oral treatment for a short period (12 to 24 weeks) and with low risk of resistance. Sustained virological response occurs in more than 95% of patients (7,8), and is associated with a 2 to 3-fold reduction in mortality and a 5 to ten-fold reduction in the risk of CHC over a period of 5 to 10 years (9). Patients with significant fibrosis are at increased risk of the disease progressing. Therefore, this treatment is formally recommended for patients from this stage of fibrosis (7). However, it is not widely available in the Brazilian public health system and is only offered for patients with advanced liver fibrosis (METAVIR  $\geq$  F3) and for those in a special clinical situation, such as those who are co-infected, have had transplants, have chronic renal insufficiency or have an extra-hepatic manifestation of the disease (10). Thus, an accurate diagnosis of significant and advanced fibrosis is important in the clinical practice of public health services, to determine the necessity and urgency of the treatment, and to monitor complications of the disease.

A liver biopsy is still considered a gold standard for evaluating liver fibrosis, but the procedure is invasive, with minor complications, mainly pain, occurring in 6.5% of cases (11), major complications such as moderate to severe bleeding occurring in 0.05 to 5.3% of cases (12–14) and mortality in around 0.01% of cases (12,15). Sampling error on specimen collection and intra- or inter-observer variability in histopathological evaluation may lead to discordant results in 33% of cases (16), making biopsy an imperfect reference standard. For these reasons, several non-invasive surrogate fibrosis markers, serological and physical ones, have been tested. Among the serological markers, APRI and FIB-4, widely used in CHC patients, stand out because they are not patented and based on easily obtained clinical and laboratory parameters (17,18). In general, serologic markers have good accuracy at excluding significant fibrosis and confirming cirrhosis, but they are not hepato-specific and fail to diagnose intermediate fibrosis (19). The interval between the lower and upper cut-off points of the scores

is called the gray zone, and it is not possible in these cases to exclude or confirm significant or advanced fibrosis. In a meta-analysis including 14 studies and several biomarkers, including APRI, Fibrotest®, Forns Index and the Enhanced Liver Fibrosis score (ELF), Parkes et al. demonstrated that only 30 to 35% of the patients are correctly classified with presence or absence of significant fibrosis, and thus can dispense doing a biopsy (20).

Metabolomics is defined as "a quantitative measure of the dynamic and multiparametric metabolic response of living organisms to pathological or genetic modifications" (21). As a result of homeostasis, the presence of a pathological condition changes the profile of endogenous metabolites, which can be monitored by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy, since most known metabolites contain hydrogen atoms (22). Thus, the method seeks to discriminate the samples in groups associated with their biochemical status and is therefore specific for a given disease (22,23). The analysis of the metabolites of a biofluid can be quantitative or qualitative. While metabonomics studies the biochemical profile of the sample, metabolomics seeks to identify and quantify the main metabolites determining this profile. The processing and analysis of <sup>1</sup>H NMR spectral data uses multivariate statistical techniques (24,25) and the method has shown great potential in diagnosing diseases, in discovering new biomarkers and in identifying altered biochemical pathways due to pathological processes or drug use (26). In our area, Godoy et al., using a metabolic model, constructed from the <sup>1</sup>H NMR spectrum of urine samples, were able to discriminate CHC patients from healthy individuals (27). Due to the biochemical alterations that the mechanisms related to hepatic fibrosis can cause, the objective of this study was to develop metabolic models using <sup>1</sup>H NMR spectrum of serum samples as a non-invasive method for predicting significant and advanced liver fibrosis in CHC patients, and comparing these with the APRI and FIB-4 scores.

## **Patients and Methods:**

### **Study design and patient selection:**

This is a cross-sectional study, of the type phase II of diagnostic test validation (28), with prospective inclusion, by spontaneous demand, of patients older than 18 years, with diagnosis of CHC (anti-HCV reagent and detectable HCV-RNA) and who underwent percutaneous liver biopsy at the time of inclusion in the study, as a routine pre-treatment evaluation. The patients were part of a study developed at the Hepatology outpatient clinic of the University Hospital Clementino Fraga Filho/ Federal University of Rio de Janeiro (HUCFF/UFRJ) between 2010 and 2014 (29). Patients with previous antiviral treatment,

autoimmune, metabolic or cholestatic liver disease, coinfection with hepatitis B virus or human immunodeficiency virus, alcohol abuse or liver transplantation were excluded.

Patients allocation:

Patients were allocated into two groups. The first group, called the model group, included 70% of patients and was used to construct the MMs. The second group, called validation group, included 30% of patients and was used for external validation of the MMs. Patients were also grouped according to the stage of liver fibrosis, by histopathological classification METAVIR (30) in: significant fibrosis (SF: METAVIR  $\geq$  F2) and advanced fibrosis (AF: METAVIR  $\geq$  F3).

#### **Laboratory analysis, determination of APRI and FIB-4 scores:**

Patients underwent fasting blood collection, by peripheral vein puncture on the day of biopsy or with a maximum interval of 3 months. The blood was centrifuged to obtain serum, stored at  $-70^{\circ}\text{C}$ . The serum levels of AST, ALT, GGT, AF, bilirubin, albumin, platelet count and determining the time of activity of prothrombine and the international normalized index (INR) were performed by an automated method, in accordance with the routine of the laboratory of HUCFF/UFRJ. RNA-HCV detection and genotype determination were performed by real-time polymerase chain reaction (PCR) using COBAS<sup>®</sup> AmpliPrep/COBAS<sup>®</sup> TaqMan<sup>®</sup> (version 2, Roche, Pleasanton, CA, USA) with the limit of 15 IU / mL detection.

The APRI and FIB-4 scores were calculated according to formulae described before (17,31). The cut-off points  $\leq 0.5$  and  $> 1.5$  of APRI were used to exclude and confirm SF. For the FIB-4, cutoff points  $\leq 1.45$  and  $> 3.25$  were used to exclude and confirm AF.

#### **Nuclear Magnetic Resonance Analysis:**

Serum samples stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  were thawed at room temperature, and then 200  $\mu\text{L}$  of D<sub>2</sub>O (deuterated water) was added to 400  $\mu\text{L}$  of each sample, which, after homogenization, were transferred to 5 mm NMR tube. NMR spectra were obtained using a Varian Unity Plus 300 spectrometer, operating at 299.95 MHz for <sup>1</sup>H nucleus, at 300 K. The samples were analyzed using a pulse sequence with water resonance suppression (PRESAT), using a pre-saturation time of 2.0 s, an acquisition time of 1704 s, 128 repetitions and a spectral width of 4.8 kHz. The Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) sequence was used as a T<sub>2</sub> filter. Each induction-free decay was multiplied by an exponential function of 0.3 Hz prior to Fourier transformation. The signal attributed to the methyl group of lactate, in  $\delta$  1.33 ppm, was used as

an internal reference of chemical displacement. The baseline of the spectra was corrected manually.

### **Liver biopsies:**

Percutaneous liver biopsies, guided by US, were performed with a Tru Cut 14 or 16 G needle (TSK Laboratoire, Akasaka, Japan), which obtained a fragment of up to 20 mm per puncture. Fragments with a length of less than 10 mm or containing less than 6 portal spaces were considered inadequate. The specimens were fixed in 10% formalin solution, added to a paraffin block, cut to a thickness of 5  $\mu\text{m}$ , and then stained with hematoxylin and eosin, periodic acid-Schiff, reticulin, Masson's trichrome and Picrosirius trichome. Fibrosis was classified as F0 to F4, in accordance with METAVIR (30), by an experienced pathologist, who was blind as to the clinical and serological results.

### **Statistical analysis of the casuistry:**

The descriptive and comparative analysis of the casuistry was carried out with STATA programs (version 12.0, StataCorp, College Station, Texas), GraphPad Prism (version 5.0 for Windows, GraphPad Software, La Jolla, California) and Excel 2010 (Microsoft Office 2010). The qualitative variables were presented as absolute and relative frequencies. The normality of the variables was verified using the Kolmogorov-Smirnov test. Quantitative variables were expressed as means and standard deviation or medians and 25th and 75th percentile. The chi-square test was used to compare categorical variables, applying Fisher's exact test when necessary. For the comparative analysis of non-parametric continuous measurements, the Mann-Whitney test was used, and for parametric measurements, the Student's T test. All tests were applied with 95% confidence ( $p$  value  $\leq 0.05$ ).

Multivariate statistical analysis of spectral data and MM development:

All spectra were processed using MestreNova software (version 9.0.1, MestreLab Research). The spectra were divided into 250 regions of 0.04 ppm called bins, and used to construct a matrix of samples versus variables (bins). The region containing the bins centered between  $\delta$  4.52 - 5.12 ppm was excluded to eliminate the residual signal of water. The spectra were normalized using the following expression:

$$x = \frac{x_i - \bar{x}}{\sigma}$$

Where  $x_i$  is the intensity in each bin, while  $\bar{x}$  it is the arithmetic mean of the intensities observed in the bins, and  $\sigma$  is the standard deviation.

In the construction of the MMs, PCA formalism was initially applied to the entire data set to explore inherent clusters and to identify the presence of outliers. The PCA did not present grouping in the classes of interest. The PLS-DA and LDA formalisms were then used to construct the models. For the PLS-DA models, the standard data matrix was used on the online platform MetaboAnalyst 3.0 (32). The LDA models were constructed using STATISTICA software (version 10.0, Quest software), using the PCA score matrix as input data. Using Wilks' lambda, the principal components (PCs) to be used in the discriminant functions were selected. With these models, a better separation of groups was achieved. Two LDA models were constructed: the first to predict significant fibrosis, using three PCs and the second to predict advanced fibrosis, also using three PCs.

#### **Performance analysis of the MMs and the APRI and FIB-4 scores:**

The LDA MMs were tested in the model population by "leave-one-out-cross-validation" (LOOCV) and in the population validation by external validation. Tables of 2 x 2 contingency were used to calculate sensitivity (SN), specificity (SP), the positive likelihood ratio (LR+), negative likelihood ratio (LR-), and the accuracy (A) of the MMs and APRI score, with upper and lower cut-off points of  $\leq 0.5$  and  $> 1.5$ , and FIB-4, with upper and lower cut-off points of  $\leq 1.45$  and  $> 3.25$ . A ROC curve was constructed for the APRI and FIB-4 scores. The results from the generated MMs compared to the results from APRI for the prediction of significant fibrosis, and those from the FIB-4, for the prediction of advanced fibrosis, with biopsy as the reference standard.

#### **Ethical Considerations:**

All participants signed a free and informed consent form. The research project was approved by the Committee of Ethics in Research of the Health Sciences Center/ Federal University of Pernambuco under the number 93.127 / 2012.

**Results:**

180 patients were included, 59.4% female, with a median age of 54 years. Genotype was determined in 151 patients. The most frequent genotype was 1a, in 57 (37.7%) patients followed by 1b in 52 (34.4%) patients, genotype 1 in 23 (15.2%), 3a in 14 (9.3%), genotype 2 in 3 (2%) and genotype 3 in 2 (1.3%) patients.

The model group included 126 (70%) patients and the validation group included 54 (30%) patients. Table 1 shows that the main clinical and laboratory characteristics of model and validation groups were similar

**Table 1. Major demographic and laboratory characteristics of 180 patients with chronic hepatitis C, in accordance with the type of population (model and validation) in Rio de Janeiro / RJ, from 2010 to 2014.**

Characteristics	Total (n=180)	Model (n=126)	Validation (n=54)	P
Sex (n, %)				
Male	73 (40.6%)	56 (44.4%)	17 (31.5%)	0.105 <sup>a</sup>
Female	107 (59.4%)	70 (55.6%)	37 (68.5%)	
BMI (kg/m <sup>2</sup> )*	26.7 ± 5.1	26.7 ± 5.26	26.7 ± 4.56	0.980 <sup>b</sup>
Age (years)**	54 (47-59.8)	55 (48-60)	53.5 (43-59.2)	0.213 <sup>c</sup>
AST (U/L)**	51 (38-78)	53 (38.2-83.2)	48 (33-67.5)	0.085 <sup>c</sup>
ALT (U/L)**	74.5 (57.8-126.2)	76.5 (57-127)	70.5 (58-116.5)	0.605 <sup>c</sup>
GGT (U/L)**	87 (48-145)	88 (49-154)	78 (44-144)	0.585 <sup>c</sup>
Platelets (10 <sup>9</sup> /mm <sup>3</sup> )*	202 ± 62	200 ± 62	216 ± 62	0.110 <sup>b</sup>
Albumin (g/dl)**	4 (3.8-4.2)	4.1 (3.8-4.3)	4.0 (3.8-4.2)	0.490 <sup>c</sup>
Total Bilirubin (mg/dL)**	0.6 (0.40-0.70)	0.6 (0.4-0.7)	0.5 (0.4-0.7)	0.233 <sup>c</sup>
Alkaline Phosphatase (U/L)**	96.5 (78-119.2)	98 (77-127)	95 (82-112)	0.566 <sup>c</sup>
INR**	1.00 (1.00-1.02)	1.00 (1.00-1.05)	1.00 (1.00-1.01)	0.585 <sup>c</sup>
Size of the liver fragment (cm)*	1.52 ± 0.36	1.53 ± 0.34	1.52 ± 0.41	0.929 <sup>b</sup>
Number of PS*	15.98 ± 5.54	15.83 ± 5.19	16.31 ± 6.30	0.608 <sup>b</sup>
Significant fibrosis (n, %)				
F2-F4	103 (57.2%)	77 (61.1%)	26 (48.1%)	0.107 <sup>a</sup>
Advanced Fibrosis (n, %)				
F3-F4	51 (28.3%)	40 (31.7%)	11 (20.4%)	0.121 <sup>a</sup>

\* Mean ± standard deviation; \*\* Median (P25-P75); <sup>a</sup>The chi-square test; <sup>b</sup> T-Test; <sup>c</sup> C Mann-Whitney Test; BMI: Body Mass Index; ALT: alanine aminotransferase; AST: aspartate aminotransferase; GGT: gamma glutamyl transferase; INR: International normalized ratio; PS: portal spaces.

The liver fragment had a mean size of  $15.2 \pm 3.6$  mm, with  $15.98 \pm 5.54$  portal spaces. The stage of fibrosis by the METAVIR classification was thus distributed in: F0 in 3 (1.7%) patients; F1 in 74 (41.1%); F2 in 52 (28.9%); F3 in 37 (20.6%) and F4 in 14 (7.8%). Therefore, 103 (57.2%) patients were classified as SF and 51 (28.3%) as AF. The groups divided by the stage of fibrosis were similar regarding gender and body mass index. Patients with significant and advanced fibrosis were older, had higher levels of AST, ALT, GGT and AF, higher APRI and FIB-4 values, as well as a lower platelet count, in relation to the groups with a lower stage of fibrosis. Patients with advanced fibrosis had an even higher AST/ALT ratio, higher BT levels and higher INR values, compared to patients with a lower stage of fibrosis (Table 2).

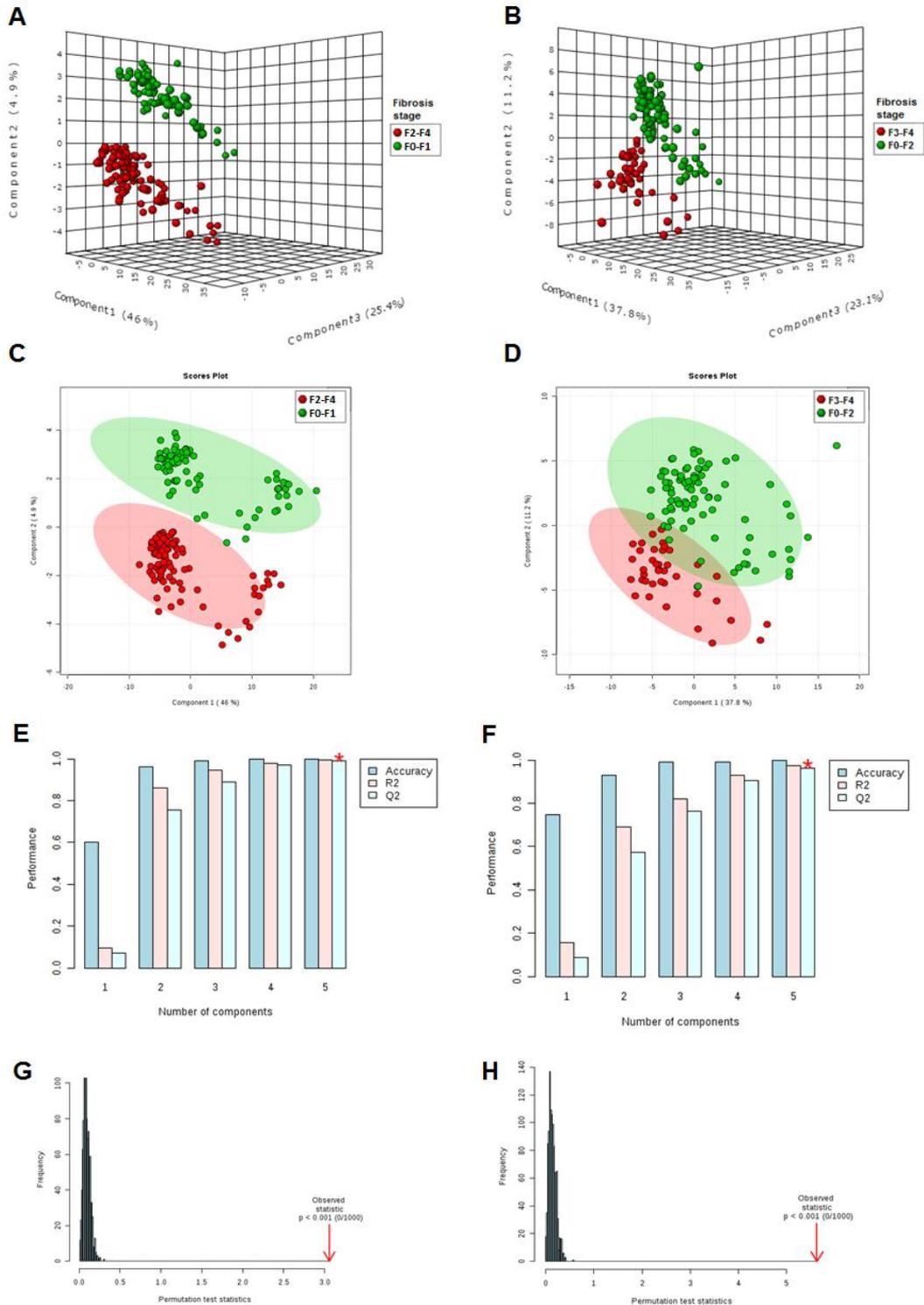
**Table 2. Principal demographic and laboratory characteristics of 180 patients with chronic hepatitis C, in accordance with the fibrosis group, in Rio de Janeiro / RJ, from 2010 to 2014.**

Characteristics	Fibrosis Group		p
	Significant ( $\geq$ F2) n = 103	Non-Significant (< F2) n = 77	
Sex (M/F, %)	43/60 (41.7/58.3)	30/47 (39.0/61.0)	0.706 <sup>a</sup>
BMI (kg/m <sup>2</sup> )*	26.8 $\pm$ 5.2	26.6 $\pm$ 4.88	0.832 <sup>b</sup>
Age (years)**	57 (52-62)	50 (37-56)	<0.0001 <sup>c</sup>
AST (U/L)**	57.5 (44-105.5)	45 (32-56)	<0.0001 <sup>c</sup>
ALT (U/L)**	87 (64.3-152)	68 (53-87)	0.001 <sup>c</sup>
AST/ALT*	0.67 $\pm$ 0.23	0.68 $\pm$ 0.22	0.880 <sup>b</sup>
GGT (U/L)**	106 (57-161)	60 (39.5-10.5)	<0.0001 <sup>c</sup>
Platelets (10 <sup>9</sup> /mm <sup>3</sup> )*	185 $\pm$ 53	230 $\pm$ 64	<0.0001 <sup>b</sup>
Albumin (g/dL)**	4.0 (3.7-4.2)	4.1 (3.9-4.3)	0.023 <sup>c</sup>
TB (mg/dL)**	0.60 (0.50-0.75)	0.50 (0.40-0.70)	0.209 <sup>c</sup>
ALP (U/L)**	102 (83-130.5)	89 (71-107.5)	0.005 <sup>c</sup>
INR**	1.00 (1.00-1.05)	1.00 (1.00-1.00)	0.073 <sup>c</sup>
APRI**	0.95 (0.62-1.61)	0.55 (0.36-0.77)	<0.0001 <sup>c</sup>
FIB-4**	2.20 (1.48-3.23)	1.17 (0.77-1.63)	<0.0001 <sup>c</sup>
	Advanced ( $\geq$ F3) n = 51	Non-Advanced (< F3) n = 129	
Sex (M/F, %)	19/32 (37.3/62.7)	54/75 (41.9/58.1)	0.571 <sup>a</sup>
BMI (kg/m <sup>2</sup> )*	57 (53-61)	53 (45-59)	0.014 <sup>c</sup>
Age (years)*	27.5 $\pm$ 5.8	26.3 $\pm$ 4.7	0.180 <sup>b</sup>
AST (U/L)**	79.5 (46.8-140.3)	48 (36-63)	<0.0001 <sup>c</sup>
ALT (U/L)**	95 (66-181)	71 (55-103.5)	0.001 <sup>c</sup>
AST/ALT**	0.70 (0.61-0.92)	0.63 (0.53-0.74)	0.001 <sup>c</sup>
GGT (U/L)**	126.5 (88.3-224.5)	65.5 (44-120.5)	<0.0001 <sup>c</sup>
Platelets (10 <sup>9</sup> /mm <sup>3</sup> )*	167 $\pm$ 52	220 $\pm$ 59	<0.0001 <sup>b</sup>
Albumin (g/dL)**	3.9 (3.6-4.1)	4.1 (3.9-4.3)	0.001 <sup>c</sup>
TB (mg/dL)**	0.60 (0.50-0.80)	0.50 (0.40-0.70)	0.027 <sup>c</sup>
ALP (U/L)**	102.5 (76.8-131.2)	93 (72.2-114)	0.010 <sup>c</sup>
INR**	1.00 (1.00-1.09)	1.00 (1.00-1.00)	0.014 <sup>c</sup>
APRI**	1.26 (0.80-2.84)	0.64 (0.38-0.94)	<0.0001 <sup>c</sup>
FIB-4**	2.95 (1.74-4.02)	1.35 (0.84-1.98)	<0.0001 <sup>c</sup>

\* Mean  $\pm$  standard deviation; \*\* Median (P25-P75); <sup>a</sup>The chi-square test; <sup>b</sup> T-Test; <sup>c</sup> Mann-Whitney Test; BMI: Body Mass Index; ALT: alanine aminotransferase; AST: aspartate aminotransferase; GGT: gamma glutamyl transferase; ALP: alkaline phosphatase; TB: total bilirubin INR: International normalized ratio; APRI: index of the aspartate aminotransferase ratio on platelets FIB-4: fibrosis index based on four factors;

Figure 1 shows the results of MM constructed with the PLS-DA formalism to discriminate SF and AF. The MM for predicting SF shows a clear discrimination between the samples when two (Figure 1, C) and three latent components (Figure 1, A) were used. The figure of merit of the model with 5 latent components shows 100% accuracy. The calibration graph, with the determination coefficient R<sup>2</sup>, shows the values predicted by the model versus the actual values, and the cross-validation graph with the coefficient of determination Q<sup>2</sup> presents the values predicted by the model (with the withdrawal of one or more samples) versus the actual values. A PLS-DA model with high discriminatory power presents values of R<sup>2</sup> and Q<sup>2</sup> close to 1. Our model obtained R<sup>2</sup> and Q<sup>2</sup>  $\approx$  0.98, suggesting a high power of prediction (Figure. 1, E). The graph of tests with up to 1000 permutations showed  $p \leq 0.001$ , indicating that none of the distributions formed by the permuted data is better than the statistic observed on the basis of the original data (Figure . 1, G).

**Figure 1. PLS-DA analysis of the metabomic models to predict significant and advanced fibrosis in 126 patients with chronic hepatitis C in Rio de Janeiro / RJ, from 2010 to 2014.**



Legends: PLS-DA models for SF (A, C, E, G) and AF (B, D, F, H). 3D graph of scores (A, B); 2D graph of scores (C, D). Cross-validation using different numbers of components to classify the metabomic model accurately = 1.0/ 1.0;  $R^2 = 0.98/ 0.97$ ;  $Q^2 = 0.98/ 0.96$ , using 5 components (D, F) Permutation test statistics for 1000 permutations with statistics observed of the accuracy of the prediction model with  $p < 0.001$  (G, H).

The MM results for predicting SF, constructed using LDA formalism and validated by LOOCV and externally, are presented in Table 3 and were compared with those observed using the APRI score, with cut-off points of  $\leq 0.5$  and  $> 1.5$ . The MM was able to identify all SF patients in both the model and validation groups, with SN of 100% (95% CI: 95.3-100%) in the model group, superior to APRI  $\leq 0.5$ , which presented SN of 85.7% (95% CI: 77.2-92%), and SP of 100% (95% CI: 86.8-100%) in the validation group, similar to those of the APRI.

**Table 3. Performance of the metabonomic models, APRI and FIB-4 to predict significant and advanced fibrosis in patients with chronic hepatitis C in Rio de Janeiro/RJ from 2010 to 2014.**

Significant fibrosis												
Model (n=126)	Biopsy		$p^a$	Sensitivity		Specificity		LR+		LR-		A (%)
	F2-F4	F0-F1		(%)	IC <sub>95%</sub>	(%)	IC <sub>95%</sub>	IC <sub>95%</sub>	IC <sub>95%</sub>			
$\geq$ F2	77	0	<0.001	<b>100</b>	95.3-100	<b>100</b>	92.8-100	154.4*	9.8-2447.6	0.01*	0.001-0.2	<b>100</b>
< F2	0	49										
Validation (n=54)												
$\geq$ F2	26	0	<0.001	<b>100</b>	86.8-100	<b>100</b>	87.7-100	56.9*	3.7-888.9	0.02*	0.001-0.3	<b>100</b>
< F2	0	28										
APRI (n=175)												
> 0,5	85	41	<0.001 <sup>b</sup>	<b>85.9</b>	77.4-92.0	46.0	34.6-57.9	1.59	1.3-2.0	0.31	0.2-0.5	<b>68.6</b>
$\leq$ 0,5	14	35										
> 1,5	28	3	<0.001	28.3	19.7-38.2	<b>96.0</b>	88.9-99.2	7,6	2.3-22.7	0.75	0.7-0.9	57.7
$\leq$ 1,5	71	73										
Advanced Fibrosis												
Model (n=126)	Biopsy		$p^a$	Sensitivity		Specificity		LR+		LR-		A (%)
	F3-F4	F0-F2		(%)	IC <sub>95%</sub>	(%)	IC <sub>95%</sub>	IC <sub>95%</sub>	IC <sub>95%</sub>			
$\geq$ F3	40	1	<0.001	<b>100</b>	91.2-100	<b>98.8</b>	93.7-99.9	57.3*	11.7-280.1	0.01*	0.001-0.2	<b>99.2</b>
< F3	0	85										
Validation (n=54)												
$\geq$ F3	11	0	<0.001	<b>100</b>	71.5-100	<b>100</b>	91.8-100	84.3*	5.4-1330.5	0.04*	0.003-0.6	<b>99.2</b>
< F3	0	43										
FIB-4 (n=172)												
> 1,45	43	55	<0.001 <sup>b</sup>	<b>86.0</b>	73.3-94.2	54.9	45.7-63.9	1.91	1.5-2.4	0,26	0.1-0.5	64.0
$\leq$ 1,45	7	67										
> 3,25	19	3	<0.001	38.0	24.7-52.8	<b>97.5</b>	93.0-99.5	15.5	4.8-49.9	0.64	0.5-0.8	<b>80.2</b>
$\leq$ 3,25	31	119										

<sup>a</sup> Fisher's exact test; <sup>b</sup> Chi-square test; \*Estimated value; LR+: Positive Likelihood Ratio; LR-: Negative Likelihood Ratio; A: Accuracy.

The LR indicates the ratio between the likelihood of positive results (LR+) or negative results (LR-) in patients with fibrosis, and the likelihood of the same result in patients without fibrosis, and was used because it did not depend on the prevalence of the stage of fibrosis in the population under study, thus providing a more reliable prediction value for this analysis. A test

is considered to have good positive predictive power when  $LR+ > 10$  and good negative predictive power when  $LR- < 0.1$ .

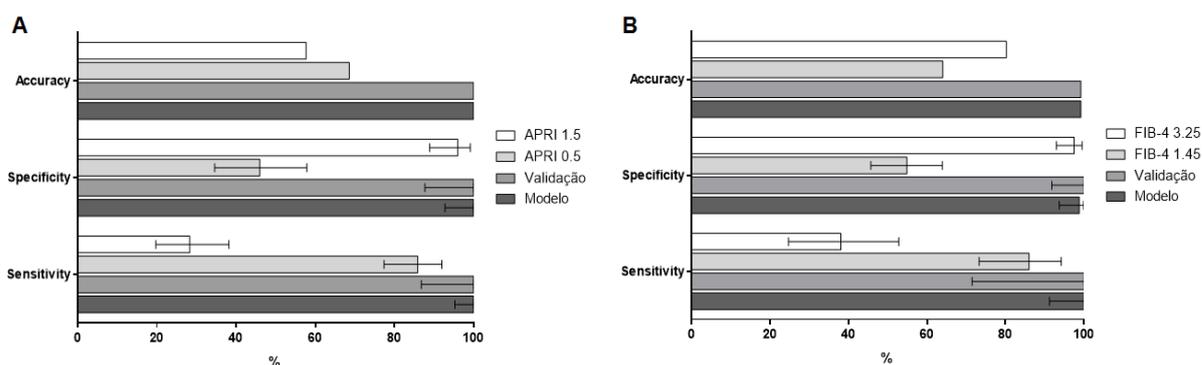
The  $LR-$  to exclude SF from the MM was 0.02 (95% CI: 0.01-0.3) for the validation group, indicating that, since the test is negative by MM, the likelihood of absence of SF is 50 times the likelihood of SF presence. The  $LR-$  of the  $APRI \leq 0.5$  was 0.31 (95% CI: 0.2-0.5), indicating that, since the test is negative by the APRI, the likelihood of absence of SF is 3.2 times the likelihood of SF presence. This result suggests superiority of MM in relation to APRI for SF exclusion, but for CI, this result was considered similar to that of APRI. A validation with more patients could confirm this superiority. For prediction of SF presence, in the validation group, the MM presented SP of 100% (95% CI: 87.7-100%) and  $LR+$  56.9 (95% CI: 3.7-888.9), a similar performance to that of the  $APRI > 1.5$ , which showed SP of 96% (95% CI: 88.8-99.2%) and  $LR+$  7.14 (95% CI: 2.3-22.6). The APRI AUROC for predicting SF was 0.76 (95% CI: 0.68-0.83).

As for AF, Figure 1 B, D, F, H shows that the PLS-DA model using three latent components discriminates the samples well (Figure1, B). The merit figures, with five latent components, resulted in 100% accuracy,  $R^2$  of 0.97 and  $Q^2$  of 0.96, demonstrating a high predictive value (Figure 1, F). We also performed tests with up to 1000 permutations, which indicated, with  $p < 0.001$ , that no permuted model presented better results than the original model (Figure 1, H).

The LDA model for predicting AF also correctly diagnosed all patients with and without AF in the validation group, and missed only one case in the model group (Table 3). For prediction of absence of AF, the MM, in the validation group, showed 100% SN (95% CI: 71.5-100%) and  $LR-$  0.04 (95% CI: 0.003-0.6), a similar performance to that of  $FIB-4 \leq 1.45$ , which presented SN of 85.7% (95% CI: 72.8-94.1%) and  $LR-$  0.26 (95% CI: 0.1-0.5). Likewise, to predict the presence of AF, in the validation group, the MM presented SP of 100% (95% CI: 91.8-100%) and  $LR+$  84.3 (95% CI: 5.4-1330). These results were considered similar to those obtained with  $FIB-4 > 3.25$ , which presented SP of 97.5% (95% CI: 92.9-99.5%) and  $LR+$  15.6 (95% CI: 4.9-50.5). The  $FIB-4$  AUROC for predicting AF was 0.80 (95% CI: 0.73-0.88).

In order to compare the performance of these three non-invasive methods for predicting SF and AF, their SN, SP and accuracy values are shown in Figure 2. Overall, the MM presented high accuracy, with similar performance to that of the APRI, for the prediction of SF, and for  $FIB-4$ , for the prediction of AF.

**Figure 2. Comparison of the performance of the metabonomic models, APRI and FIB-4 in the model and validation populations, in patients with chronic hepatitis C in Rio de Janeiro / RJ, from 2010 to 2014.**



Legend: (A) Comparison of performance of MM and APRI for predicting SF. (B) Comparison of performance of MM and FIB-4 for predicting advanced fibrosis

Of the 175 patients with APRI determination, 95 (54.3%) presented values in the gray zone ( $> 0.5$  and  $\leq 1.5$ ), when it is not possible to exclude or confirm SF. Of these, 57 presented SF by histopathological classification and 38 did not. The MM correctly classified all cases. Likewise, of the 172 patients with FIB-4 determination, 76 (44.2%) presented values in the gray zone ( $> 1.45$  and  $\leq 3.25$ ). Of these, 25 had AF and 51 did not. The MM also correctly classified all cases. Thus, the MM presented accuracy of 100% for predicting SF, when the APRI index values were in the gray zone, and his also occurred for predicting AF, in relation to the intermediate values of the FIB-4 score. Considering that 54.3% of the patients were not classified by the APRI and that, of the patients with values below and above the lower and upper cut-off points, 9.8% were incorrectly classified, using only APRI as a predictor of SF, liver biopsy would have been correctly avoided in only 35.7% of the patients. Regarding FIB-4, 44.2% of the patients were not classified and 5.8% were incorrectly classified. Thus, using only FIB-4 as an AF predictor, liver biopsy would have been correctly avoided in 50% of patients. In contrast, the MM did not present any classification errors in the population in the validation group. Therefore, using only MM as predictors of FS and FA, biopsy would have been avoided in 100% of the patients in this group.

**Discussion:**

One hundred and three patients (57.2%) showed a F2-F4 stage of fibrosis, similar to that described by de Oliveira et al., who, in a study with 525 Brazilian CHC patients, showed that 68% had significant fibrosis (33). In our study, it was observed that the higher the level of liver fibrosis, the greater the mean age, and, evidently, a greater impairment of liver function, represented by INR enlargement, higher serum level of bilirubin, fewer platelets count and lower serum level of albumin, which indicates the progression of fibrosis. Findings that reflect the natural history of the disease, which is mainly fibrosing and, on average, progresses to cirrhosis in about 30 years in untreated patients (34).

The quality and reliability of histopathological analysis depend on the width and extent of the fragment. Since a fragment of biopsy by needle accounts for 1/50,000 of the total organ, the potential for sampling error is substantial. The liver fragment obtained in this study had an extension and number of portal spaces within the mean found in the literature (35). Although a study using computer-generated modeling suggests that a 15-mm fragment is associated with classification error in 35% of cases, while a 25-mm fragment, which is considered ideal, is associated with a classification error in 25% of cases (36), Poynard et al., demonstrated that, in practice, a liver fragment with above 20 mm in length is only obtained in 14% of CHC patients (37). In a systematic review of 10,027 percutaneous liver biopsies, Cholongitas et al., showed that the mean liver fragment is  $17.7 \text{ mm} \pm 5.8 \text{ mm}$  in extension and  $7.5 \pm 3.4$  complete portal spaces (35). In addition, a study with 352 CHC patients showed that a fragment with a minimum extension of 15 mm and containing more than 5 portal spaces is adequate for the diagnosis of significant fibrosis (38)

In our casuistry, the APRI showed moderate accuracy for the diagnosis of significant fibrosis [AUROC of 0.76 (95% CI: 0.68-0.83)]. This accuracy is somewhat lower than that described by Wai et al., of 0.88 in the validation population of the study (17), but the same described in a meta-analysis with 22 studies and 4266 patients, which revealed AUROC 0.76 for the diagnosis of significant fibrosis (39). In studies involving Brazilian patients, the performance of the method was greater for predicting cirrhosis, with AUROC ranging from 0.84 to 0.82, than for significant fibrosis, with AUROC ranging from 0.76 to 0.92 (40–43).

The FIB-4 presented good performance for the diagnosis of advanced fibrosis in the patients studied, with AUROC 0.80 (95% CI: 0.73-0.88). The score was initially described for HCV/HIV co-infected patients, with AUROC 0.76 for the diagnosis of advanced fibrosis, using lower and upper cutoff points of 1.45 and 3.25 (18). A subsequent validation study in HCV

mono-infected patients showed AUROC of 0.91 for cirrhosis and 72.8% of patients with correctly classified values  $\leq 1,45$  and  $> 3,25$  (31). The accuracy of FIB-4 has been described as superior to APRI for the diagnosis of advanced fibrosis (44). This finding is confirmed by Silva Junior et al., who having studied 51 Brazilian patients, demonstrated that FIB-4 was superior to APRI in the diagnosis of cirrhosis (AUROC 0.86 x 0.82) (43).

The metabomic models presented here are noninvasive methods developed for diagnosing and classifying liver fibrosis. In this study, the MM for SF prediction did not present any classification errors. To predict the presence of AF, the MM presented only one classification error, suggesting that it is a robust method for classifying fibrosis, with potential to be included in clinical practice. Overall, the MM generated for predicting SF and AF in CHC patients presented values of sensitivity, specificity and accuracy greater than 90% and performance similar to that of the APRI and FIB-4. In addition, the method was able to correctly discriminate the fibrosis stage in all patients who presented APRI and FIB-4 values in the gray zone, when these scores cannot determine the presence or absence of fibrosis.

Amathieu, in a recent review, emphasizes metabomics and metabolomics as useful tools in various liver diseases, such as the in diagnosis of autoimmune hepatitis, hepatotoxicity, in differentiation of hepatocarcinoma from non-malignant liver disease, and in liver failure after liver transplantation (45).

This method has also shown promise in the investigation of viral hepatitis. In our area, Godoy et al., in a pilot study using  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy of HCV infected patients and subsequent statistical analysis by PCA and LDA, showed 94% sensitivity and 97% specificity of MM for the diagnosis of infection, with a positive predictive value of 97% and a negative predictive value of 94% (27). Through NMR imaging of the liver with  $^{31}\text{P}$  spectroscopy, Zhang et al., demonstrated that the phosphoester/ phosphatidyl ester ratio decreased in 60 CHC patients treated with pegylated interferon and ribavirin, after 6 months and 1 year of the end of treatment of patients with a virological response, whereas this ratio remained stable in the group of non-responding patients (46).

The method has been further investigated in assessing the severity of liver disease and cirrhosis and its complications. Amathieu et al., correlated the severity of impaired liver function in patients with chronic alcoholic liver disease as measured by MELD, with deficient in lipid, glucose and amino acid metabolism (47). Jimènes et al., using a  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of serum from cirrhotic patients, were able to discriminate those with minimal encephalopathy from those without encephalopathy (48).

Regarding the evaluation of liver fibrosis, metabonomic and metabolomic strategies have also been promising. Sands et al., on analyzing the  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of serum of healthy controls and of CHC patients, constructed an MM by OPLS-DA, using the METAVIR fibrosis classification and the ELF score as the reference standard, and demonstrated that it was possible to discriminate patients without fibrosis (F0) from those with moderate fibrosis (F1-F2) and those with advanced fibrosis (F3-F4) and that the discriminating substances related to fibrosis were linked to the metabolism of amino acids and lipids. Patients with advanced liver fibrosis showed increased serum levels of tyrosine, phenylalanine, methionine, citrate and VLDL and decreased levels of creatine, LDL, phosphatidylcholine and N-acetyl-alpha 1 acid glycoprotein (49). The authors also demonstrated that the MM created using the ELF index as the reference standard better discriminated the less advanced stages of fibrosis when compared to the MM that used biopsy as the reference standard (49).

Embade et al., differentiated 27 CHC patients and cirrhosis (F4) from 30 patients with non-fibrosis (F0) CHC, using a PLS-DA model, through serum spectral analysis by  $^1\text{H-NMR}$ . The authors demonstrated that choline, acetate and LDL present reduced concentration in cirrhotic patients and are important biomarker predictors of fibrosis. They then constructed a score derived from a linear combination of these three metabolites, which reached AUROC of 0.92 for the diagnosis of cirrhosis (50). Sarfaraz et al., using  $^1\text{H-NMR}$  spectroscopy of serum from 45 CHC patients and histopathological classification of fibrosis, constructed a PLS-DA model that discriminated F0-F2 patients from F3-F4 patients with good predictive power ( $R^2 = 0.673$ ) (51).

It is worth noting that, in parallel with this study, we are publishing another one with the same methodology and similar results, involving patients from another region of Brazil. Our initial intent was to create an MM for predicting SF and AF in CHC patients in one region and to validate the MM in patients from another region. However, this was not possible since, in the initial analysis of the two populations by PCA, it was found that the patients were metabolically different. Therefore, it was necessary to create specific models for patients from each region, due to the possible genetic and alimentary differences of each population. However, our study corroborates the findings of these authors and suggests that the metabonomic strategy is capable of discriminating the stage of liver fibrosis in patients with chronic HCV infection, and may, in the future, contribute as a noninvasive method of staging of fibrosis in these patients.

**Limitations of the study**

As a limitation of the study, the small number of patients tested in the external validation is pointed out, which limits the applicability of the results in the medical practice, as is the fact that the study was carried out in a tertiary center of health care, which may have caused a selection bias of patients with a higher degree of involvement of chronic liver disease. Finally, it is worth mentioning that the  $^1\text{H}$  NMR of biofluid is not yet a commercially used technique, as it is restricted to academic and research centers, however, the development of the metabomic strategy may, in the future, change this scenario and allow this tool to be used routinely in clinical practice. This will also require larger, multicenter studies that include patients from various regions of Brazil and from different regions of the world, so that models can be developed to predict SF and AF of all CHC patients.

**Conclusion:**

In this preliminary study, the MMs were able to discriminate SF and AF in CHC patients, with high accuracy and a performance similar to that of APRI and FIB-4. Additionally, the metabomic strategy allowed staging of fibrosis in the gray zone of these scores, thus showing promise as a non-invasive marker of liver fibrosis in these patients. However, further studies will be necessary, with a larger number of patients in the external validation of the models, in order to confirm their performance, for later incorporation into clinical practice.

**Acknowledgments:**

We are grateful to CNPq and FACEPE, agencies that promote research in our country and state.

## References:

1. World Health Organization. Global Burden of Disease (GBD) for Hepatitis C. *J Clin Pharmacol*. 2004;44(1):20–9.
2. Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010 : a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 2012;380:2095–128.
3. Brasil. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico-Hepatites Virais. Brasília, *Ministério da Saúde*, 2015.
4. Ferreira PRA, Brandão-Mello CE, Estes C, Júnior FLG, Coelho HSM, Razavi H, et al. Disease burden of chronic hepatitis C in Brazil. *Brazilian J Infect Dis*. 2015;19(4):363–368.
5. Poynard T, Bedossa P, Opolon P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. *Lancet*. 1997;349:825–32.
6. Seeff LB. Natural History of Chronic Hepatitis C. *Hepatology*. 2002;36(5):535–46.
7. EASL. EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2016. *J Hepatol*. 2016;66(1):153–94.
8. Schinazi RF, Asselah T. From HCV To HBV Cure. *Liver Int*. 2017; 37:73–80.
9. Shiffman ML, Benhamou Y. Cure of HCV related liver disease. *Liver Int*. 2015;35(s1):71–7.
10. Brasil. Ministério da Saúde. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite C e Co-infecções. Brasília: *Ministério da Saúde*, 2015.
11. Kalambokis G, Manousou P, Vibhakorn S, Marelli L, Cholongitas E, Senzolo M, et al. Transjugular liver biopsy - Indications, adequacy, quality of specimens, and complications - A systematic review. *J Hepatol*. 2007;47(2):284–94.
12. Rockey DC, Caldwell SH, Goodman ZD, Nelson RC, Smith AD. Liver biopsy. *Hepatology*. 2009;49(3):1017–44.
13. Gunneson TJ, Menon N, Wiesner RH, et al. Ultrasound-Assisted Percutaneous Liver Biopsy Performed by a Physician Assistant. *Am J Gastroenterol*. 2002;97(6):1472–5.
14. Cadranel J-F, Rufat P, Degos F. Practices of Liver Biopsy in France : Results of a Prospective Nationwide Survey. *Hepatology*. 2000;32(3):477–81.
15. Myers RP, Fong A, Shaheen AAM. Utilization rates , complications and costs of percutaneous liver biopsy : a population-based study including 4275 biopsies. *Liver Int*. 2008;28(5):705–12.

16. Regev A, Berho M, Jeffers LJ, Milikowski C, Molina EG, Pyrsopoulos NT, et al. Sampling Error and Intraobserver Variation in Liver Biopsy in Patients With Chronic HCV Infection. *Am J Gastroenterol*. 2002;97(10):2614–8.
17. Wai CT, Greenson JK, Fontana RJ, Kalbfleisch JD, Marrero J a., Conjeevaram HS, et al. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2003;38(2):518–26.
18. Sterling RK, Lissen E, Clumeck N, Sola R, Correa MC, Montaner J, et al. Development of a simple noninvasive index to predict significant fibrosis in patients with HIV/HCV coinfection. *Hepatology*. 2006;43(6):1317–25.
19. EASL, ALEH. EASL-ALEH Clinical Practice Guidelines: Non-invasive tests for evaluation of liver disease severity and prognosis. *J Hepatol*. 2015;63:237–64.
20. Parkes J, Guha IN, Roderick P, Rosenberg W. Performance of serum marker panels for liver fibrosis in chronic hepatitis C. *J Hepatol*. 2006;44(3):462–74.
21. Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. “Metabonomics”: understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica*. 1999;29(11):1181–9.
22. Dunn WB, Ellis DI. Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. *Trends Anal Chem* 2005;24(4):285–94.
23. Nicholson JK, Lindon JC. Metabonomics. *Nature*. 2008;455(23):1054–6.
24. Zhang S, Nagana Gowda G a, Ye T, Raftery D. Advances in NMR-based biofluid analysis and metabolite profiling. *Analyst*. 2010;135(7):1490–8.
25. Bharti SK, Roy R. Quantitative <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. *Trends Anal Chem*. 2012;35:5–26.
26. Emwas AHM, Salek RM, Griffin JL, Merzaban J. NMR-based metabolomics in human disease diagnosis: Applications, limitations, and recommendations. *Metabolomics*. 2013;9(5):1048–72.
27. Godoy MMG, Lopes EP a, Silva RO, Hallwass F, Koury LC a, Moura IM, et al. Hepatitis C virus infection diagnosis using metabonomics. *J Viral Hepat*. 2010;17(12):854–8.
28. Sackett DL. Evidence base of clinical diagnosis: The architecture of diagnostic research. *BMJ*. 2002;324:539–41.
29. Chindamo MC, Nunes-pannain VL, Araújo-neto JM, Moraes-coelho HS, Luiz RR, Villela-nogueira CA, et al. Intermediate fibrosis staging in hepatitis C : a problem not overcome by optimal samples or pathologists ’ expertise. *Ann Hepatol*. 2015;14(5):652–7.

30. Bedossa P, Poynard T, METAVIR Cooperative Study Group. An Algorithm for the Grading of Activity in Chronic Hepatitis C. *Hepatology*. 1996;24(2):289–93.
31. Vallet-Pichard A, Mallet V, Nalpas B, Verkarre V, Nalpas A, Dhalluin-Venier V, et al. FIB-4: An inexpensive and accurate marker of fibrosis in HCV infection. Comparison with liver biopsy and FibroTest. *Hepatology*. 2007;46(1):32–6.
32. Xia J, Sinelnikov I V., Han B, Wishart DS. MetaboAnalyst 3.0--making metabolomics more meaningful. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(W1):W251-7.
33. de Oliveira AC, Bortotti AC, Nunes NN, El Bacha I a H, Parise ER. Association between age at diagnosis and degree of liver injury in hepatitis C. *Braz J Infect Dis*. 2014;18(5):507–11.
34. Poynard T, Ratziu V, Benmanov Y, Di Martino V, Bedossa P, Opolon P. Fibrosis in patients with chronic hepatitis C: detection and significance. *Semin Liver Dis*. 2000;20(1):47–55.
35. Cholongitas E, Senzolo M, Standish R, Marelli L, Quaglia A, Patch D, et al. A Systematic Review of the Quality of Liver Biopsy. *Am J Clin* 2006; (125):710–21.
36. Bedossa P, Dargère D, Paradis V. Sampling Variability of Liver Fibrosis in Chronic Hepatitis C. *Hepatology*. 2003;38(6):1449–56.
37. Poynard T, Munteanu M, Imbert-Bismut F, Charlotte F, Thabut D, Le Calvez S, et al. Prospective analysis of discordant results between biochemical markers and biopsy in patients with chronic hepatitis C. *Clin Chem*. 2004;50(8):1344–55.
38. Poynard T, Mchutchison J, Manns M, Myers RP, Albrecht J. Biochemical Surrogate Markers of Liver Fibrosis and Activity in a Randomized Trial of Peginterferon Alfa-2b and Ribavirin. *Hepatology*. 2003;38:481–92.
39. Shaheen AAM, Myers RP. Diagnostic accuracy of the aspartate aminotransferase-to-platelet ratio index for the prediction of hepatitis C-related fibrosis: A systematic review. *Hepatology*. 2007;46(3):912–21.
40. Amorim TGF, Staub GJ, Lazzarotto C, Silva AP, Manes J, Ferronato M da G, et al. Validation and comparison of simple noninvasive models for the prediction of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *Ann Hepatol*. 2012;11(6):855–61.
41. Parise ER, Oliveira AC, Figueiredo-Mendes C, Lanzoni V, Martins J, Nader H, et al. Noninvasive serum markers in the diagnosis of structural liver damage in chronic hepatitis C virus infection. *Liver Int*. 2006;26:1095–9.
42. Silva Jr RG Da, Fakhouri R, Nascimento TVB, Santos IM, Barbosa LMM. Aspartate aminotransferase-to-platelet ratio index for fibrosis and cirrhosis prediction in chronic hepatitis C patients. *Braz J Infect Dis*. 2008;12(1):15–9.

43. Silva Junior RG, Schmillevitch J, Nascimento Mde F, Miranda ML, Brant PE, Schulz PO, et al. Acoustic radiation force impulse elastography and serum fibrosis markers in chronic hepatitis C. *Scand J Gastroenterol*. 2014;49(8):986–92.
44. Houot M, Ngo Y, Munteanu M, Marque S, Poynard T. Systematic review with meta-analysis: direct comparisons of biomarkers for the diagnosis of fibrosis in chronic hepatitis C and B. *Aliment Pharmacol Ther*. 2016;43(1):16–29.
45. Amathieu R. Nuclear magnetic resonance based metabolomics and liver diseases: Recent advances and future clinical applications. *World J Gastroenterol*. 2016;22(1):417–26.
46. Zhang C-Y, Zhang Q, Zhang H-M, Yang H-S. 3.0T 31P MR spectroscopy in assessment of response to antiviral therapy for chronic hepatitis C. *World J Gastroenterol*. 2014;20(8):2107–12.
47. Amathieu R, Triba MN, Nahon P, Bouchemal N, Kamoun W, Haouache H, et al. Serum 1H-NMR metabolomic fingerprints of acute-on-chronic liver failure in intensive care unit patients with alcoholic cirrhosis. *PLoS One*. 2014;9(2):e89230.
48. Jiménez B, Montoliu C, Macintyre D a, Serra M a, Wassel A, Romero-gomez M, et al. Serum Metabolic Signature of Minimal Hepatic Encephalopathy by H-Nuclear Magnetic Resonance research articles. *J Proteome Res*. 2010;9(10):5180–7.
49. Sands CJ, Guha IN, Kyriakides M, Wright M, Beckonert O, Holmes E, et al. Metabolic Phenotyping for Enhanced Mechanistic Stratification of Chronic Hepatitis C-Induced Liver Fibrosis. *Am J Gastroenterol* 2014;110(1):159–69.
50. Embade N, Mariño Z, Diercks T, Cano A, Lens S, Cabrera D, et al. Metabolic characterization of advanced liver fibrosis in HCV patients as studied by serum 1H-NMR spectroscopy. *PLoS One*. 2016;11(5):1–19.
51. Sarfaraz MO, Myers RP, Coffin CS, Gao Z-H, Shaheen AAM, Crotty PM, et al. A quantitative metabolomics profiling approach for the noninvasive assessment of liver histology in patients with chronic hepatitis C. *Clin Transl Med*. 2016;5(1):33.

## ANEXOS

### ANEXO A- Aprovação do projeto pelo CEP

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



#### PROJETO DE PESQUISA

---

**Título:** AVALIAÇÃO DO GRAU DE FIBROSE HEPÁTICA EM PACIENTES COM DOENÇA HEPÁTICA CRÔNICA PELOS VÍRUS DAS HEPATITES B E C UTILIZANDO

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 06572612.3.0000.5208

**Pesquisador:** Andrea Dória

**Instituição:** CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

---

**Número do Parecer:** 93.127

**Data da Relatoria:** 05/09/2012

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

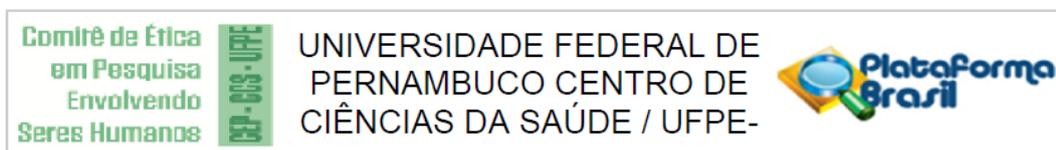
**Considerações Finais a critério do CEP:**

O Colegiado aprova o parecer do protocolo em questão para início da coleta de dados. Projeto foi avaliado e sua APROVAÇÃO definitiva será dada, por meio de ofício impresso, após a entrega do relatório final ao Comitê de Ética em Pesquisa/UFPE.

RECIFE, 10 de Setembro de 2012

---

Assinado por:  
GERALDO BOSCO LINDOSO COUTO

**ANEXO B- Aprovação da emenda ao projeto pelo CEP****PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DA EMENDA**

**Título da Pesquisa:** AVALIAÇÃO DO GRAU DE FIBROSE HEPÁTICA EM PACIENTES COM DOENÇA HEPÁTICA CRÔNICA PELO VÍRU DA HEPATITE C UTILIZANDO METABONÔMICA

**Pesquisador:** Andrea Dória

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 06572612.3.0000.5208

**Instituição Proponente:** CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 1.884.635

**Considerações Finais a critério do CEP:**

A emenda foi avaliada e APROVADA pelo colegiado do CEP.

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

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_778053 E1.pdf	22/12/2016 10:12:48		Aceito
Outros	Folhaderosto2012.jpg	22/12/2016 10:08:41	Andrea Dória	Aceito
Outros	JustificativaDeEmenda.pdf	22/12/2016 10:06:03	Andrea Dória	Aceito
Declaração de Pesquisadores	AutorizacaoDeUsoDeDados.pdf	22/12/2016 09:56:01	Andrea Dória	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoPlataformaBrasil122016.doc	22/12/2016 09:53:38	Andrea Dória	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto122016.pdf	22/12/2016 09:50:35	Andrea Dória	Aceito
Parecer Anterior	001.jpg	23/08/2012 21:50:16		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	23/08/2012 09:20:25		Aceito
Outros	Carta de anuência 2.jpg	15/08/2012 23:54:56		Aceito
Outros	Carta de anuência 1.jpg	15/08/2012 23:54:26		Aceito
Outros	Lattes Ricardo.docx	15/08/2012 23:50:52		Aceito
Outros	Lattes Edmundo.docx	15/08/2012 23:50:14		Aceito
Outros	Lattes Andrea.docx	15/08/2012 23:49:44		Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

RECIFE, 03 de Janeiro de 2017

---

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

## ANEXO C- Autorização de uso de dados de pesquisa

Prof. Dra Maria Chiara Chindamo  
Departamento de Clínica Médica/Faculdade de Medicina  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

### AUTORIZAÇÃO DE USO DE ARQUIVOS/DADOS DE PESQUISA

Declaramos para os devidos fins, que cederemos à pesquisadora Andrea Dória Batista acesso aos arquivos de base de dados e soros armazenados de pacientes da pesquisa PAPEL DA BIÓPSIA HEPÁTICA NA IDENTIFICAÇÃO DA FIBROSE INTERMEDIARIA NA HEPATITE C CRÔNICA para serem utilizados na pesquisa: **AVALIAÇÃO DO GRAU DE FIBROSE HEPÁTICA EM PACIENTES COM DOENÇA HEPÁTICA CRÔNICA PELO VÍRUS DA HEPATITE C UTILIZANDO METABONÔMICA**, que está sob a orientação do Prof. Dr. Edumundo Pessoa de Almeida Lopes Neto.

Esta autorização está condicionada ao cumprimento da pesquisadora aos requisitos da Resolução 466/12 e suas complementares, comprometendo-se a mesma a utilizar os dados pessoais dos sujeitos da pesquisa, exclusivamente para os fins científicos, mantendo o sigilo e garantindo a não utilização das informações em prejuízo das pessoas e/ou das comunidades.

Antes de iniciar a coleta de dados a pesquisadora deverá apresentar o Parecer Consubstanciado devidamente aprovado, emitido por Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos, credenciado ao Sistema CEP/CONEP.

*Maria Chiara Chindamo*

Nome/assinatura e carimbo do responsável pela Instituição ou pessoa por ele delegada

DRA. MARIA CHIARA CHINDAMO  
Clínica Médica - Hepatologia  
CRM 5253414-8

DRA. MARIA CHIARA CHINDAMO  
Clínica Médica - Hepatologia  
CRM 5253414-8