



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

Moara Maria Silva Cardozo

Diferenciação entre esteatose e esteatohepatite não-alcoólica através da
metabonômica

Recife

2017

Moara Maria Silva Cardozo

Diferenciação entre esteatose e esteatohepatite não-alcoólica através da
metabonômica

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, nível Mestrado, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

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

Co-orientador: Prof. Dr. Ricardo Oliveira Silva

Recife

2017

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

C268d Cardozo, Moara Maria Silva.
Diferenciação entre esteatose e esteato hepatite não alcoólica através da metabonômica / Moara Maria Silva Cardozo. – 2017.
75f. il.; 30 cm.

Orientador: Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde. Recife, 2017.
Inclui referências e apêndices.

1. Hepatite gordurosa não-alcoólica. 2. Metabonômica. 3. Espectroscopia de ressonância magnética. 4. Fígado gorduroso. I. Lopes Neto, Edmundo Pessoa de Almeida (orientador). II. Título.

610 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS 2018 - 216)

MOARA MARIA SILVA CARDOZO

**Diferenciação entre esteatose e esteatohepatite não-alcoólica através da
metabonômica**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de MESTRE em CIÊNCIAS DA SAÚDE.

Aprovado em 16/08/2017

BANCA EXAMINADORA

Profa. Ana Lucia Coutinho Domingues (Presidente)
Universidade Federal de Pernambuco

Profa Michele Maria Gonçalves de Godoy – (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Lucia Helena de Oliveira Cordeiro – (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

RESUMO

A Doença Hepática Gordurosa Não-Alcoólica (DHGNA) é a causa mais comum de Doença Hepática Crônica nos países ocidentais e há interesse crescente em métodos não invasivos para seu diagnóstico. A metabonômica pode ser definida como a medida quantitativa da resposta metabólica dinâmica dos sistemas vivos à estímulos fisiopatológicos ou modificações genéticas e pode ser uma boa opção para classificação da DHGNA de acordo com sua apresentação/gravidade. Nosso objetivo foi diferenciar os pacientes com esteatose (EH) dos que tem esteatohepatite não-alcoólica (EHNA) usando a espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear H^1 (RMN 1H) para análise metabonômica de amostras de soro de pacientes submetidos à cirurgia bariátrica. Pacientes no intra-operatório de Cirurgia Bariátrica foram submetidos à biópsia hepática e coleta de amostra de sangue para análise metabonômica. A DHGNA foi classificada em Esteatose Hepática (EH) e Esteatohepatite não-alcoólica (EHNA). Os espectros de RMN 1H dos dois grupos (esteatose e esteatohepatite) foram comparados e através de análise estatística multivariada no software Matlab 2015b realizou-se a classificação das amostras. Foram incluídos 39 pacientes, sendo 31 (80%) com esteatose e 8 (20%) com esteatohepatite. Para o diagnóstico de esteatohepatite, a análise metabonômica apresentou acurácia, sensibilidade e especificidade iguais a 81,1%, 71,4% e 83,3%, respectivamente. A análise metabonômica utilizando a espectroscopia de RMN 1H foi capaz de diferenciar pacientes com esteatose dos que tem esteatohepatite não-alcoólica com boa acurácia.

Palavras-chave: Hepatopatia Gordurosa Não-alcoólica. Metabonômica. Espectroscopia de Ressonância Magnética. Fígado gorduroso.

ABSTRACT

Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) is the most common cause of Chronic Liver Disease in Western countries and there is a growing interest in noninvasive methods for its diagnosis. Metabonomics can be defined as the quantitative measure of the dynamic metabolic response of living systems to pathophysiological stimuli or genetic modification and may be a good choice for differentiation among the presentation/severity spectra of NAFLD. Our objective was to differentiate patients with steatosis from non-alcoholic steatohepatitis using the metabonomic analysis of the H^1 Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectra of blood samples from patients submitted to bariatric surgery. Patients candidates to Bariatric Surgery were submitted to intraoperative liver biopsy, in addition to blood sample collection for analysis. The NAFLD was classified in steatosis and NASH characterized by the presence of mixed centrilobular infiltrate, balloon degeneration and perisinusoidal fibrosis. The H^1 NMR spectra of the two groups (steatosis and steatohepatitis) were compared and through multivariate statistical analysis in Matlab 2015b software was performed the classification of the samples. We included 39 patients, 80% (31) with steatosis and 20% (8) with steatohepatitis. For the diagnosis of steatohepatitis, the metabonomic analysis presented accuracy, sensitivity and specificity equal to 81.1%, 71.4% and 83.3%, respectively. Metabonomics was also able to differentiate patients with stage 0 fibrosis from those with stage 1 fibrosis, a finding that is of prognostic importance. Metabonomic analysis of H^1 NMR spectra was able to differentiate patients with steatosis from those with non-alcoholic steatohepatitis with good accuracy.

Keywords: Nonalcoholic Fatty Liver Disease. Metabonomics. Magnetic Resonance Spectroscopy. Fatty liver.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Abordagens usando marcadores minimamente invasivos para diagnosticar esteatohepatite nos pacientes com DHGNA.....	13
Figura 2. Gráfico gerado pela base de dados SCOPUS em 12/06/2015 mostrando a produção com os descritores biomarkers (biomarcadores) e NAFLD (doença hepática gordurosa não alcoólica) por ano, entre 1995 e 2015.....	14
Figura 3. Identificação de metabólitos em espectro de RMN de urina de humanos	18
Figura 4(a). Número de publicações com o descritor “ <i>metabonomics</i> ” na base de dados SCOPUS de acordo com o ano de publicação, entre 1999 e 2016	23
Figura 4(b). Número de publicações em número com o descritor “ <i>metabonomics</i> ” na base de dados SCOPUS de acordo com o autor, entre 1999 e 2016	24
Figura 4(c). Número de publicações com o descritor “ <i>metabonomics</i> ” na base de dados SCOPUS de acordo com a área, entre 1999 e 2016	24
Figura 5. Modelo explicativo da história natural da DHGNA.....	28
Figura 6. Desenho do estudo: seleção dos pacientes e análises.....	30
Figura 7. Modelo experimental do estudo.....	31
Figura 8. Gráfico de pesos para separação das amostras em esteatose e esteatohepatite (39 pacientes) usando o Software Matlab 2015b	40
Figura 9. Gráfico de pesos para separação das amostras em esteatose e esteatohepatite usando o Software Matlab 2015b.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Conhecimento sobre os principais biomarcadores para diferenciação entre esteatose e esteatohepatite não-alcoólica.....	14
Tabela 2. Características clínicas dos 39 pacientes com obesidade e DHGNA.....	38
Tabela 3. Dados laboratoriais dos 39 pacientes com obesidade e DHGNA.....	39
Tabela 4. Tabela de contingência para modelo metabonômico Esteatose versus Esteatohepatite.....	42
Tabela 5. Prevalência de esteatohepatite encontrada por diferentes autores e média de IMC em kg/m ² de suas amostras.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
CK-18	Citoceratina-18
CK-18 M30	Fragmento CK-18 M30
CT	Colesterol Total
DHGNA	Doença Hepática Gordurosa Não-Alcoólica
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
EH	Esteatose Hepática
EHNA	Esteatohepatite não-alcoólica
HDL-C	Colesterol da lipoproteína de alta densidade
IMC	Índice de Massa Corpórea
LDL-C	Colesterol da lipoproteína de baixa densidade
NFS	NAFLD <i>Fibrosis Score</i>
PCA	Análise de Componentes Principais
PCR	Proteína C reativa
PLS-DA	Análise discriminante com calibração multivariada por mínimos quadrados parciais
RI	Resistência Insulínica
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear H ¹
TG	Triglicerídeos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	METABONÔMICA: DETALHES DO PROCESSO	20
1.1.1	Análise estatística	21
1.2	METABONÔMICA EM ESTUDOS DE GRANDE ESCALA	22
1.3	METABONÔMICA: DADOS BIBLIOMÉTRICOS	23
1.4	METABONÔMICA E DHGNA	25
2	JUSTIFICATIVA	26
3	OBJETIVOS	27
4	MODELO TEÓRICO E HIPÓTESE	28
5	MÉTODOS	30
5.1	DESENHO DO ESTUDO	30
5.2	FLUXOGRAMA	30
5.3	MODELO EXPERIMENTAL.....	31
5.4	OPERACIONALIZAÇÃO DA PESQUISA	31
5.4.1.	Local e período da pesquisa	31
5.4.2.	População da pesquisa	32
5.4.2.1.	<i>População alvo</i>	32
5.4.2.2.	<i>Critérios de inclusão</i>	32
5.4.2.3.	<i>Critérios de exclusão</i>	32
5.4.2.4.	<i>Tipo e processo de amostragem</i>	32
5.4.3.	Definição de termos e coleta de dados	33
5.4.3.1	<i>Etapas e método de coleta dos dados</i>	34
5.4.4.	Definição dos recursos humanos	36
5.5	LIMITAÇÕES METODOLÓGICAS DO ESTUDO	37
5.6	PROCEDIMENTOS ESTATÍSTICOS	37
5.7	PROCEDIMENTOS ÉTICOS	37
6	RESULTADOS	38
7	DISCUSSÃO	43
8	CONCLUSÕES	46
	REFERÊNCIAS	47
	APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO EM ESTUDO CLÍNICO	56
	APÊNDICE B – PROTOCOLO COLETA DE DADOS	59
	APÊNDICE C – BIÓPSIA HEPÁTICA	64
	APÊNDICE D – ARTIGO ORIGINAL	67

1 INTRODUÇÃO

A Doença Hepática Gordurosa Não-Alcoólica (DHGNA) é a causa mais comum de Doença Hepática Crônica nos países ocidentais (BYRNE, 2015). Há previsão de que se torne a mais frequente indicação de transplante hepático em 2030. Na última década, tem se mostrado que o impacto clínico da DHGNA não está apenas confinado à morbidade e mortalidade relacionados ao fígado, mas, com evidência crescente, hoje é considerada como uma doença multisistêmica, afetando órgãos e vias regulatórias extra-hepáticas (ARMSTRONG et al., 2014). Por exemplo, sabe-se que a DHGNA aumenta o risco de diabetes mellitus tipo 2, doença cardiovascular e doença renal crônica.

Sua prevalência é de aproximadamente 30% a 40% em homens e 15% a 20% em mulheres, chegando a valores tão altos quanto 70% nos diabéticos tipo 2 (BROWNING, 2004; BLACHIER, 2013). No Brasil, estudos utilizando a ultrassonografia como método diagnóstico, encontraram esteatose hepática em aproximadamente 20% da população geral (CRUZ et al., 2016). Estudos realizados no Hospital das Clínicas da UFPE encontraram prevalência de DHGNA de 42% entre os pacientes diabéticos e de 88,6% nos submetidos à cirurgia bariátrica (FERREIRA; PERNAMBUCO; LOPES, 2010; CORDEIRO et al., 2013). Os números relacionados à mortalidade também despertam atenção, com meta-análise apontando que a DHGNA está relacionada a um aumento da mortalidade geral em 57%, principalmente por causas hepáticas e doença cardiovascular (MUSSO et al., 2011).

A DHGNA não é uma doença única, mas sim abrange um espectro de estágios dentro de sua história natural. Inicialmente há o acúmulo excessivo de gordura no fígado, denominado esteatose simples. Cerca de 30% a 40% desses pacientes evoluem para esteatohepatite, onde além da esteatose hepática há inflamação ou injúria hepatocelular (EKSTED et al., 2006). Enquanto os que têm esteatose simples têm uma evolução relativamente benigna, aqueles com esteatohepatite têm maiores chances de progredir para cirrose, podendo ainda apresentar carcinoma hepatocelular ou mesmo mortalidade por causa hepática (ONG; PITTS; YOUNOUSSI, 2010).

A presença de fibrose hepática é o determinante mais importante de desfechos e, usando o sistema de score Metavir, ela varia de ausente (estágio 0) a cirrose (estágio 4). A maioria dos pacientes que progridem para estágios avançados de fibrose originalmente tinham EHNA, com

um risco estimado de progressão para cirrose de aproximadamente 20%. Em contraste, acredita-se que a esteatose não-alcóolica tenha curso mais benigno, com um risco estimado de progressão para cirrose de menos de 4%.

Descrever a patogênese dessa condição é ainda encontrar mecanismos não completamente compreendidos, como o porquê de alguns pacientes seguirem apenas com esteatose e outros cursarem com esteatohepatite e posteriormente cirrose. O fígado tem um papel fundamental no metabolismo da glicose e dos lipídeos, portanto a patogênese da doença gordurosa representa alteração na homeostase desses metabolismos. Na bem reconhecida teoria dos “*two-hits*”, a primeira injúria é o acúmulo de triglicérides nos hepatócitos, seguido por uma segunda injúria na qual mediadores inflamatórios causam lesão hepatocelular, inflamação e fibrose (SUN; FAN; QIAO, 2015). Estudos feitos nos últimos anos têm descrito um novo modelo em que múltiplas agressões paralelas podem ser responsáveis pela DHGNA (TAKAKI; KAWAI; YAMAMOTO, 2013). A resistência insulínica tem papel importante nos modelos descritos, pois aumenta o recrutamento de ácidos graxos livres da circulação e sua deposição hepática, ativando também mecanismos que levam a estresse oxidativo e apoptose dos hepatócitos.

O entendimento da patogênese descrita se torna mais completo à luz do conhecimento sobre exposoma, definido como a totalidade de exposições químicas de um indivíduo desde sua concepção (RAPPAPORT, 2011). Apesar de inicialmente as exposições ambientais terem sido seu foco, hoje se assume que a grande maioria dos tóxicos químicos afetam alvos críticos dentro do corpo e, assim, o “ambiente” relevante é o ambiente químico interno. Ao se destacar produtos da peroxidação lipídica, estresse oxidativo, inflamação e microbiota intestinal como pontos essenciais no modelo explicativo da evolução esteatose/esteatohepatite, se traz a visão de exposoma para o problema em estudo.

Paralelo à tentativa de melhor compreender os mecanismos fisiopatológicos da DHGNA estão os esforços de se encontrar maneiras acuradas de diferenciar esteatose de esteatohepatite. Atualmente, a única forma de diferenciar esses dois pontos da história natural da doença gordurosa é através da biópsia hepática (SANAL, 2015). Esse método, além de invasivo, tem alto custo, está sujeito a erros de amostragem (há estudo que mostra discordância de estágios da doença em 41% dos casos, quando se analisam duas amostras) e apresenta mortalidade de 0,01 a 2% relacionada ao próprio procedimento (RATZIU et al., 2005).

Diante das claras limitações do atual padrão-ouro para diferenciação entre esteatose e esteatohepatite, vários métodos menos invasivos (potenciais biomarcadores) têm sido estudados, incluindo marcadores de inflamação, apoptose de hepatócitos, fibrose e estresse oxidativo.

Pode-se definir biomarcadores como marcadores biológicos mensuráveis objetivamente que podem ser usados para diagnosticar, monitorar ou prever o risco de doenças (XIA et al., 2013). Para que sejam validados devem ter importantes características, como sensibilidade suficiente para identificar aqueles com a doença, especificidade para excluir aqueles sem a doença, custo-efetividade e reprodutibilidade.

Encontra-se pelo menos três abordagens (Figura 1) que tem sido usadas e testadas nessa busca de biomarcadores para DHGNA (FITZPATRICK; DHAWAN, 2014). A primeira é o uso de dados clínicos e/ ou bioquímicos que tenham sido derivados de grandes estudos de associação (exemplo: índice de massa corpórea, resistência à insulina). A segunda abordagem é o uso de algoritmos, incluindo marcadores de inflamação/morte celular, gerados pelo conhecimento da fisiopatologia da doença. A terceira abordagem é baseada em novas tecnologias, como a proteômica e a metabonômica, que podem levar não só a marcadores diagnósticos, mas também permitem um melhor entendimento da fisiopatologia dessa condição.

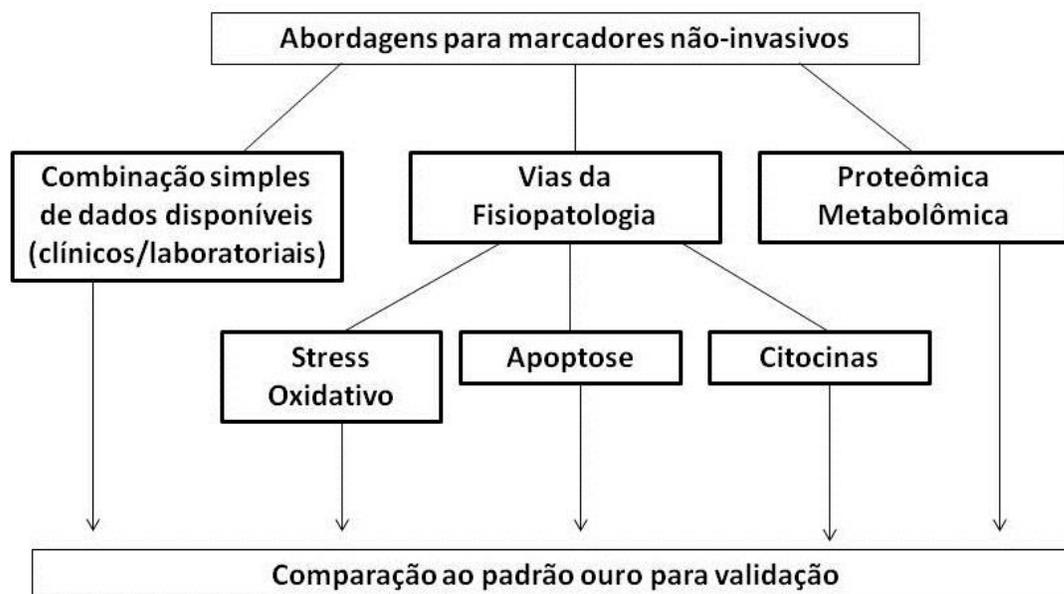


Figura 1. Abordagens usando marcadores minimamente invasivos para diagnosticar esteatohepatite nos pacientes com DHGNA.

A pesquisa na base de dados SCOPUS, usando os descritores referentes à biomarcadores e DHGNA deixa claro o crescente interesse nessa área (figura 2). Dados de uma revisão sistemática apontam o conhecimento dos principais biomarcadores até então estudados (Tabela 1), mas se reconhece que até o momento, nenhum deles foi capaz de substituir a biópsia hepática na diferenciação esteatose/esteatohepatite (DOWMAN; TOMLINSON; NEWSOME, 2011).

Documents by year

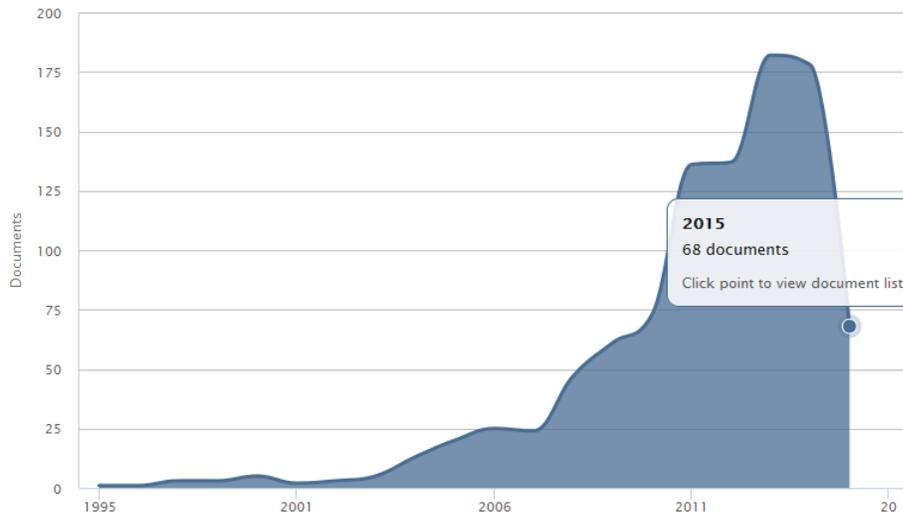


Figura 2. Gráfico gerado pela base de dados SCOPUS em 12/06/2015 mostrando a produção com os descritores *biomarkers* (biomarcadores) e NAFLD (doença hepática gordurosa não alcoólica) por ano, entre 1995 e 2015.

Tabela 1. Conhecimento sobre os principais biomarcadores para diferenciação entre esteatose e esteatohepatite não-alcoólica.

AST/ALT	Já se sabe que ter aminotransferases normais não exclui esteatohepatite e que não houve diferença na gravidade da inflamação ou fibrose na biópsia em relação aos níveis dessas enzimas.	
NASH test	Usa 13 variáveis clínicas e bioquímicas	Especificidade 94% Sensibilidade 33%
Inflamação	↑TNF alfa e ↓adiponectina PCR ultrasensível	Acurácia não determinada Pouca especificidade
Estresse oxidativo	Produtos de peroxidação lipídica, níveis de vitamina E e atividade da glutathione peroxidase	Estudos pequenos, resultados mistos
Apoptose	Citoceratina-18	Especificidade 87% Sensibilidade 78%
Resistência Insulínica	Adiponectina + HOMA-IR*	Acurácia 79%

*HOMA-IR modelo de homeostase para avaliação de resistência insulínica. FONTE: A autora (2017).

Marcadores de inflamação

Marcadores genéricos de inflamação como ferritina e PCR ultrasensível apresentam associação com EHNA (HUI et al., 2004; TARGHER, 2006; MUSSO et al., 2011). Adiponectina

e outras citocinas têm mostrado correlação com a presença e a gravidade da doença (JARRAR et al., 2008). Em particular, níveis altos de fator de necrose tumoral alfa e baixos níveis de adiponectina são associados com maior grau de dano hepático (HUI et al., 2004a; HAUKELAND et al., 2006; MANCO et al., 2007; JARRAR et al., 2008). No entanto, o uso desses marcadores como preditores de doença é inconsistente e pode não ser sensível ou específico o suficiente para atuar como biomarcadores robustos isoladamente.

Marcadores de morte celular

Citoqueratina (CK)-18 é uma proteína que compõe filamentos intermediários no fígado. Caspases clivam a CK-18 durante a apoptose dos hepatócitos e criam fragmentos de CK-18 que podem ser detectadas por imunoenensaio (KWOK et al., 2014).

A apoptose hepática, uma forma organizada e controlada geneticamente de morte celular, parece ter um papel importante na injúria hepática e na progressão da DHGNA (FELDSTEIN et al., 2013). Uma consequência central do processo de apoptose é a ativação de caspases efetoras (principalmente caspase 3) que clive diferentes substratos dentro da célula, incluindo a CK-18, resultando em mudanças morfológicas características da apoptose.

Os fragmentos de CK-18 gerados pelas caspases já foram testados no tecido hepático e no plasma de pacientes submetidos à biópsia por suspeita de DHGNA e controles (WIECKOWSKA et al., 2006). Notou-se que os fragmentos de CK-18 encontram-se elevados significativamente nos pacientes com DHGNA, comparado aos controles. Resultados similares foram posteriormente observados em uma população de pacientes obesos submetidos à cirurgia bariátrica (DIAB et al., 2008). Estudo com 139 pacientes biopsiados, mostrou acurácia de 83% desse biomarcador para diagnóstico de EHNA (FELDSTEIN, 2010).

Modelos Preditivos

Vários modelos preditivos têm sido desenvolvidos usando parâmetros clínicos e medidas de produtos do processo fibrogênico. Entre esses, o escore de fibrose NFS (*NAFLD Fibrosis Score*) é calculado usando dados clínicos disponíveis (idade, índice de massa corpórea, presença

ou ausência de hiperglicemia, contagem de plaquetas, albumina e razão AST/ALT) ajudando a identificar pacientes com doença mais grave (ÂNGULO et al., 2007). Aplicando esse modelo, a biópsia hepática foi evitada em 75% de 733 pacientes, com predição correta em 90%.

A presença de síndrome metabólica é forte preditor de esteatohepatite em pacientes com DHGNA e pode ser usada para identificar pacientes com bioquímica hepática persistentemente anormal, que irão se beneficiar de uma biópsia hepática para diagnóstico e prognóstico.

As pesquisas envolvendo os biomarcadores atuais para EHNA frequentemente não preenchem a métrica de qualidade do STARD (*Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy*). Então uma nova extensão do STARD foi proposta especificamente para testes diagnósticos para fibrose hepática (BOURSIER et al., 2015).

No caso de DHGNA, o biomarcador deve ser particularmente hábil para distinguir esteatose de esteatohepatite, determinar a extensão da fibrose hepática, predizer o risco de progressão da doença e monitorar a resposta a intervenções terapêuticas.

A maioria dos testes disponíveis atualmente, como o Steatotest ou NASHtest, são baseados na combinação de características não relacionadas à função hepática (idade, índice de massa corpórea, sexo) com biomarcadores refletindo alterações nas enzimas hepáticas, mas não diretamente envolvidos na iniciação ou progressão da doença. Apesar de ainda ser possível melhorar os algoritmos usados nesses testes, é improvável que esses novos algoritmos tenham grande efeito em sua acurácia, porque os biomarcadores empregados não estão diretamente envolvidos no desenvolvimento da DHGNA.

Metabonômica

A metabonômica pode ser definida como a medida quantitativa da resposta metabólica dinâmica à estímulos fisiopatológicos ou modificação genética nos seres vivos (NICHOLSON; LINDON; HOLMES, 1999). Fundamenta-se em um princípio básico dos seres vivos chamado de homeostase (LINDON; HOLMES; NICHOLSON, 2003). Quando um sistema vivo é exposto a situações de estresse, responde no sentido de neutralizar a ação externa. Com isso, ocorrem

mudanças na concentração e no fluxo dos metabólitos endógenos na busca de manter o meio interno estável ou em homeostase.

Durante a década de 90, foram introduzidas algumas ferramentas analíticas que tinham como objetivo descrever qualitativa e quantitativamente todos os compostos de baixo peso molecular presentes numa célula animal ou vegetal. Esse conjunto de técnicas foi denominado metabolômica, a partir do conceito de metaboloma (ROBERTSON, 2005). Por definição, metaboloma é o conjunto de todas as moléculas de baixa massa molecular (metabólitos) presentes numa célula, que são necessárias para seu funcionamento e crescimento. Esses metabólitos são compostos orgânicos (aminoácidos, ácidos graxos, vitaminas, lipídeos e carboidratos, por exemplo), inorgânicos e espécies elementares. O metaboloma humano possui centenas de milhares de compostos.

É comum o uso dos termos metabonômica e metabolômica como sinônimos, mas baseado nas definições descritas, se observa que enquanto a metabolômica busca identificar e também quantificar os metabólitos que sofrem mudanças em suas concentrações após a interferência de agentes externos (TEAHAN et al., 2006), na metabonômica, o objetivo é reconhecer mudanças no perfil dos metabólitos presentes no biofluido (SILVA, 2010).

No desenvolvimento dessas duas estratégias, alguns conceitos são importantes:

Análise de Metabólitos – Determinação qualitativa e quantitativa de metabólitos relacionados a uma reação metabólica específica. Esse tipo de análise exige preparação da amostra, com separação dos metabólitos de interesse. Pode-se utilizar, por exemplo, a separação cromatográfica seguida por um método de detecção (como a espectrometria de massas).

“Impressão Digital Metabólica” – é uma análise global e rápida, objetivando classificar as amostras. A identificação e a quantificação dos metabólitos não são necessárias. O tratamento da amostra é simples e o tempo de análise mais curto, por não ser necessária uma separação prévia.

A “impressão digital metabólica” é um conceito que está inserido na estratégia metabonômica, uma vez que dispensa a identificação dos metabólitos e visa classificar as amostras. Mesmo assim, quando a análise utiliza a espectroscopia de ressonância magnética nuclear, isso pode ser possível. Existe um banco de dados, com a informação do deslocamento químico dos compostos, que permite a identificação de alguns metabólitos (Figura 3)

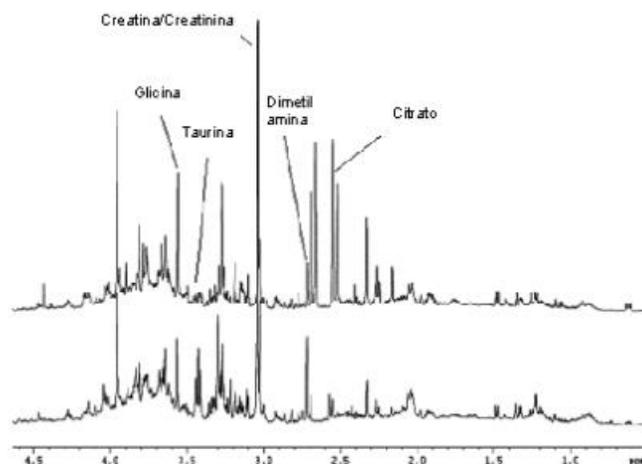


Figura 3. Identificação de metabólitos em espectro de RMN de urina de humanos

Dessa forma, o objetivo do pesquisador vai definir a estratégia a ser adotada e, conseqüentemente, a técnica mais adequada a ser utilizada. Se o objetivo é identificar e quantificar metabólitos, as técnicas cromatográficas associadas à espectrometria de massa são boas escolhas. Mas se o objetivo é traçar um perfil metabólico e associá-lo a alguma doença ou condição particular, pode ser utilizada a espectroscopia de ressonância magnética.

A RMN¹H é uma técnica não destrutiva, amplamente usada na química, que fornece informação detalhada da estrutura molecular, assim como sobre suas concentrações relativas. Como os espectros gerados a partir dessa análise são complexos, a utilização de ferramentas de estatística multivariada se faz necessária para o tratamento desses dados. Nos últimos anos, nosso grupo de pesquisa em metabonômica tem adotado essa estratégia nos pacientes com doenças hepáticas, com publicações e modelos construídos para os portadores de hepatite C, hepatite B e esteatose hepática (GODOY et al., 2010). Poucos estudos empregaram a metabonômica na diferenciação entre esteatose e esteatohepatite não-alcoólica, e nenhum deles usou a RMN¹H.

A metabonômica vem ao encontro da necessidade de se encontrar biomarcadores mais sensíveis aos utilizados atualmente, pois os marcadores detectados por análises clínicas convencionais e métodos histopatológicos são pouco específicos e apenas apresentam alterações significativas após as lesões ou doenças estarem em estágios avançados. Os biomarcadores podem ser considerados ideais quando são capazes de identificar doenças em estágios iniciais, resultando em tratamentos mais eficazes. Para serem considerados ótimos para uso clínico,

devem poder ser rapidamente analisados, com bom custo-benefício, específicos e sensíveis, bem como prever o risco da doença (LABORDE et al., 2012). Neste sentido a metabonômica se tornou uma tecnologia promissora para aplicação na área de patologia, e seus benefícios têm sido demonstradoa em diversas áreas clínicas (ZHANG et al., 2012), como na busca por biomarcadores como meio diagnóstico e indicadores da progressão de doenças (NICHOLSON; LINDON; HOLMES, 1999; LINDON; HOLMES; NICHOLSON, 2003; SOLANKY et al., 2003; AZMI et al., 2008; GINSBURG; DONAHUE; NEWBY, 2005; KIRSSCHENLOHR et al., 2006; AKIRA; IMACHI; HASHIMOTO, 2005; AKIRA et al., 2008; 2010; MAKINEN et al., 2008; BERTINI et al., 2012; DUARTE; DIAZ; GIL, 2012).

Além disso, a metabonômica tem sido aplicada para estudar o efeito de drogas no organismo (HOLMES et al., 1998; WATERS et al., 2001), toxicologia (HOLMES et al., 2000; LINDON; HOLMES; NICHOLSON, 2003), análise fitoquímica e desenvolvimento de novas drogas (SUMNER; MENDES; DIXON, 2003; SHYUR; YANG, 2008; POWERS, 2009; SCHRIPSEMA, 2010) e análise de alimentos e seus efeitos nutritivos (SOLANKY et al., 2003; WISHART, 2008; MANNINA; SOBOLEV; CAPITANI, 2012).

Admitindo-se a DHGNA como algo verdadeiramente complexo, acredita-se que a metabonômica seja um método bastante promissor para estabelecer a diferenciação entre esteatose e esteatohepatite não-alcoólica. Poderá vencer as limitações dos marcadores já estudados e ainda trazer maior entendimento da patogênese pela identificação dos metabólitos envolvidos.

O emprego dessa estratégia representa uma mudança de paradigma na análise clínica, migrando de um sistema que visa determinar o teor (concentração absoluta) de certas substâncias, biomarcadores específicos, para um sistema no qual inicialmente identificam-se perfis espectrais associados ao objeto de investigação, podendo-se posteriormente identificar os metabólitos endógenos envolvidos nessas alterações.

Apesar de desenharmos um estudo para avaliação de um método diagnóstico, esse conhecimento pode ainda nos ajudar na busca de melhores alvos terapêuticos para essa doença, que até então tem seu tratamento apenas focado em controle de fatores de risco e não verdadeiramente em seus mecanismos indutores e de progressão.

1.1 METABONÔMICA: DETALHES DO PROCESSO

O cuidado para coleta, preparação e armazenamento das amostras é bastante importante para assegurar que haja uma representação significativa do metaboloma *in vivo*. Isso é um aspecto crítico para qualquer estudo, pois falha em coletar amostras corretamente pode levar a erro nos achados. Apesar de não existir atualmente diretrizes baseadas em evidências para coleta de amostras especificamente para estudos com esse método, existem orientações baseadas em consensos de especialistas (HOLLAND et al., 2003; TUCK et al., 2009; DUNN et al., 2011).

Após a coleta, a amostra de sangue deve ser dividida em alíquota, e após centrifugação, refrigerada assim que possível em -80°C até o momento da análise (DIETMAIR et al., 2010). Evitar ciclos de congelamento e descongelamento desnecessários irá reduzir a possibilidade de degradação de metabólitos, minimizando a introdução de erros sistemáticos nos perfis de metabólitos (TEAHAN et al., 2006; SAUDE; SYKES, 2007; YIN et al., 2013).

Na metabonômica, as duas técnicas mais comumente usadas são espectrometria de massa e a ressonância magnética nuclear (RMN), que operam em princípios diferentes e com requerimentos diferentes para processamento da amostra. A RMN explora o spin nuclear único de um componente para reconhecer sua identidade e é mais efetivo para fluidos, tornando necessário converter tecidos sólidos para líquidos antes da análise (DUNN et al., 2011). Por outro lado, a espectrometria de massa é uma técnica química analítica que identifica compostos pela razão massa/carga e é realizada com uma técnica de separação de íons previamente, como cromatografia líquida ou gasosa.

A espectroscopia de RMN usa um pulso eletromagnético para induzir transições de energia em spins nucleares de amostras submetidas a um campo magnético estático. Quando um núcleo está em um campo magnético, seu spin nuclear irá alinhar a mesma direção (orientação alfa) ou oposta (orientação beta) do campo magnético externo. A maioria dos núcleos existe na orientação alfa, já que requer menos energia, assim mais núcleos estão alinhados com o campo magnético externo do que contra ele. A espectroscopia de RMN usa radiação eletromagnética para levar o núcleo orientado em alfa para o estado beta. Quando a energia é removida, o núcleo reverte ou “relaxa” de volta ao estado alfa. A flutuação do campo magnético associada com o

processo de relaxação é chamado “ressonância” e pode ser visualizada como picos em um espectro de RMN, dando informação estrutural sobre a molécula (DUNN et al., 2011).

Ambas as técnicas (Espectrometria de Massa ou RMN) têm suas vantagens e desvantagens (LENZ; WILSON, 2007; ISSAQ et al., 2009). As principais vantagens da RMN são uma preparação da amostra relativamente mínima e alta reprodutibilidade (DUMAS et al., 2006). Já sua principal limitação é uma menor sensibilidade, já que transições de energia pequenas para moléculas pequenas (ex. açúcares, aminoácidos) são geralmente obscurecidos por aquelas de moléculas maiores (ex. triglicerídeos, lipoproteínas).

1.1.1 Análise estatística

O objetivo da maioria dos estudos metabonômicos é identificar padrões que sirvam como marcadores de condições biológicas, seja quando esse padrão precede a condição (‘exposição’), ou quando é consequência da condição (‘desfecho’).

Uma forma de vencer a limitação dos testes múltiplos é reduzir a dimensionalidade dos dados antes das análises convencionais. Dessa forma, o analista pode examinar correlações e usar técnicas de regressão padrão para avaliar associações com a exposição ou desfecho de interesse. Exemplos comuns incluem a análise de componentes principais (PCA), que gera clusters ortogonais de metabólitos que explicam a maioria da variância nos dados; a análise de componentes simultânea ANOVA; e técnicas de análise em cluster, como análise hierárquica em cluster, que agrupa metabólitos em clusters naturais.

Análises multivariadas convencionais podem seguir essas técnicas para identificar grupos de metabólitos mais fortemente associados com a exposição ou desfecho.

No caso de métodos supervisionados, o investigador pode ter uma hipótese *a priori* da relação entre metabólitos específicos e a condição biológica. O objetivo dos métodos supervisionados é encontrar um modelo que corretamente associe os metabólitos com a condição biológica de interesse. Os métodos supervisionados requerem um conjunto de dados para gerar um modelo que caracterize a relação entre os padrões de metabólitos e a condição biológica. Após essa fase, o modelo tem sua validade avaliada em um conjunto de dados independente.

Exemplos de abordagens supervisionadas incluem random forest, um método de classificação que opera pela construção de árvores de decisão com objetivo de reduzir variância; análise discriminante com calibração multivariada por mínimos quadrados parciais (PLS-DA), que relaciona a variável independente (dados dos metabólitos) ao vetor resposta (a condição biológica de interesse) com um modelo de regressão. PLS-DA classifica as variáveis pela maximização da discriminação entre grupos de amostras pré-definidos.

1.2 METABONÔMICA EM ESTUDOS DE GRANDE ESCALA

Ao decidirmos empregar a metabonômica no estudo de uma doença tão prevalente como a DHGNA, também nos interessa conhecer como essa técnica tem sido utilizada em estudos de grande escala.

Em diretrizes para tais procedimentos, o Biobank do Reino Unido evidenciou que amostras de plasma, soro e urina mantidas em 4° C por 24 horas e com transporte bem controlado antes de criopreservação por longo tempo foram adequadas para estudos metabonômicos de alta resolução (PEAKMAN; ELLIOTT, 2008).

A RMN¹H se mostra como a maneira mais viável de obter perfis metabólicos não supervisionados para um grande número de pessoas a um custo razoável. O instrumento INTERMAP para análise em urina é capaz de analisar mais de 100 amostras por aparelho por dia.

É essencial que as plataformas analíticas permaneçam estáveis, e que qualquer desvio seja quantificado e compensado para reduzir diferenças sistemáticas e reduzir vieses. O coeficiente de variação associado com espectroscopia por RMN¹H inter- e intra laboratório é de aproximadamente 5%.

Ao se escolher a RMN, a identificação de metabólitos pode ser feita posteriormente para um número pequeno de picos discriminatórios, já que isso envolveria consumo de maior tempo e de recursos. Essa estratégia pode simplificar a análise de dados, especialmente quando existe grande número de amostras.

1.3 METABONÔMICA: DADOS BIBLIOMÉTRICOS

Por estarmos estudando um método pouco empregado na avaliação da DHGNA, é interessante investigar o quanto ele já foi explorado na literatura. A bibliometria é um método de pesquisa que permite encontrar uma quantidade de artigos essenciais (denominados nucleares) que se supõe serem os mais relevantes publicados sobre um determinado assunto, partindo da prática estabelecida na comunidade científica de fornecer as referências bibliográficas de qualquer trabalho.

Como estratégia para elaboração da pesquisa bibliométrica sobre metabonômica, utilizou-se o banco de dados SCOPUS, a palavra-chave “metabonomics” e o período de 1999 (reconhecida como primeira publicação, até 2016). A figura 3 mostra os dados dessa pesquisa.

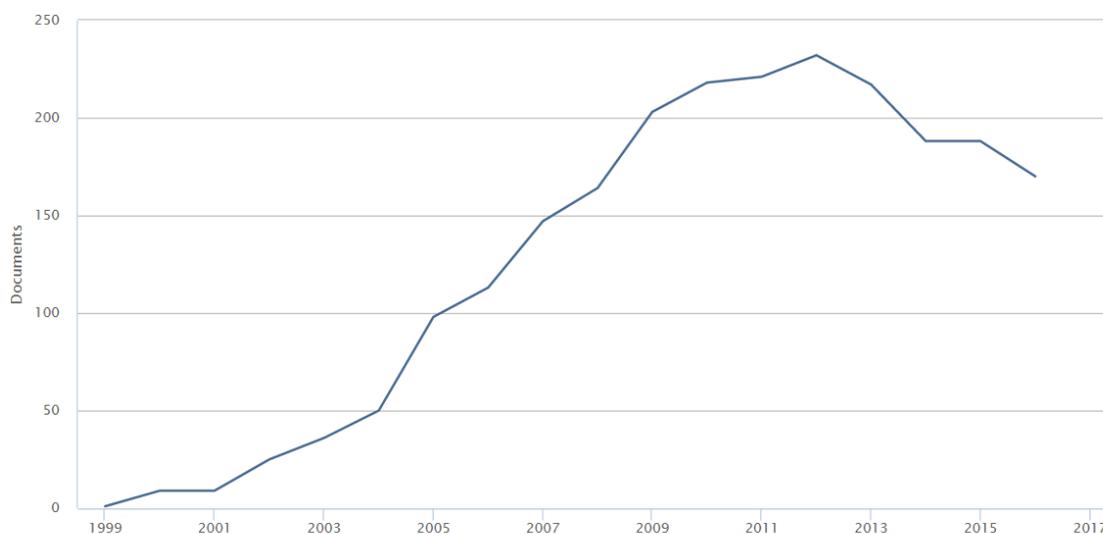


Figura 4 (a). Número de publicações com o descritor “*metabonomics*” na base de dados SCOPUS de acordo com o ano de publicação, ente 1999 e 2016.

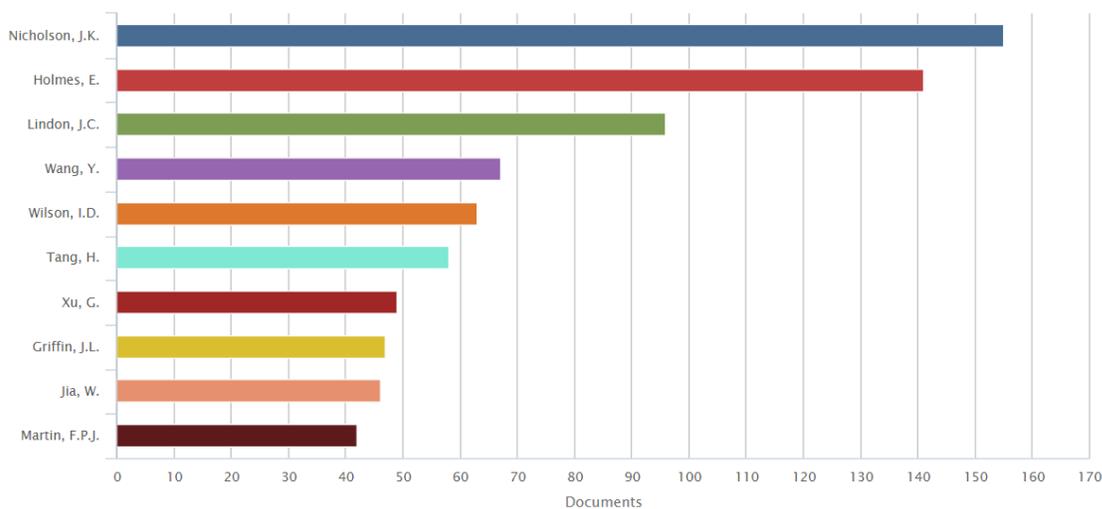


Figura 4 (b). Número de publicações em número com o descritor “*metabonomics*” na base de dados SCOPUS de acordo com o autor, entre 1999 e 2016.

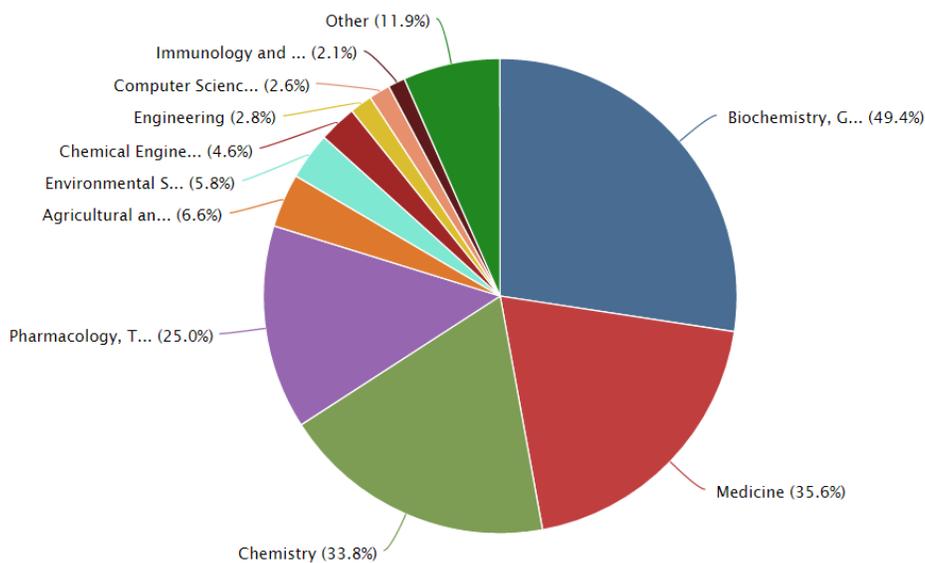


Figura 4 (c). Número de publicações com o descritor “*metabonomics*” na base de dados SCOPUS de acordo com a área, entre 1999 e 2016.

1.4 METABONÔMICA E DHGNA

Encontram-se na literatura poucos estudos com metabonômica que avaliaram a fisiopatologia da esteatose e sua progressão para a esteatohepatite (BEYOGLU; IDLE, 2013). Quando uma pequena série de pacientes com esteatohepatite foi comparada com a de esteatose, mudanças significantes nas concentrações séricas de apenas três fosfolipídeos foram relatados (BARR et al., 2011). Um destes estudos, encontrou concentrações séricas aumentadas de glicose, glutamato e taurina nos pacientes com esteatohepatite (WU; ZHU; WANG, 2011).

Observa-se que artigos até então publicados, além de em sua maioria não terem usado RNM, mas sim a estratégia com espectrometria de massa, focaram muito mais a pesquisa de vias alteradas do metabolismo que pudessem explicar a fisiopatologia da progressão esteatose/esteatohepatite. Porém, como já discutido em relação ao uso da metabonômica para estudos de grande escala, o reconhecimento de padrões espectrais, mesmo sem identificação dos metabólitos, pode ser empregado mais facilmente para o reconhecimento de indivíduos saudáveis e doentes.

2 JUSTIFICATIVA

Diante do reconhecimento da DHGNA como enfermidade de grande prevalência local e mundial e entendendo sua potencial evolução para cirrose e hepatocarcinoma, além de sua ligação com complicações extra-hepáticas, é notável a importância de estudar métodos para o seu diagnóstico.

Sabe-se que nenhum dos biomarcadores até então estudados foi capaz de substituir a biópsia hepática na diferenciação esteatose/esteatohepatite, sendo a biópsia método caro, invasivo e sujeito a erros de amostragem.

Com o advento das tecnologias “ômicas”, se reconhece uma mudança de paradigma, saindo de um sistema que visa determinar o teor (concentração absoluta) de certas substâncias, para um sistema no qual inicialmente identificam-se perfis espectrais associados ao objeto de investigação, podendo-se também identificar os metabólitos endógenos envolvidos nessas alterações.

Escolher fazer um estudo metabonômico, é também trazer uma mudança de visão no sentido de não buscar o entendimento de uma determinada via envolvida no processo, mas sim reconhecer a complexidade da DHGNA e assim, buscar o uso de múltiplos marcadores para seu diagnóstico, com auxílio dos meios estatísticos necessários para esse fim.

Dentre os estudos metabonômicos publicados que já envolveram DHGNA, muitos seguiram pela pesquisa de metabólitos específicos, enquanto nosso propósito visa a criação de um modelo, que possa posteriormente ser validado e reproduzido para diagnóstico em grande escala. Os estudos do nosso grupo com hepatite B, hepatite C e esteatose usaram a RMN¹H, de forma que além da experiência prévia, a opção por esta ferramenta foi baseada nas vantagens de ser um método com preparação mínima da amostra e alta reprodutibilidade.

3 OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Diferenciar pacientes com DHGNA que apresentam esteatose daqueles com esteatohepatite não alcoólica através da análise metabonômica utilizando a espectroscopia de RMN¹H em amostras de soro.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar os espectros médios de RMN¹H de amostras de soro dos pacientes com esteatose e dos que tem esteatohepatite não-alcoólica;
- Construir um modelo metabonômico para diferenciar os pacientes com esteatose dos que têm esteatohepatite não alcoólica.

4 MODELO TEÓRICO E HIPÓTESE

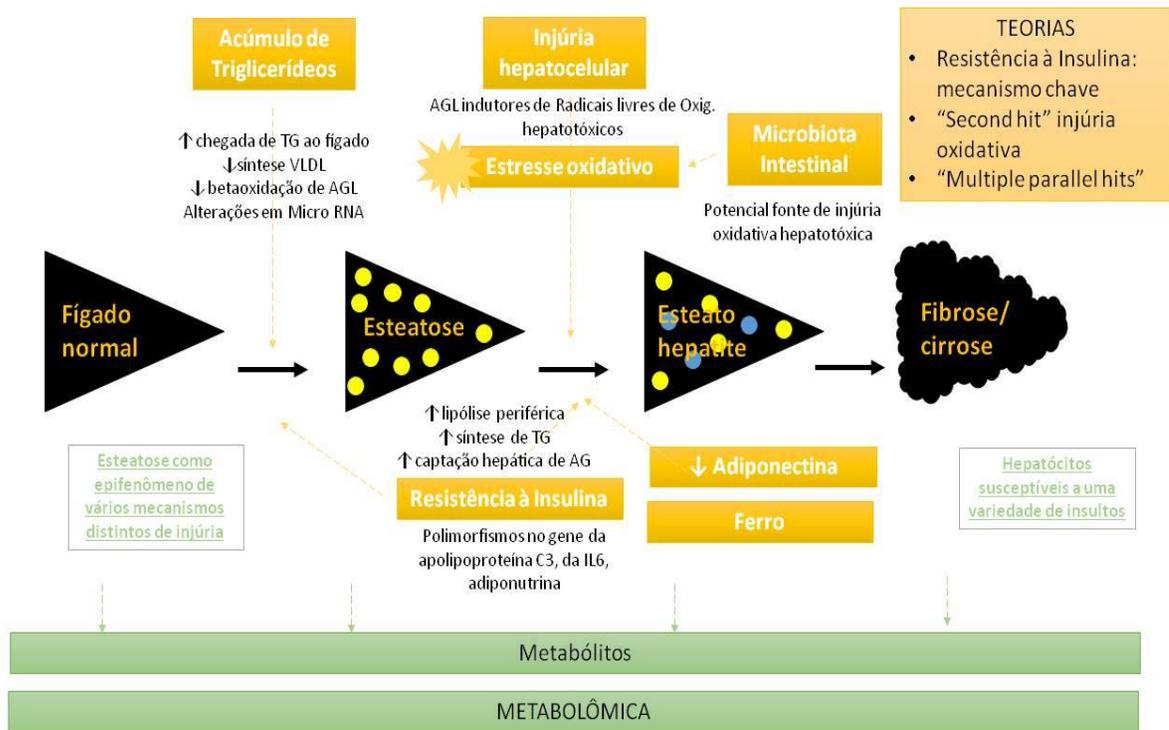


Figura 5. Modelo explicativo da história natural da DHGNA

TG= triglicerídeos; VLDL= very low-density lipoprotein; AGL= ácidos graxos livres; IL6= Interleucina 6

Para a construção desse modelo explicativo utilizaram-se três teorias. A primeira e mais amplamente aceita coloca a resistência insulínica como mecanismo chave na patogênese da DHGNA. A segunda sugere que além do acúmulo de gordura, para existir esteatohepatite, tem que ocorrer uma segunda injúria oxidativa (teoria do “*second hit*”). A terceira e mais recente teoria reconhece que existem múltiplas agressões paralelas nesse processo (“*multiple parallel hits*”).

Os espectros da doença vão da progressão de fígado normal para esteatose, podendo o paciente evoluir para esteatohepatite e por último fibrose/cirrose. Para haver esteatose tem que existir acúmulo de triglicerídeos (por qualquer um dos mecanismos apontados no modelo). A Resistência à Insulina é mecanismo chave tanto na progressão de fígado normal para esteatose como dessa última para esteatohepatite. A segunda agressão envolve a injúria hepatocelular, já

que o próprio acúmulo de ácidos graxos livres induz a formação de radicais livres de oxigênio hepatotóxicos, levando a estresse oxidativo. Os pacientes com esteatohepatite também têm reconhecida diminuição da adiponectina e acúmulo de ferro. Hoje tem crescido o reconhecimento do papel da microbiota intestinal nessa patogênese. Observações iniciais mostraram que os pacientes obesos têm maior supercrescimento bacteriano e acredita-se que a flora bacteriana intestinal possa ser outra potencial fonte de injúria oxidativa hepatotóxica, admitindo-se que existam múltiplas agressões hepáticas na terceira teoria.

Nesse modelo se reconhecem os hepatócitos como susceptíveis a uma variedade de insultos e a esteatose como um epifenômeno de vários mecanismos distintos de injúria.

Acredita-se que todas essas vias, por serem perturbações na homeostase, podem gerar alterações nos metabólitos e uma “impressão digital”. Assim, os metabólitos presentes nos biofluidos de pacientes com esteatose devem ser diferentes dos pacientes com esteatohepatite (já que esquematizamos injúrias distintas nessas duas condições).

Nossa hipótese é de que o modelo metabonômico construído através da espectroscopia de RMN¹H das amostras de soro possa diferenciar os pacientes com esteatose dos que tem esteatohepatite não alcoólica.

5 MÉTODOS

5.1 DESENHO DO ESTUDO

Foi feito um estudo de acurácia, seguindo o guideline STARD, comparando a estratégia metabonômica à biópsia hepática (padrão-ouro) na diferenciação entre esteatose e esteatohepatite.

5.2 FLUXOGRAMA

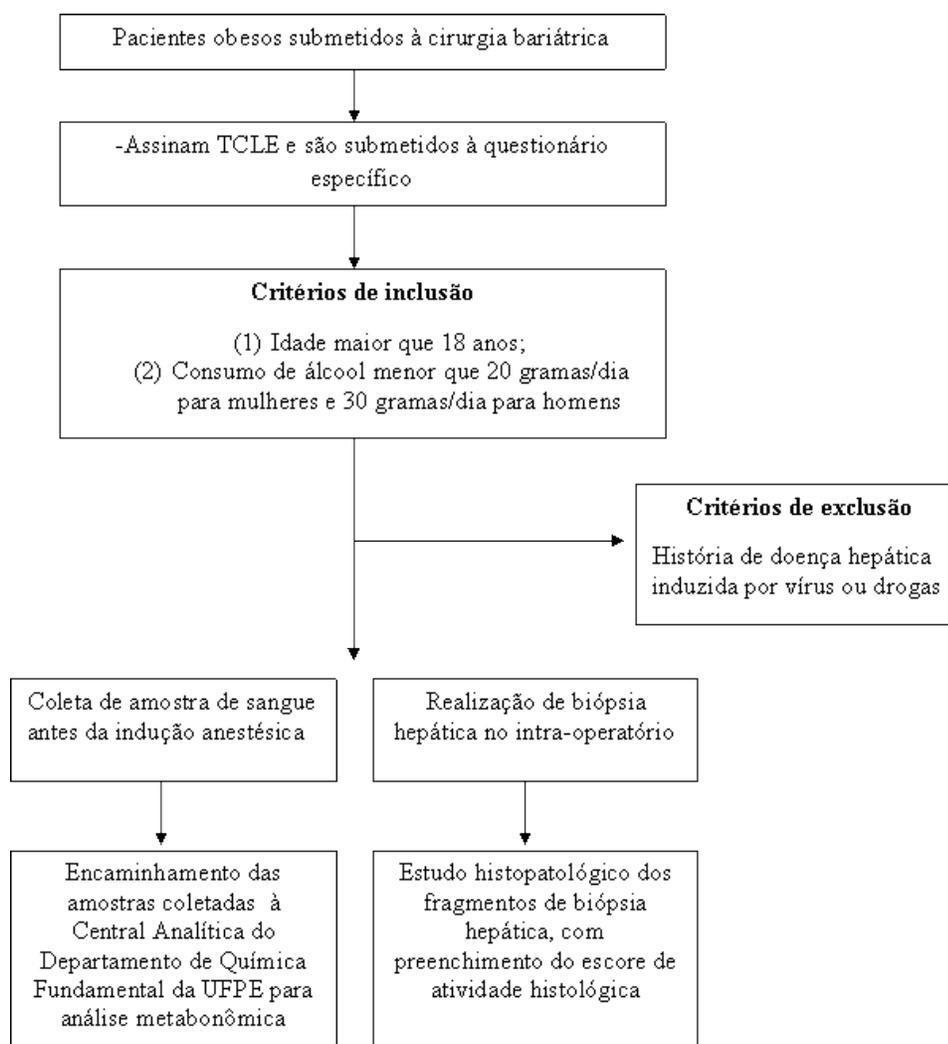


Figura 6. Desenho do estudo: seleção dos pacientes e análises.

5.3 MODELO EXPERIMENTAL

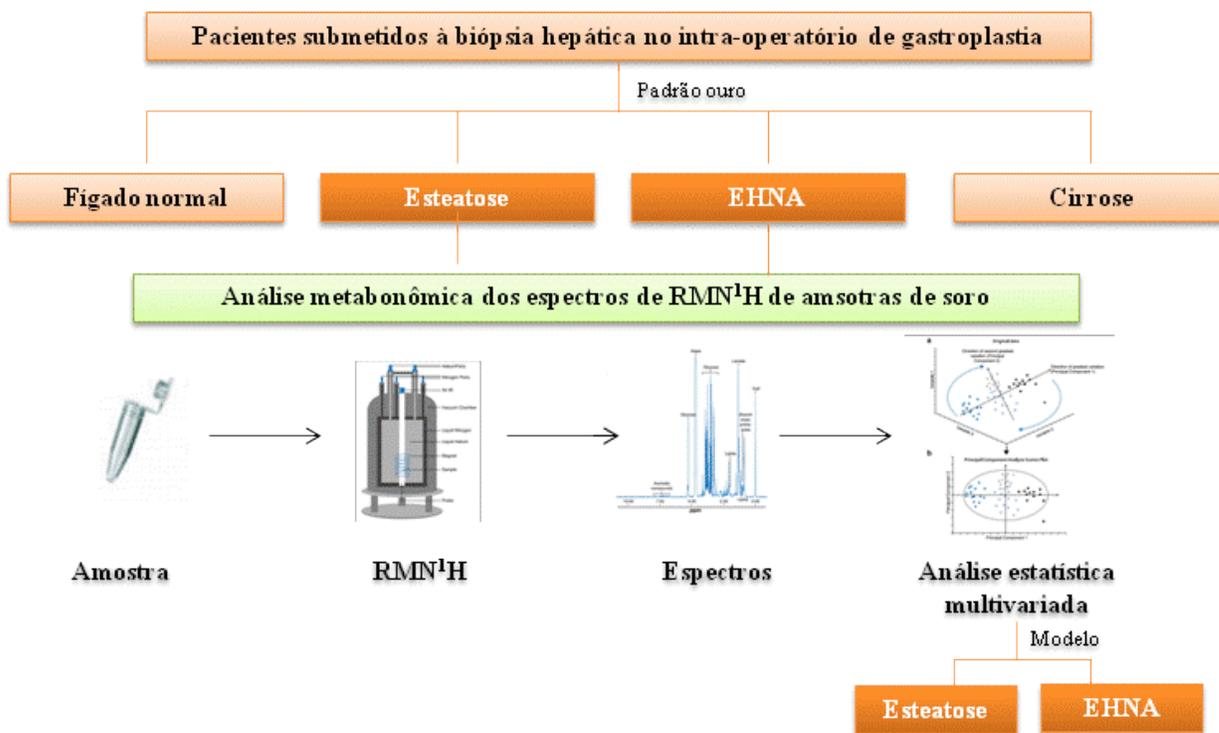


Figura 7. Modelo experimental do estudo.

5.4 OPERACIONALIZAÇÃO DA PESQUISA

5.4.1. Local e período da pesquisa

Pacientes foram triados da Clínica Neogastro, em Recife-PE onde uma equipe multidisciplinar que conta com médicos, enfermeiras, psicólogos e nutricionistas atua. Os dados foram coletados no período de novembro de 2015 a abril de 2016.

5.4.2. População da pesquisa

5.4.2.1. *População alvo*

Pacientes obesos submetidos à cirurgia bariátrica.

5.4.2.2. *Critérios de inclusão*

Foram incluídos os pacientes que preencheram os seguintes critérios:

- (1) Idade maior que 18 anos;
 - (2) consumo de álcool menor que 20 gramas/dia para mulheres e 30 gramas/dia para homens.
- O paciente respondeu em questionário a quantidade de álcool que costuma ingerir, e o pesquisador padronizou essa informação em gramas por dia.

5.4.2.3. *Critérios de exclusão*

Foram excluídos os pacientes que referiam história de doença hepática induzida por vírus ou drogas que pudessem causar esteatose e marcadores sorológicos negativos para Hepatites B e C (HbsAg, antiHBc e antiHCV).

5.4.2.4. *Tipo e processo de amostragem*

Realizou-se a técnica de amostragem por conveniência.

5.4.3. Definição de termos e coleta de dados

Termo	Definição teórica	Definição operacional
Doença Hepática Gordurosa Não-alcoólica (DHGNA)	(a) Evidência de esteatose hepática seja por imagem ou pela histologia e (b) sem causas secundárias para acúmulo de gordura hepática como consumo de álcool significativo, uso de medicação esteatogênica ou desordens hereditárias. Abrange o espectro inteiro da doença hepática gordurosa em indivíduos sem significativo consumo de álcool, indo desde a esteatose hepática até esteatohepatite e cirrose.	Pacientes com esteatose hepática (seja por imagem ou por histologia) que, em questionário da pesquisa não apresentam evidência de outra causa para a esteatose (sem consumo de álcool significativo, sem uso de outras drogas esteatogênicas ou desordens hereditárias).
Esteatose hepática não alcoólica	Presença de esteatose hepática sem evidência de injúria hepatocelular na forma de balonamento dos hepatócitos e sem evidência de fibrose.	Diagnóstico dado pela avaliação da patologia usando Escore de Atividade: Grau de Esteatose de 1 a 3 com demais escores iguais a 0.
Esteatohepatite não alcoólica (EHNA)	Presença de esteatose hepática e inflamação com injúria hepatocelular (balonamento) com ou sem fibrose.	Diagnóstico dado pela avaliação da patologia usando Escore de Atividade: Grau de esteatose de 1 a 3, com inflamação hepática e balonamento diferentes de zero, independentemente do escore de fibrose.
Escore de Atividade da Doença Hepática Gordurosa Não-alcoólica	Composto por escores de esteatose, inflamação e balonamento (14 achados histológicos, 4 dos quais são avaliados semi-quantitativamente)	Preenchimento do escore pela patologista atribuindo pontuação para as seguintes categorias: esteatose (0-3), inflamação lobular (0-2), balonamento hepatocelular (0-2) e fibrose (0-4)

Operacionalização das medidas e categorização das variáveis

Variáveis independentes	Definição teórica	Definição operacional	Categorização
Idade	Variável contínua definida pela data de nascimento que consta do Registro Geral fornecido pelo paciente.	Calculada em anos pela data de nascimento que consta do Registro Geral fornecido pelo paciente e registrado na data de aplicação do questionário.	Ausente
Sexo	Variável categórica dicotômica definido pela informação que consta do Registro Geral fornecido pelo paciente.	Considerado o sexo que consta do Registro Geral fornecido pelo paciente e registrado na data de aplicação do questionário.	Presente Masculino e Feminino
Índice de Massa Corpórea (IMC)	Variável contínua que é uma medida internacional usada para calcular se uma pessoa está no peso ideal. Expressa em kg/m^2	Calculado dividindo o peso do paciente (em kg) antes de se submeter à gastroplastia dividido pela altura (em metros) ao quadrado.	Presente 30 a <35 – Obesidade Grau I 35 a <40 – Obesidade Grau II >= 40 – Obesidade Grau III (mórbida)

5.4.3.1 Etapas e método de coleta dos dados

Etapa 1 – Seleção dos Pacientes: pacientes obesos com indicação médica de serem submetidos à cirurgia bariátrica no período da pesquisa foram informados sobre os objetivos e etapas do estudo e em seguida convidados a ler em conjunto com o pesquisador e assinar o TCLE. Após concordância, aqueles que assinaram o TCLE (Anexo 1) eram submetidos ao questionário (Anexo 2) e exame físico e registro de dados coletados do prontuário, referentes à exames laboratoriais e complementares.

Etapa 2 – Coleta das amostras: Coletada amostra de sangue dos pacientes em jejum, no dia do procedimento cirúrgico. A amostra foi centrifugada no laboratório de análises clínicas e o soro foi estocado em -80°C até análise, sendo enviada alíquota para a Central Analítica do Departamento de Química Fundamental da UFPE, para realização da RMN^1H e análise metabonômica.

Etapa 3 – Biópsia hepática: Os pacientes foram submetidos à biópsia hepática durante o intra-operatório. O fragmento obtido foi fixado em formol e posteriormente encaminhado ao Laboratório de Patologia Clínica. Todas as amostras foram analisadas pela mesma patologista, que realizou análise do fragmento submetido, segundo Escore de Atividade da Doença Hepática Gordurosa Não-alcoólica.

Etapa 4 – Análise metabonômica: As amostras de soro foram enviadas à Central Analítica do Departamento de Química Fundamental e analisadas usando a espectroscopia de RMN¹H e posteriormente criação do modelo metabonômico.

Biópsia Hepática

Foi realizada biópsia com agulha Hepafix ® 16G. O material foi conservado em formaldeído a 10% e enviado à patologia, onde foi corado com Hematoxilina-eosina e tricrômio de Masson.

Classificação histológica

Baseado nos critérios da Conferência da Associação Americana para o estudo das Doenças Hepáticas (BRUNT, Neuschwander-Tetri, Caldwell, 2003), utilizou-se a classificação em esteatose hepática (EH), esteatohepatite não alcoólica (EHNA) e cirrose hepática (CH). Esteatose foi classificada como grau 1 (acometimento de 5 a 33% dos hepatócitos acometidos), grau 2 (33 a 66% dos hepatócitos acometidos) e grau 3 (mais de 66% dos hepatócitos acometidos).

Coleta, preparação e armazenamento do material

Apesar de atualmente não existirem diretrizes baseadas em evidências no que se refere à coleta de amostras especificamente para estudos metabonômicos, seguimos os procedimentos padrão baseados em consensos de especialistas para a coleta de material biológico e processamento para estudos epidemiológicos.

Após coleta de sangue, as amostras foram centrifugadas antes do congelamento e estocagem. Não realizamos a coleta em tubos contendo EDTA, pela interferência na análise metabonômica. Evitando ciclos desnecessários de congelamento e descongelamento, reduziu-se a

possibilidade de degradação de metabólitos e minimizou-se a introdução de erros sistemáticos no perfil de metabólitos.

Espectroscopia de RMN¹H

Os espectros de RMN¹H foram obtidos através do espectrômetro Varian Unit Plus (Varian NMR) operando a 300 MHz, utilizando tubos de 5mm de diâmetro interno. Às amostras de 400 µL de sangue foram adicionados 200 µL de clorofórmio deuterado (D₂O). Após homogeneização, o espectro de RMN¹H será obtido, utilizando uma sequência de pulsos com pré-saturação do sinal da água.

Foram empregados como parâmetros: janela espectral igual a 5kHz, tempo de aquisição igual a 6,4s, pulso de 90°, *delay* de saturação igual a 3.0s e 32 repetições. Além disso, o espectro foi normalizado em função da intensidade de cada região, utilizando o VNMR6.1C software (Varian, Inc.).

Os dados dos espectros de RMN¹H foram transportados para o MestreNova Software versão 9.0, onde a região de 8,0 a 0,04 ppm foi separada em bins com 0,04 ppm de largura. Foi construída uma matriz com 39 linhas (casos) e 175 variáveis (deslocamentos químicos) dispostas em colunas.

Na plataforma Matlab 2015b foram feitos os modelos metabonômicos baseados em PCA e PLS-DA.

5.4.4. Definição dos recursos humanos

Todos pacientes foram submetidos à Cirurgia Bariátrica por profissionais (cirurgiões gerais e anestesistas) da mesma equipe. O TCLE e esclarecimento para seu preenchimento foram fornecidos pela própria pesquisadora, assim como o questionário da coleta de dados. Os fragmentos de biópsia hepática de todos os pacientes foram analisados pela mesma patologista, com experiência em doenças do fígado. A análise metabonômica foi realizada pelos membros do Grupo de Estudos em Metabonômica da Universidade Federal de Pernambuco, sob coordenação do Prof. Dr. Ricardo Oliveira.

5.5 LIMITAÇÕES METODOLÓGICAS DO ESTUDO

Por definição, para que o paciente seja considerado portador de DHGNA é preciso, excluir principalmente a ingesta de álcool, já que não existe marcador histológico que permita diferenciar a esteatose por álcool da não-alcoólica. Portanto, é necessário colher, na história e em exame clínico, sinais que possam sugerir consumo de álcool em maior quantidade, além de esclarecer ao paciente a importância da fidedignidade dessa informação. Utilizamos valores padronizados de grama por álcool de acordo com a ingesta informada.

Outra limitação importante foi a recusa dos pacientes em se submeterem ao procedimento, visto que a biópsia hepática não é realizada de forma rotineira na cirurgia bariátrica, muitos apresentavam receio em aceitar participarem do estudo e incluírem a realização da biópsia.

5.6 PROCEDIMENTOS ESTATÍSTICOS

Inicialmente, realizou-se análise descritiva dos dados que são apresentados como médias, desvio padrão e proporções. Por não apresentarem distribuição normal, para testar as diferenças entre os grupos de EH ou EHNA, utilizou-se teste não paramétrico (Mann-Whitney) para comparação de duas médias. Para testar a associação entre variáveis categóricas, foi utilizado o teste Qui-quadrado de independência de Pearson. Para todos os testes foi adotado o nível de significância de 5%. Os cálculos foram feitos no Software SPSS versão 20.0.

5.7 PROCEDIMENTOS ÉTICOS

O projeto foi analisado e autorizado CEP/CCS/UFPE, conforme protocolo CEP ofício no 042/2015-CEP/CSS.

6 RESULTADOS

Foram avaliados 39 pacientes, dos quais 31 (80%) apresentavam esteatose e 8 (20%) esteatohepatite.

Em relação às características clínicas, houve diferença estatística significativa em duas das variáveis: média de idade, 42,65 anos (95% IC=34,32;52,45) para EH vs 34,52 (95% IC=32,0;38,9) para EHNA (p=0,042) e esofagite de refluxo, 16,1% nos portadores de EH vs 75% nos que tinham EHNA (p=0,003) (Tabela 2).

Tabela 2- Características clínicas dos 39 pacientes com obesidade e DHGNA

	Esteatose N=31 (80%)	EHNA N=8 (20%)	Valor de p
Sexo	Masculino 14 (45,1%)	3 (37,5%)	1,00*
	Feminino 17 (54,9%)	5 (62,5%)	
Idade (anos)	43,78 (95%IC 34,32-53,25)	35,48 (95%IC=32,0-38,9)	0,042*
Peso (kg)	120,01 (95%IC=103,6-136,6)	123,1 (95%IC=115,9-130,2)	0,650*
IMC (kg/m²)	42,2 (95%IC=28,5;45,9)	40,0 (95%IC=36,8-43,2)	0,428*
Tempo de Obesidade			
Entre 1 e 5 anos	1 (3,2%)	1 (12,5%)	0,762 [#]
Entre 5 e 10 anos	5 (16,1%)	1 (12,5%)	
Acima de 10 anos	25 (80,7%)	6 (75%)	
Ant familiar de Obesidade	21 (67,7%)	6 (75%)	0,524 [#]
HAS	23 (74,1%)	7 (87,5%)	0,368 [#]
Diabetes	9 (29%)	3 (37,5%)	0,526 [#]
Hipoglicemiante	11 (35,4%)	5 (62,5%)	0,635 [#]
Dislipidemia	19 (61,2%)	6 (75%)	0,478 [#]
SAOS	8 (25,8%)	4 (50%)	0,289 [#]
Esofagite	5 (16,1%)	6 (75%)	0,003 [#]
Hérnia hiatal	3 (9,6%)	1 (12,5%)	1,00 [#]
Gastrite	20 (64,5%)	4 (50%)	0,785 [#]

IMC: índice de massa corpórea; HAS: hipertensão arterial sistêmica; SAOS: síndrome da apneia obstrutiva do sono.

*Teste de Mann Whitney [#]Teste exato de Fischer ou Teste de Qui-quadrado de Pearson

Na tabela 3, encontram-se os dados laboratoriais dos pacientes estudados. Não houve diferença estatística nas transaminases, ferritina, glicemia de jejum, insulina e HOMA-IR (Modelo

para avaliação insulínica calculado através da fórmula insulina de jejum (mU/L) x glicose plasmática (mg/dl)/450) entre os grupos.

Tabela 3 – Dados laboratoriais dos 39 pacientes com obesidade e DHGNA

	Esteatose (N=31)	EHNA (N=8)	Valor de p
ALT (UI/ml)	32,21 (95%IC=23,00-41,42)	22,5 (95%IC=12,4-42,71)	0,105
AST (UI/ml)	34,8 (95%IC=27,41-63,62)	29 (95%IC= 15,29-58,71)	0,887
Ferritina (ng/ml)	272,40 (95%IC=154,2-497,14)	98,7 (95%IC= 64,4-258,58)	0,458
Glicose (mg/dl)	112,4 (95%IC=98,60-129,3)	92,5 (95%IC= 91,75-124,9)	0,725
Insulina (UI/ml)	16,34 (95%IC=11,31-18,25)	20,37 (95%IC= 5,99-34,97)	0,865
HOMA-IR	5,42 (95%IC=2,97-5,84)	5,62 (95%IC= 1,11-10,65)	0,556

ALT: Aspartato aminotransferase; AST: aspartato glutamiltransferase, HOMA-IR modelo de homeostase para avaliação de resistência Insulínica

As figuras 4 e 5 apresentam o Gráfico de escores e o Gráfico de pesos construídos a partir da separação das amostras nos grupos esteatose e esteatohepatite. O gráfico de pesos é capaz de mostrar os deslocamentos químicos mais importantes para discriminação entre os grupos e, pelos deslocamentos é possível consultando a base de dados metabolômicos HMDB (*Human Metabolome Database*) inferir quais seriam os metabólitos associados.

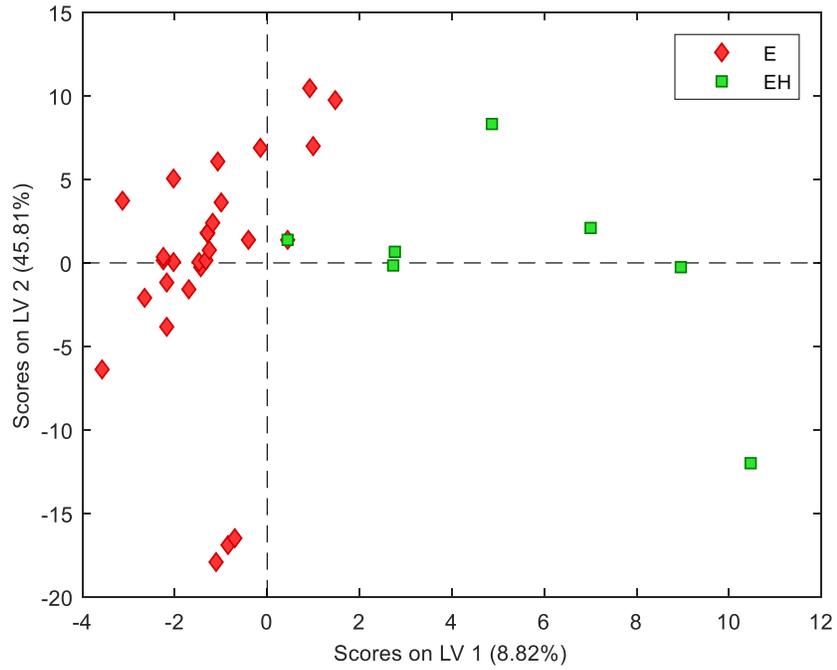


Figura 8. Gráfico de escores para separação das amostras em esteatose e esteatohepatite usando o Software Matlab 2015b
Legenda: E= Esteatose; EH= Esteatohepatite

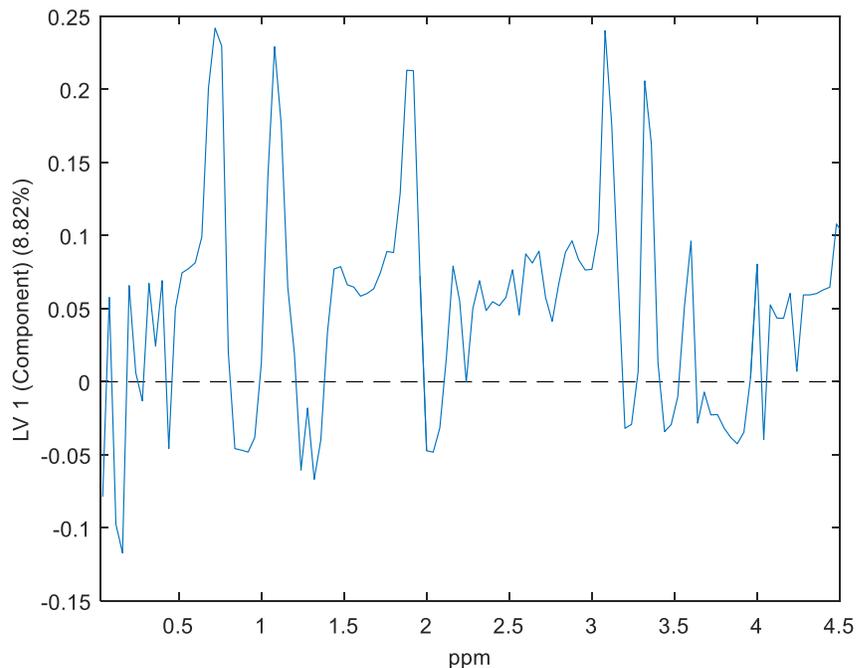


Figura 9. Gráfico de pesos para separação das amostras em esteatose e esteatohepatite usando o Software Matlab 2015b.
Legenda: Deslocamentos químicos (em ppm) correspondentes: lactato 1,33; glicose 3,24; glutamato 2,04, creatinina 3,04 e taurina 3,17.

Observa-se no gráfico de escores que a primeira componente é a responsável pela separação entre os grupos. Os sinais encontrados no gráfico de pesos provavelmente estão associados ao lactato, glicose, glutamato, creatinina e taurina. De acordo com este gráfico, os pacientes com esteatohepatite devem apresentar níveis mais elevados de glutamato e creatinina, enquanto os que estão com esteatose devem apresentar níveis mais elevados de lactato, glicose e taurina. O modelo foi validado por LOOCV e obteve-se um valor de R^2 igual a 0,75.

Foi construída uma tabela de contingência (Tabela 4), a partir da qual foi possível obter valores de acurácia, sensibilidade e especificidade iguais a 81,1%, 71,4% e 83,3%, respectivamente. Duas amostras foram excluídas do modelo, por não terem sido classificadas em nenhum dos grupos.

Tabela 4 - Tabela de contingência para modelo metabonômico Esteatose versus Esteatohepatite

	EH	E
	Modelo Metabonômico	
EH (Biópsia)	5	5
E (Biópsia)	2	25

7 DISCUSSÃO

No presente estudo, o emprego da análise metabonômica utilizando a espectroscopia de RMN¹H de amostras de soro foi capaz de diferenciar os pacientes com DHGNA que apresentavam esteatose simples dos que tinham esteatohepatite.

A prevalência de DHGNA na população geral é de 20%, podendo alcançar até 90% entre os indivíduos obesos (VERNON; BARANOVA; YOUNOSSI, 2011). Em nosso estudo, a prevalência de esteatohepatite foi igual a 20%. Esse número chamou atenção, por ser consideravelmente menor que o encontrado por outros autores, mesmo quando suas populações apresentavam média de IMC menor do que a que obtivemos (Tabela 5).

Cordeiro et al. (2013), ao analisar 47 pacientes no Serviço de Cirurgia Geral do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, encontrou esteatohepatite em 7 pacientes (25,6%), número mais próximo do da nossa amostra, o que pode refletir uma prevalência local ou um perfil diferente dos pacientes que se submetem à Cirurgia Bariátrica em nossos serviços.

Tabela 5 – Prevalência de esteatohepatite encontrada por diferentes autores e média de IMC em kg/m² de suas amostras

Autores	EHNA (%)	IMC (kg/m ²)
Presente estudo	20	42,2
Pulzi	40	19
Ong	37	26
Salgado Junior et al	89	38
Weingarten	58	46
Ribeiro	38	48
Mathurin	27	50
Mattar	31	56

Outra consideração diz respeito à própria definição histológica de esteatohepatite. A diretriz européia de Esteatohepatite Não-Alcoólica de 2016, sugere que o escore de atividade seja usado para definição de gravidade da doença e que o diagnóstico seja estabelecido pela avaliação patológica geral. A discussão entre patologistas considera que a diferenciação esteatose X

esteatohepatite foi assim estabelecida por sua relevância clínica, mas que essa divisão binária não abrange as mudanças complexas na história natural da doença.

Em relação às características clínicas dos pacientes, encontramos diferença significativa em relação à média de idade. Este achado ocorreu em estudo que realizou biópsias de forma longitudinal em pacientes com DHGNA (ADAMS et al., 2005). Os pacientes que apresentaram progressão da doença tiveram menor média de idade (44 anos), do que os que tiveram doença estável (47 anos) ou regressão (46 anos).

Sabe-se que marcadores isolados têm acurácia limitada para o diagnóstico de EHNA (PAPAGIANNI; SOFOGIANNI; TZIOMALOS, 2015). Níveis normais de ALT não excluem a presença de fibrose avançada ou cirrose, como também seus níveis não se correlacionam com a gravidade da fibrose. Outros marcadores simples, como a razão AST/plaquetas (APRI), também apresenta baixa acurácia (AUROC<0,60) (LOANEZA-DEL-CASTILHO et al., 2008).

Um dos biomarcadores mais estudados nos últimos anos, a CK 18, apesar de performance satisfatória em detectar esteatose, teve apenas acurácia moderada (AUROC=0,70-0,83) no diagnóstico de esteatohepatite (CUSI et al., 2014; JOKA et al., 2012). Além disso, a medida de CK18 tem acurácia limitada em distinguir estágios de fibrose (FELDSTEIN, 2010).

Em relação a estudos que empregaram metabonômica, Kalhan et al. (2011) analisaram 35 diabéticos (11 com esteatose e 24 com esteatohepatite) e 25 controles saudáveis utilizando espectrometria de massa. Neste estudo 92% dos indivíduos saudáveis foram corretamente separados dos que tinham DHGNA. Obteve-se uma maior taxa de erro na diferenciação entre esteatose e esteatohepatite, o que fez os autores considerarem não ser possível separá-los usando a estratégia metabolômica (esse estudo incluía identificação de metabólitos). Uma possível limitação foi o pequeno número de pacientes com esteatose, mas apontaram para metabólitos da glutatona, ácidos biliares e aminoácidos como potenciais marcadores diagnósticos.

Barr et al. (2011) avaliaram um grupo maior de pacientes (246 com esteatose e 131 com esteatohepatite) com cromatografia líquida/espectrometria de massa comparado à biópsia hepática, conseguindo acurácia de 82%, sensibilidade de 71% e especificidade 92%. Mais de 90% dos pacientes com DHGNA que não tinham esteatohepatite foram corretamente identificados e, essa alta acurácia do modelo em excluir a presença de esteatohepatite é

particularmente importante, considerando o fato que a maioria dos pacientes vistos na prática clínica dentro do espectro da doença não tem sua forma avançada.

Li et al (2011) utilizando a espectroscopia de RMN¹H, mas em camundongos (26 com esteatose e 6 com esteatohepatite) conseguiram encontrar quatro potenciais biomarcadores (glicose, lactato, glutamato/glutamina e taurina) que mostraram elevada capacidade discriminatória para DHGNA em diferentes estágios. Esses metabólitos também foram apontados em nosso estudo como possíveis discriminantes entre os pacientes com esteatos e esteatohepatite.

Nosso estudo encontrou acurácia de 81,1% do modelo metabonômico para diferenciar entre pacientes com DHGNA os que tinham esteatose dos que tinham EHNA. Outros biomarcadores, como CK-18 e adiponectina apresentaram acurácia de 70 a 85% (SANAL, 2015). O NASH test (modelo construído com múltiplas variáveis clínicas e laboratoriais) apresentou sensibilidade de 88%, especificidade de 50% e acurácia variando de 69 a 83% (ADAMS, 2001).

Reconhecemos que o estudo dos biomarcadores em DHGNA busca formas não invasivas de: (1) diferenciar DHGNA dos controles saudáveis (*screening*); (2) avaliar gravidade da esteatose; (3) distinguir entre EH e EHNA; (4) identificar a presença de fibrose. Acredita-se que a estratégia metabonômica é capaz de vencer limitações de marcadores únicos e consegue ser amplamente empregada em doenças complexas como a DHGNA, trazendo importante aplicação clínica para *screening*, diagnóstico, classificação e avaliação prognóstica dessa doença.

8 CONCLUSÕES

1. A metabonômica por espectroscopia de RMN¹H foi capaz de diferenciar os pacientes com esteatose dos que têm esteatohepatite não alcoólica na amostra de pacientes obesos estudada.
2. O modelo construído apresentou acurácia, sensibilidade e especificidade iguais a 81,1%, 71,4% e 83,3%, respectivamente.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, L. A. et al. **The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a population-based cohort study.** *Gastroenterology*, v.129, n.1, p.113-121, 2005.
- ADAMS, S. H. **Emerging perspective on essential amino acid metabolism in obesity and the insulin-resistant.** *Adv. Nutr.*, v.2, n.6, p.445-456, 2001.
- AKIRA K. et al. **LC-NMR identification of a novel taurine-related metabolite observed in ¹H NMR-based metabonomics of genetically hypertensive rats.** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Munster*, v.51, n.5, p. 1091-1096, abr. 2010.
- AKIRA, K. et al. **HNMR-based metabonomic analysis of urine from young spontaneously hypertensive rats.** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Munster*, v.46, n.3, p. 550-556, fev. 2008.
- AKIRA, K.; IMACHI, M.; HASHIMOTO, T. **Investigations into biochemical changes of genetic hypertensive rats using ¹H Nuclear Magnetic Resonance-Based Metabonomics.** *Hypertension Research, Tochigi*, v.28, p. 425-430, jun. 2005.
- ANGULO, P. et al. **The NAFLD fibrosis score: a noninvasive system that identifies liver fibrosis in patients with NAFLD.** *Hepatology, New York*, v.45, n.4, p. 846-854, abr. 2007.
- ARMSTRONG, M. J.; ADAMS, L. A.; CANBAY, A.; SYN, W. K. **Extrahepatic complications of nonalcoholic fatty liver disease.** *Hepatology, New York*, v.59, n.3, p. 1174-1197, mar. 2014.
- AZMI, J. et al. **Chemometric analysis of biofluids following toxicant induced hepatotoxicity: A metabonomic approach to distinguish the effects of 1-naphthylisothiocyanate from its products.** *Xenobiotica, Guildford*, v.35, n.8, p. 839-852, set. 2008.
- BARR, J. et al. **Obesity-dependent metabolic signatures associated with nonalcoholic fatty liver disease progression.** *Journal of Proteome Research*, v.10, n.6, p. 2797-2806, jun. 2011.
- BERTINI, I. et al. **Metabolomic NMR fingerprint to identify and predict survival of patient with metastatic colorectal cancer.** *Cancer Research, Philadelphia*, v.72, n. 1, p. 356-364, jan. 2012.

BEYOGLU, D.; IDLE, J. R. **The metabolomic window into hepatobiliary disease.** Journal of Hepatology, Geneva, vol. 59, n.4, p. 842-858, out. 2013.

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

BOURSIER, J. et al. An extension of STARD statements for reporting diagnostic accuracy studies on liver fibrosis tests: the Liver-Fibro STARD standards. **Journal of Hepatology**, Geneva, v. 62, n. 4, p. 807-815, abr. 2015.

BROWNING, J. D. et al. **Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity.** Hepatology, New York, v.40, n.6, p. 1387-1395, dez. 2004.

BYRNE, C. D.; TARGHER G. **NAFLD: A multisystem disease.** Journal of Hepatology, Geneva, v.62, n.1, p. S47-S64, abr. 2015.

CORDEIRO, L. et al. **Nonalcoholic steatohepatitis on preoperative period of gastric bypass: lack of correlation with degree of obesity.** Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva, São Paulo, v. 26, s.1, p. 39-42, 2013.

CRUZ, J. F. et al. **Prevalência e alterações ecográficas compatíveis com esteatose hepática em pacientes encaminhados para exame de ultrassonografia abdominal em Aracaju, SE.** Radiologia Brasileira, São Paulo, v.49, n. 1, jan-fev. 2016.

CUSI, K. et al. **Limited value of plasma cytokeratin-18 as a biomarker for NASH and fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease.** Journal of Hepatology, Geneva, v.60, n.1, p. 167-74, jan. 2014.

DIAB, D. L. et al. **Cytokeratin 18 fragment levels as a noninvasive biomarker for nonalcoholic steatohepatitis in bariatric surgery patients.** Clinical Gastroenterology and Hepatology, Houston, v.6, n.11, p. 1249-1254, nov. 2008.

DIETMAIR, S. et al. **Towards quantitative metabolomics of mammalian cells: development of a metabolite extraction protocol.** Analytical biochemistry, Bethesda, v.404, n.2, p. 155-164, set. 2010.

DOWMAN, J. K.; TOMLINSON, J. W.; NEWSOME, P. N. **Systematic review: the diagnosis and staging of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis.** *Alimentary Pharmacology Therapeutics*, London, v.33, n 5, p. 525-540, mar. 2011.

DUARTE, I. F.; DIAZ, S. O.; GIL, A. M. **NMR metabonomics of human blood and urine research.** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Munster, v.93, p. 17-26, mai. 2014.

DUMAS, M. E. et al. **Assessment of analytical reproducibility of ¹H NMR spectroscopy based metabonomics for large-scale epidemiological research: the INTERMAP Study.** *Analytical Chemistry*, Washington, v. 78, n.7, p. 2199-2208, mar. 2006.

DUNN, W. B. et al. **Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry.** *Nature Protocols*, London, v.6, n.7, p. 1060-1083, jun. 2011.

EKSTED, M. et al. **Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes.** *Hepatology*, New York, v.44, n.4, p. 865-873, out. 2006.

FELDSTEIN, A. E. et al. **Serum cytokeratin-18 fragment levels are useful biomarkers for nonalcoholic steatohepatitis in children.** *The American Journal of Gastroenterology*, Los Angeles, v. 108, p. 1526-1531, set. 2013.

FELDSTEIN, A. E.; NOBILI, V. **Biomarkers in nonalcoholic fatty liver disease: a new era in diagnosis and staging of disease in children.** *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, v.51, n.4, p.378-379, p.2010.

FERREIRA, V. S.; PERNAMBUCO, R. B.; LOPES, E. P. **Frequency and risk factors associated with non-alcoholic fatty liver disease in patients with type 2 diabetes mellitus.** *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, São Paulo, v.54, n.4, p. 362-368, jun. 2010.

FITZPATRICK, E.; DHAWAN, A. **Noninvasive biomarkers in non-alcoholic fatty liver disease: current status and a glimpse of the future.** *World Journal of Gastroenterology*, Pleasanton, v. 20, n31, p. 10851-10863, ago. 2014.

GINSBURG, G. S.; DONAHUE, M. P.; NEWBY, L. K. **Prospect for personalized cardiovascular medicine: The impact of genomics.** Journal of the American College of Cardiology, Washington, v.46, n.9, p. 1615-1627, nov. 2005.

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

HAUKELAND, J. W. et al. **Systemic inflammation in nonalcoholic fatty liver disease is characterized by elevated levels of CCL2.** Journal of Hepatology, Daubin, v. 44, n.6, p. 1167-1174, mar. 2006.

HOLLAND, N. T. et al. **Biological sample collection and processing for molecular epidemiological studies.** Mutation Research, Massachussetts, v. 543, n.3, p.217-234, jun. 2003.

HOLMES, C. E. et al. **Chemometric methods for toxicity classification based on NMR spectra of biofluids.** Chemical Research in Toxicology, Minnesota, v.13, n.6, p. 471-478, mai. 2000.

HOLMES, E. et al. **Development of a model for classification of toxin-induced lesions using ¹H NMR spectroscopy of urine combined with pattern recognition.** Nuclear Magnetic Resonance in Biochemistry, v. 11, n.4, p. 235-244, jun-ago. 1998.

HUI, J. M. et al. **High sensitivity C-reactive protein values do not reliably predict the severity of histological changes in NAFLD.** Hepatology, New York, v.39, n.5, p. 1458-1459, mai. 2004.

HUIa, J. M. et al. **Beyond insulin resistance in NASH: TNF-alpha or adiponectin?** Hepatology, New York, v.40, n.1, p. 46-54, jul. 2004.

ISSAQ, H. J. et al. **Analytical and statistical approaches to metabolomic research.** Journal of Separation Science, Weinheim, v. 32, n.13, p. 2183-2199, jul. 2009.

JARRAR, M. H. et al. **Adipokines and cytokines in non-alcoholic fatty liver disease.** Alimentary Pharmacology and Therapeutics, Medford, v.27, n.5, p. 412-421, mar. 2008.

- JOKA, D. et al. **Prospective biopsy-controlled evaluation of cell death biomarkers for prediction of liver fibrosis and nonalcoholic steatohepatitis.** *Hepatology*, v.55, n.2, p.455-464, 2012.
- KALHAN, S. C. et al. **Plasma metabolomic profile in nonalcoholic fatty liver disease.** *Metabolism*, v.60, n.3, p.404-413, 2011.
- KIRSCHENLOHR, H. L. et al. **Proton NMR analysis of plasma is a weak predictor of coronary artery disease.** *Nat. Med.*, v.12, n.6, p.705-710, 2006.
- KWOK, R. et al. **Systematic review with meta-analysis: Non-invasive assessment of non-alcoholic fatty liver disease- the role of transient elastography and plasma cytokeratin-18 fragments.** *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, Medford, v.39, n.3, p. 254-269, fev. 2014.
- LABORDE, C. M. et al. **Potential blood biomarkers for stroke.** *Expert Review of Proteomics*, Cambridge, v. 9, p.437-449, 2012.
- LENZ, E. M.; WILSON, I. D. **Analytical strategies in metabonomics.** *Journal of Proteome Research*, Washington, v.6, n.2, p. 443-458, dez. 2006.
- LI, S. et al. **Metabolomics study of alcohol-induced liver injury and hepatocellular carcinoma xenografts in mice.** *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, v. 24, 2011.
- LINDON, J. C.; HOLMES, E.; NICHOLSON, J. K. **So what's the deal with metabonomics?** *Analytical Chemistry*, Washington, v. 75, n. 17, p. 384A-391A, set. 2003.
- LOANEZA-DEL-CASTILHO, A. et al. **AST to platelet ratio index (APRI) for the noninvasive evaluation of liver fibrosis.** *Ann. Hepatol.*, v.7, n.4, p.350-357, 2008.
- MAKINEN, V. P. et al. **H NMR metabonomics approach to the disease continuum of diabetic complications and premature death.** *Molecular Systems Biology*, v.4, p. 167-179, fev. 2008.

MANCO, M. et al. **Correlation of serum TNF-alpha levels and histologic liver injury scores in pediatric nonalcoholic fatty liver disease.** American Journal of Clinical Pathology, Oxford, v.127, n.6, p. 954-960, jun. 2007.

MANNINA, L.; SOBOLEV, A. P.; CAPITANI, D. **Applications of NMR metabolomics to the study of foodstuffs.** Electrophoresis, Weinheim, v. 33, n.15, p. 2290-2313, ago. 2012.

MUSSO, G. et al. **Meta-analysis: natural history of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and diagnostic accuracy of non-invasive tests for liver disease severity.** Annals of Medicine, Helsinki, v.43, n.8, P. 617-649, dez. 2011.

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, London, v. 29, n.11, p. 1181-1189, nov. 1999.

ONG, J. P.; PITTS, A.; YOUNOUSSI, Z. M. **Increased overall mortality and liver-related mortality in non-alcoholic fatty liver disease.** Journal of Hepatology, Daubin, v.49, n.4, p. 608-612, out. 2008.

PAPAGIANNI, M.; SOFOGIANNI, A.; TZIOMALOS, K. **Non-invasive methods for the diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease.** World J. Hepatol., v. 7, n. 4, p. 638-648, 2015.

PEAKMAN, T. C.; ELLIOTT, P. **The UK Biobank handling and storage validation studies.** International Journal of Epidemiology, Oxford, v.37, n.2, p. 234-244, abr. 2008.

POWERS, R. **NMR metabolomics and drug discovery.** Magnetic Resonance in Chemistry, Medford, v. 47, n.1, p. S2-S11, dez. 2009.

RAPPAPORT, S. M. **Implications of the exposome for exposure science.** Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology, New York, v.21, n.1, p. 5-9, jan-fev. 2011.

RATZIU, V. et al. **Sampling variability of liver biopsy in Nonalcoholic Fatty Liver Disease.** Gastroenterology, Philadelphia, v.128, n.7, p. 1898-1906, jun. 2005.

ROBERTSON, D. G. **Metabonomics in toxicology: A review.** Science, Washington, v. 85, n.2, p. 809-822, jun. 2005.

SANAL, N. G. **Biomarkers in nonalcoholic fatty liver disease-the emperor has no clothes?** World Journal of Gastroenterology, Pleasanton, v.21, n.11, p. 3223-3231, mar. 2015.

SAUDE, E.; SYKES, B. **Urine stability for metabolomic studies: effects of preparation and storage.** Metabolomics, v.3, n.1, p. 19-27, mar. 2007.

SCHRIPSEMA J. **Application of NMR in plant metabolomics: Techniques, problems and prospects.** Phytochemical Analysis, Medford, v.21, n, 1, p. 14-21, jan-fev. 2010.

SHYUR, L. F.; YANG, N. S. **Metabonomics for phytomedicine research and drug development.** Current Opinion in Chemical Biology, v.12, n.1, p. 66-71, fev. 2008.

SILVA, R. O. **A espectroscopia de RMN como ferramenta elucidativa: estruturas moleculares, mecanismos de reação e metabonômica.** 229 f. 2010. Tese. Pós-Graduação em Química (Universidade Federal de Pernambuco). Recife, 2010.

SOLANKY, K. S. et al. **Application of biofluid ^1H nuclear magnetic resonance-based metabonomics techniques for the analysis of the biochemical effects of dietary isoflavones on human plasma profile.** Analytical Biochemistry, v. 323, p. 197-204, 2003.

SUMNER, L. W.; MENDES, P.; DIXON, R. A. **Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era.** Phytochemistry, v.62, n. 6, p. 817-836, mar. 2003.

SUN, C.; FAN, J. G.; QIAO, L. **Potential Epigenetic Mechanism in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease.** International Journal of Molecular Sciences, Basel, v. 16, n.3, p. 5161-5179, mar. 2015.

TAKAKI, A.; KAWAI, D.; YAMAMOTO, K. **Multiple hits, including oxidative stress, as pathogenesis and treatment target in non-alcoholic steatohepatitis (NASH).** International Journal of Molecular Sciences, Basel, v.14, n.10, p. 20704-20728, out. 2013.

TARGHER G. **Relationship between high-sensitivity C-reactive protein levels and liver histology in subjects with non-alcoholic fatty liver disease.** Journal of Hepatology, Daubin, v.45, n.6, p. 879-881, dez. 2006.

TEAHAN O. et al. **Impact of analytical bias in metabonomic studies of human blood serum and plasma.** Analytical Chemistry, Washington, v.78, n.13, p. 4307-4318, jul. 2006.

TEAHAN, O. et al. **Impact of analytical bias in metabonomic studies of human blood serum and plasma.** Anal Chem., v.78, n.13, p.4307-4318, 2006.

TUCK, M. K. et al. **Standard operating procedures for serum and plasma collection: early detection research network consensus statement standard operating procedure integration working group.** Journal of Proteome Research, Washington, v.8, n.1, p.113-117, jan. 2009.

VERNON, G.; BARANOVA, A.; YOUNOSSI, S. M. **Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults.** Alimentary Pharmacology and Therapeutics, Medford, v. 34, n.3, p. 274-285, ago. 2011.

WATERS, N. J. et al. **NMR and pattern recognition studies on the time related metabolic effects of alfa-naphthylisothiocyanate on liver, urine and plasma in the rat: an integrative metabonomic approach.** Chemical Research in Toxicology, Minnesota, v. 14, n.10, p. 1401-1412, out. 2001.

WIECKOWSKA, A. et al. **In vivo assessment of liver cell apoptosis as a novel biomarker of disease severity in nonalcoholic fatty liver disease.** Hepatology, New York, v.44, n.1, p. 27-33, jul. 2006.

WISHART, D. S. **Metabolomics: applications to food science and nutrition research.** Trends in Food Science & Technology, v.19, n.9, p. 482-493, set. 2008.

WU, D.; ZHU, B.; WANG, X. **Metabonomics-based omics study and atherosclerosis.** J. Clin. Bioinforma., 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3222604/>>. Acesso em: 12/06/2017.

XIA, J. et al. **Translational biomarker discovery in clinical metabolomics: an introductory tutorial.** Metabolomics, v.9, n.2, p. 280-299, abr. 2013.

YIN, P. et al. **Preanalytical aspects and sample quality assessment in metabolomic studies of human blood.** *Clinical Chemistry*, v.59, n.5, p. 833-845, mai. 2013.

ZHANG, A. et al. **Recent and potential developments of biofluid analyses in metabolomics.** *Journal of Proteomics*, v.75, n.4, p. 1079-1088, fev. 2012.

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO EM ESTUDO CLÍNICO

Título: Diferenciação entre esteatose e esteatohepatite não-alcoólica usando metabonômica

Investigador Principal: Dra. Moara Maria Silva Cardozo

Orientadores: Dr. Edmundo Lopes e Dr. Ricardo Oliveira

Unidade: Av. Prof. Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50670-901, Tel.: 2126 8588

Você está sendo convidado (a) para participar de uma pesquisa cujo título é: **Diferenciação entre esteatose e esteatohepatite não-alcoólica usando metabonômica**

O objetivo do projeto é avaliar substâncias que possam ser identificadas no sangue para diferenciar a forma simples da esteatose hepática (só gordura no fígado) da esteatohepatite (onde se tem gordura e inflamação). Enquanto a primeira tem um curso mais benigno, a segunda pode evoluir para cirrose e câncer de fígado.

A amostra de sangue vai ser estudada no Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco, por uma técnica chamada Metabonômica, que através de um aparelho de Ressonância consegue estudar componentes do metabolismo presentes no sangue. A idéia é que no futuro, não seja mais preciso realizar biópsia de fígado para descobrir essa doença, e que possamos fazer isso através de um exame de sangue.

Estou ciente de que esta avaliação será realizada através da retirada de um diminuto fragmento do meu fígado, durante a cirurgia a qual serei submetido, e analisado posteriormente por um grupo de profissionais especializados.

Ao participar dessa pesquisa, além do benéfico natural da própria cirurgia, proporcionando perda de peso, controle do diabetes e das outras doenças associadas ao peso, você estará participando de uma pesquisa cujo resultado proporcionará um melhor entendimento sobre a relação da doença hepática gordurosa não alcoólica em pessoas com diabetes mellitus tipo II e sobrepeso (IMC 25-30kg/m²) ou obesidade (IMC > 30Kg/m²).

Também não podem ser excluídos os riscos relacionados com a retirada desse pequeno fragmento do fígado, como sangramento, que pode ser prontamente resolvido durante a cirurgia a qual estarei sendo

submetido sem causar grandes repercussões, e dor no local da punção, geralmente de leve intensidade, que também pode ser tratada com medicações durante a recuperação da cirurgia realizada.

Entendo que minha participação neste estudo específico é inteiramente voluntária e não é, de forma alguma, condição para que receba qualquer outro tratamento médico nesta instituição.

Eu serei informado de qualquer alteração no estudo ou qualquer nova observação pertinente ao mesmo. Estou ciente que os médicos que estão conduzindo este estudo são capacitados e bem treinados, de forma a me oferecer os maiores benefícios possíveis. Todos os dados da minha participação neste estudo serão documentados e mantidos confidencialmente e estarão armazenados no computador pessoal da pesquisadora responsável, sendo disponíveis apenas para as autoridades de saúde e minha pessoa.

Como minha participação é voluntária, posso abandonar o estudo a qualquer momento, sem que isso resulte em qualquer penalidade ou perda de meus direitos nesta instituição. Não receberei compensação financeira por eventuais injúrias que possam me ocorrer, mas não me privo de meus direitos legais agindo desta forma.

Se eu tiver qualquer dúvida ou perguntas relativas a este estudo ou aos meus direitos, no que diz respeito à minha participação, ou ainda se quiser relatar eventos adversos, posso contatar a **Dra. Moara Cardozo através do telefone (81) 99731157, correio eletrônico: moaramsc@hotmail.com**. O presente projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da UFPE (Hospital das Clínicas – Universidade Federal de Pernambuco. Av. Da Engenharia, s/n, 1º andar, Cidade Universitária, Recife- PE. CEP: 50740-600. Fone: 21268588

As informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação. Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar sua identificação.

Eu concordo em seguir as instruções das pessoas que estão conduzindo e monitorizando este estudo, de forma a obter o máximo de benefícios da atenção médica oferecida por esta pesquisa.

Recife, ____ de _____ de _____

Assinatura do pesquisador

Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa e concordo em participar.

Assinatura do paciente ou responsável

Testemunha 1: _____

Testemunha 2: _____

APÊNDICE B – PROTOCOLO COLETA DE DADOS**1. Identificação:**

A. Nome: _____

B. Número do Registro: _____

C. Endereço: _____

D. Telefones de contato:

1. (____) _____ 2. (____) _____

E. Idade: _____ anos Data nascimento: ____/____/19____

F. GÊNERO: M F

G. Profissão: _____

H. Estado Civil : H1.Casado H2.Solteiro H3.viúvo H4.divorciado H5 OUTRO**2. Dados da cirurgia:**

A. Tipo de Cirurgia:

 Derivação gástrica em Y Rouxa1.com anel a2. sem anel Gastroplastia Vertical

C. Data da Cirurgia: ____/____/____

3. História do Sobrepeso/ obesidade:A1. <2 anos 2-5 anos 5-10 anos > 10 anos

B. História Familiar de sobrepeso/ obesidade: Pai Mãe Irmãos Tios Outros _____

4. Antecedentes Pessoais:

B. Doenças associadas:

B1.HAS? Sim Não. Quais medicações: _____

B2.Dislipidemia? Sim Não. Quais medicações: _____

B3.Doença coronariana? Sim Não. Quais medicações: _____

B4.Dores articulares? Sim Não

Qual? joelhos tornozelos coluna outros _____

B5. Apneia do sono? Sim Não

B6. EDA: Esofagite Hérnia Hiatal Gastrite

Ultrassonografia: Esteatose Hepática Classificação: _____

Colelitíase Sim Não

Outros? _____

C. História de doença hepática:

C1. Hemotransfusão? Sim Não

C2. História de Hepatite? Sim Não

Se sim, qual? A B C (curado? sim não)

C3. História familiar de d. Hepática? Sim Não

Qual: _____

C4. Ingesta alcoólica? Sim Não

Qual bebida? _____

Quantidade: copos? _____ garrafas? _____

Qual frequência? Dias/ semana: _____

Obs: ver tabela para calcular gramas de álcool/semana.

Mulheres: > 70g/semana? Sim Não

Homens: > 140g/semana? Sim Não

E. Diabetes? Sim Não

E1. Tempo de diabetes antes da cirurgia: <1 ano 1a 5 anos >10 anos

E2. Medicações: () Oral () Insulina () Nenhuma

E3. Tempo do hipoglicemiante: _____ anos. Qual (is)? _____

E4. Uso de Insulina? Sim Não

E5. Tempo de uso de insulina antes da cirurgia: <1 ano 1a 5 anos >10 anos

E6. Dose insulina diária: _____

E7. Diabetes (Familiar): () Pais () Avós () Irmãos () Tios () Primos

F. Tabagismo : sim não

G. Se Gênero feminino: uso de anticoncepcional oral? Sim Não. Qual _____

H. Outra doença associada? Sim Não Qual? _____

5. EXAME FÍSICO:

Peso : _____ (Kg) Altura: _____ (cm) IMC: _____ Kg/m²

Circunferência abdominal: _____ cm Circunf. quadril _____

PA: _____

6. Tabela de Exames Complementares

DATA DA COLETA				
Glicemia jejum				
Hb glicada				
AST				
ALT				
FA				
GGT				
Bilirrubina Total				
BD/BI				
Colest. Total				
C-HDL				
C-LDL				
Triglicerídeos				
Albumina sérica				
INR				
Ferritina				
Ferro sérico				
Insulina sérica				
PCR				

APÊNDICE C – BIÓPSIA HEPÁTICA

NOME do paciente: _____ REG. _____

No. Lâmina _____ Página do livro: _____

Resultado:

7.1 CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS DA ESTEATO-HEPATITE

GRAU		0	1	2	3
Esteatose Macrovesicular					
Esteatose Microvesicular					
Esteatose Pura					
Degeneração em Balão					
Inflamação lobular					
	PMN				
	Linfócito				
	Lipogranulomas				
Inflamação trato portal					
	PMN				
	LMN				
Corpúsculos Mallory					
Núcleo Glicogenado					
Fibrose					
	Perisinusoidal				
	Portal				
	Fibrose septal				
Cirrose		S		N	

DHGNAGrau I Grau II Grau III Grau IV **FIBROSE**Grau I Grau II Grau III **PERISINUSOIDAL**

- 0- não tem
- 1- 1/3 da zona 3
- 2- 2/3 da zona 3
- 3- + 2/3 da zona 3

PORTAL

- 0- Nenhuma
- 1- Até o trato portal
- 2- F. periportal
- 3- F. ponte com arquitetura nodular

FIBROSE EM PONTE

- 0- não tem
- 1- pouca
- 2- maior que 1 cm
- 3- fibrose em ponte com arq. nodular

<i>Gradação Necroinflamatória da Esteatohepatite</i>	
GRAU I:	Esteatose predominantemente macrovesicular em + de 50%
	Hepatócitos balonados ocasionais
	PMN lobular com ou sem linfócitos
	Inflamação crônica leve
GRAU II:	Esteatose qualquer grau
	Muitos hepatócitos balonados na zona 3
	PMN lobular com ou sem fibrose pericelular na zona 3
GRAU III:	Esteatose periacinar
	Baloneamento com desarranjo óbvio pp// em zona 3
	PMN associado a hepatócitos em balão
	Inflamação crônica leve a moderada

Fonte: Neushwander-Tetri & Caldwell. Non Alcoholic Steatohepatitis: summary of an AALSD - Single topic conference. Hepatology, 2003; 17(5):1202-19.

APÊNDICE D – ARTIGO ORIGINAL

Diferenciação entre esteatose e esteatohepatite não alcoólica através da metabonômica

Resumo

Introdução A Doença Hepática Gordurosa Não-Alcoólica (DHGNA) é a causa mais comum de Doença Hepática Crônica nos países ocidentais e há interesse crescente em métodos não invasivos para seu diagnóstico. A metabonômica pode ser definida como a medida quantitativa da resposta metabólica dinâmica dos sistemas vivos à estímulos fisiopatológicos ou modificação genética e pode ser uma boa opção para diferenciação dentre os espectros de apresentação/gravidade da DHGNA. **Objetivo** Diferenciar os pacientes com esteatose dos que tem esteatohepatite não-alcoólica usando a análise metabonômica através de Ressonância Magnética Nuclear H^1 (RMN 1H) de amostras de soro de pacientes submetidos à cirurgia bariátrica. **Métodos** Os espectros de RMN 1H dos dois grupos (esteatose e esteatohepatite) foram comparados e através de análise estatística multivariada no software Matlab 2015b realizou-se a classificação das amostras. **Resultados** Foram incluídos 39 pacientes, sendo 80% (31) com esteatose e 20% (8) com esteatohepatite. Para o diagnóstico de esteatohepatite, a análise metabonômica apresentou exatidão, sensibilidade e especificidade iguais a 81,1%, 71,4% e 83,3%, respectivamente. **Conclusão** A análise metabonômica de espectros de RMN 1H foi capaz de diferenciar pacientes com esteatose dos que tem esteatohepatite não-alcoólica com boa acurácia.

Palavras-chave: metabonômica, DHGNA, RMN 1H

Introdução A Doença Hepática Gordurosa Não-Alcoólica (DHGNA) é a causa mais comum de Doença Hepática Crônica nos países ocidentais (BYRNE, 2015). Se apresenta não como uma doença única, mas sim abrange um espectro de estágios dentro de sua história natural. Inicialmente há o acúmulo excessivo de gordura no fígado, denominado esteatose simples. Cerca de 30 a 40% desses pacientes evoluem para esteatohepatite, onde além da esteatose hepática há inflamação ou injúria hepatocelular (EKSTED, 2006).

Descrever a patogênese dessa condição é ainda encontrar mecanismos não completamente compreendidos, como o porquê de alguns pacientes seguirem apenas com esteatose e outros cursarem com esteatohepatite e posteriormente cirrose. Na bem reconhecida teoria dos “*two-hits*”, a primeira injúria é o acúmulo de triglicerídeos nos hepatócitos, seguido por uma segunda injúria na qual mediadores inflamatórios causam lesão hepatocelular, inflamação e fibrose (SUN; FAN; QIAO, 2015). Estudos realizados nos últimos anos têm descrito novo modelo em que múltiplas agressões paralelas podem ser responsáveis pela DHGNA (TAKAKI, 2013).

Paralelo à tentativa de melhor compreender os mecanismos fisiopatológicos da DHGNA estão os esforços de se encontrar maneiras acuradas de diferenciar esteatose de esteatohepatite. Atualmente, a única forma de diferenciar essas duas fases da história natural da doença gordurosa é através da biópsia hepática (SANAL, 2015). Esse método, além de invasivo, tem alto custo, está sujeito a erros de amostragem e apresenta mortalidade de 0,01 a 2% relacionada ao próprio procedimento (RATZIU et al., 2005).

Diante das claras limitações do atual padrão-ouro para diferenciação entre esteatose e esteatohepatite, vários métodos menos invasivos (potenciais biomarcadores) têm sido estudados, incluindo marcadores de inflamação, apoptose de hepatócitos, fibrose e estresse oxidativo.

Encontra-se pelo menos três abordagens que tem sido usadas e testadas nessa busca de biomarcadores para DHGNA (FITZPATRICK; DHAWAN, 2014). A primeira é o uso de dados clínicos ou bioquímicos que tenham sido derivados de grandes estudos de associação (exemplo: índice de massa corpórea, resistência à insulina). A segunda abordagem é o uso de algoritmos, incluindo marcadores de inflamação/morte celular, gerados pelos conhecimentos da fisiopatologia da doença. A terceira abordagem, na qual se inclui o presente estudo, é baseada em novas tecnologias não guiadas por hipóteses, como a metabonômica.

Com a emergência das tecnologias “ômicas”, a possibilidade de medir e usar múltiplos biomarcadores simultaneamente para diagnosticar doenças tem despertado a atenção de muitos pesquisadores. A ideia é que combinando dois ou mais marcadores seja possível gerar diagnósticos mais acurados ou distinguir melhor duas condições. Fundamentalmente, o objetivo do desenvolvimento de biomarcadores na metabonômica é criar um modelo preditivo baseado em múltiplos componentes, que possa ser usado para classificar novos sujeitos em grupos específicos (ex. saudáveis versus doentes) com boa sensibilidade e especificidade (XIA et al., 2013).

A metabonômica é definida como a medida quantitativa da resposta metabólica dinâmica dos sistemas vivos à estímulos fisiopatológicos ou modificação genética (NICHOLSON, 1999). Fundamenta-se em um princípio básico dos seres vivos chamado de homeostase (LINDON, 2003). Quando um organismo vivo é exposto a situações de estresse ele responde no sentido de neutralizar a ação externa. Com isso, ocorrem mudanças na concentração e no fluxo dos metabólitos endógenos na busca de manter o meio interno estável.

Essa alteração no perfil dos metabólitos endógenos presentes nos biofluidos pode ser avaliada através da espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear H^1 (RMN 1H), resultando em uma “impressão digital” metabólica, a qual é específica da natureza ou sítio da agressão (COEN, 2008). Admite-se que a partir dos espectros de RMN 1H seja possível identificar e quantificar os metabólitos de baixo peso molecular presentes no biofluido (LENZ, 2007).

O emprego dessa estratégia representa uma mudança de paradigma na análise clínica, migrando de um sistema que visa determinar o teor (concentração absoluta) de certas substâncias, biomarcadores específicos, para um sistema no qual inicialmente identificam-se perfis espectrais associados ao objeto de investigação, podendo-se identificar os metabólitos endógenos envolvidos nessas alterações.

Houveram poucos estudos metabonômicos que avaliaram a fisiopatologia da esteatohepatite e sua progressão desde a esteatose (Beyoglu, 2013). Quando uma pequena série de pacientes com esteatohepatite foi comparada com uma de esteatose, mudanças significantes nas concentrações séricas de apenas três fosfolípidos foram relatadas (Barr, 2010). Um estudo usando RNM encontrou concentrações aumentadas de glicose, glutamato e taurina (Wu; Zhu; Wang, 2011).

Objetivo

Diferenciar pacientes com esteatose dos que apresentam esteatohepatite não alcoólica através da análise metabonômica utilizando a espectroscopia de RMN¹H em amostras de soro.

Métodos

Desenho do estudo Realizou-se estudo de acurácia, comparando a metabonômica à biópsia hepática (padrão-ouro) na diferenciação entre esteatose e esteatohepatite não alcoólica.

População alvo Pacientes obesos submetidos à cirurgia entre novembro de 2015 e abril de 2016.

Crítérios de inclusão Dentro da população descrita, foram incluídos os pacientes que preencheram os seguintes critérios:

- (1) idade maior que 18 anos;
- (2) consumo de álcool menor que 20 gramas/dia para mulheres e 30 gramas/dia para homens.

Crítérios de exclusão Foram excluídos os pacientes que referiam história de doença hepática induzida por vírus ou drogas que pudessem provocar DHGNA.

Etapas e método de coleta dos dados

Etapa 1 – Os pacientes obesos com indicação médica de serem submetidos à cirurgia bariátrica foram informados sobre os objetivos e etapas do estudo e, após concordância, realizado exame físico e preenchimento de questionário.

Etapa 2 – Coletado sangue dos pacientes em jejum, antes da indução anestésica. A amostra foi centrifugada e o soro estocado em -80° C até análise.

Etapa 3 – Obtenção de fragmento de tecido hepático (biópsia hepática no intra-operatório). O material era fixado em formol e posteriormente encaminhado à patologista, que usou o Escore de Atividade DHGNA.

Etapa 4 – Amostras de soro foram analisadas usando a espectroscopia de RMN¹H e posteriormente análise estatística.

Os espectros de RMN¹H foram obtidos através do espectrômetro Varian Unit Plus (Varian NMR) operando a 300 MHz, utilizando tubos de 5mm de diâmetro interno. Às amostras de 400 µL de soro foram adicionados 200 µL de clorofórmio deuterado (D₂O). Após homogeneização, o espectro de RMN¹H foi obtido, utilizando uma sequência de pulsos com pré-saturação do sinal da água.

Os dados dos espectros de RMN¹H foram transportados para o MestreNova Software versão 9.0. Foi construída uma matriz com 40 linhas (casos) e 175 variáveis (deslocamentos químicos) dispostas em colunas. Na plataforma Matlab 2015b foram feitos os modelos metabonômicos baseados em PCA e PLS-DA.

Resultados

Dentre os pacientes estudados, 31 (80%) apresentavam esteatose e 8 (20%) esteatohepatite.

Dentre as características clínicas, houve diferença estatística na variável média de idade, e esofagite de refluxo (Tabela 1).

Tabela 1- Características clínicas dos 39 pacientes com obesidade e DHGNA

	Esteatose N=31 (80%)	EHNA N=8 (20%)	p value
Sexo	Masculino 14 (45,1%)	3 (37,5%)	1,00*
	Feminino 17 (54,9%)	5 (62,5%)	
Idade (anos)	43,78 (95%IC 34,32-53,25)	35,48 (95%IC=32,0-38,9)	0,042*
Peso (kg)	120,01 (95%IC=103,6-136,6)	123,1 (95%IC=115,9-130,2)	0,650*
IMC (kg/m²)	42,2 (95%IC=28,5;45,9)	40,0 (95%IC=36,8-43,2)	0,428*
Tempo de Obesidade			
Entre 1 e 5 a	1 (3,2%)	1 (12,5%)	0,762 [#]
>5 <=10 a	5 (16,1%)	1 (12,5%)	
Acima de 10 anos	25 (80,7%)	6 (75%)	
Ant familiar de Obesidade	21 (67,7%)	6 (75%)	0,524 [#]
HAS	23 (74,1%)	7 (87,5%)	0,368 [#]
Diabetes	9 (29%)	3 (37,5%)	0,526 [#]
Hipoglicemiante	11 (35,4%)	5 (62,5%)	0,635 [#]

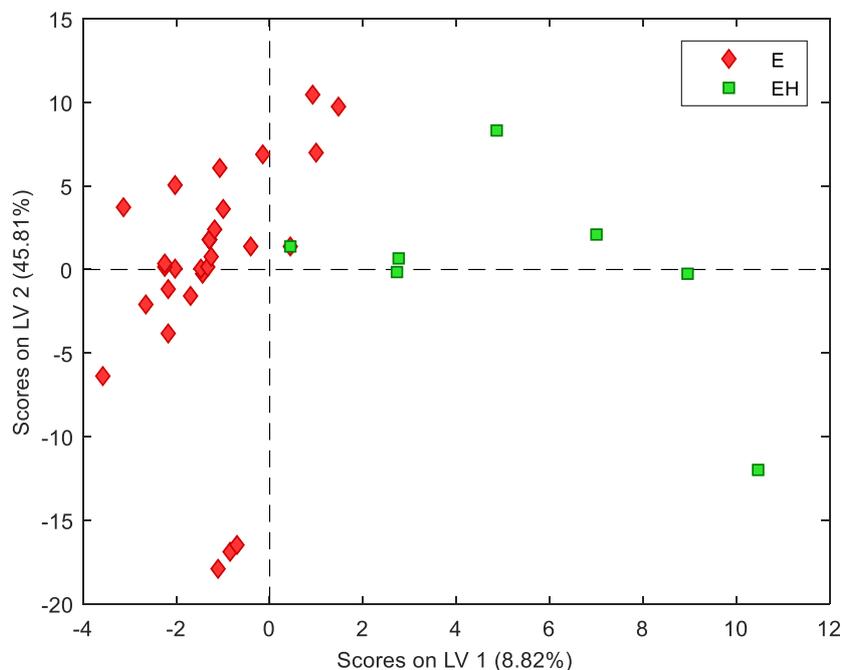
Dislipidemia	19 (61,2%)	6 (75%)	0,478 [#]
SAOS	8 (25,8%)	4 (50%)	0,289 [#]
Esofagite	5 (16,1%)	6 (75%)	0,003 [#]
Hérnia hiatal	3 (9,6%)	1 (12,5%)	1,00 [#]
Gastrite	20 (64,5%)	4 (50%)	0,785 [#]

IMC: índice de massa corpórea; HAS: hipertensão arterial sistêmica; DAC: doença arterial coronariana; SAOS: síndrome da apneia obstrutiva do sono. *Teste de Mann Whitney de comparação de médias [#]Teste exato de Fischer ou Teste de Qui-quadrado de Pearson

Com relação à função hepática, ferritina e glicemia não houve diferença estatística entre os grupos.

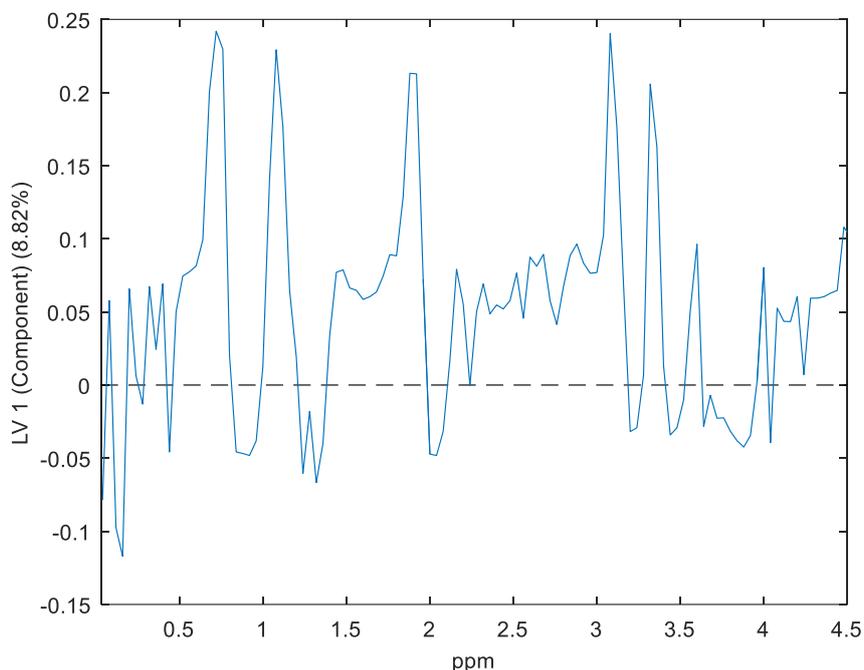
As figuras 1 e 2 apresentam o Gráfico de escores e o Gráfico de pesos construídos a partir da separação das amostras nos grupos esteatose e esteatohepatite.

Figura 1 - Gráfico de escores para separação das amostras em esteatose e esteatohepatite usando o Software Matlab 2015b



E= Esteatose; EH= Esteatohepatite

Figura 2 - Gráfico de pesos para separação das amostras em esteatose e esteatohepatite usando o Software Matlab 2015b



Observa-se no gráfico de escores que a primeira componente é a responsável pela separação entre os grupos. Os sinais encontrados no gráfico de pesos provavelmente estão associados ao lactato, glicose, glutamato, creatinina e taurina. De acordo com este gráfico, os pacientes com esteatohepatite devem apresentar níveis mais elevados de glutamato e creatinina, enquanto os que estão com esteatose devem apresentar níveis mais elevados de lactato, glicose e taurina. O modelo foi validado por LOOCV e obteve-se um valor de R^2 igual a 0,75.

Foi construída uma tabela de contingência (Tabela 2), a partir da qual foi possível obter valores de exatidão, sensibilidade e especificidade iguais a 81,1%, 71,4% e 83,3%, respectivamente.

Tabela 2 - Tabela de contingência para modelo metabonômico Esteatose versus Esteatohepatite

	Modelo Metabonômico	
EH (Biópsia)	5	5
E (Biópsia)	2	25

Discussão

No presente estudo, empregamos a análise metabonômica de espectros de RMN¹H de amostras de soro que foi capaz de diferenciar os pacientes com esteatose dos que têm esteatohepatite.

Em nossa amostra, a prevalência de esteatohepatite foi de 20%. Esse número chamou atenção, por ser consideravelmente menor que o que foi encontrado por outros autores, mesmo quando suas populações apresentavam média de IMC menor que a que obtivemos. Considerando a doença hepática gordurosa não alcoólica, a prevalência na população geral é de 20%, mas pode alcançar até 90% entre os obesos.

Cordeiro, em 2013, ao analisar 47 pacientes no Serviço de Cirurgia Geral do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, encontrou esteatohepatite em 7 pacientes (25,6%), número mais próximo do da nossa amostra, o que pode refletir uma prevalência local ou um perfil diferente dos pacientes que se submetem à Cirurgia Bariátrica em nossos serviços.

Outra consideração diz respeito à própria definição histológica de esteatohepatite. A diretriz europeia de Esteatohepatite Não-Alcoólica de 2016, sugere que o escore de atividade seja usado para definição de gravidade da doença e que o diagnóstico seja estabelecido pela avaliação patológica geral. A discussão entre patologistas considera que a diferenciação esteatose X esteatohepatite foi assim estabelecida por sua relevância clínica, mas que essa divisão binária não abrange as mudanças complexas na história natural da doença.

Kalhan et al (2011) analisaram 35 diabéticos (11 com esteatose e 24 com esteatohepatite) e 25 controles saudáveis usando espectrometria de massa, e 92% dos sujeitos foram corretamente separados dos indivíduos com DHGNA. A taxa de erro foi maior na diferenciação esteatose e esteatohepatite, o que fez os autores considerarem não ser possível separá-los usando o perfil metabolômico (esse estudo incluía identificação de metabólitos). Uma possível limitação foi o pequeno número de pacientes com esteatose, mas já se apontaram para metabólitos da glutatona, ácidos biliares e aminoácidos como potenciais marcadores diagnósticos.

Barr et al (2012) avaliaram um grupo maior de pacientes (246 com esteatose e 131 com esteatohepatite) com cromatografia líquida/espectrometria de massa,

conseguiu acurácia de 82%, sensibilidade de 71% e especificidade 92%. Mais de 90% dos pacientes com DHGNA que não tinham esteatohepatite foram corretamente identificados e, essa alta acurácia do modelo em excluir a presença de esteatohepatite é particularmente importante, considerando o fato que a maioria dos pacientes vistos na prática clínica dentro do espectro da doença não tem sua forma avançada.

Li et al (2011) também utilizaram RMN¹H, mas em camundongos (26 com esteatose e 6 com esteatohepatite) e conseguiu encontrar quatro potenciais biomarcadores (glicose, lactato, glutamato/glutamina e taurina) que mostraram alta capacidade discriminatória para DHGNA em diferentes estágios dos ratos saudáveis. Esses metabólitos encontrados por Li et al foram os mesmos descritos por nós em soro humano.

É notável o interesse na descoberta de um biomarcador capaz de substituir a biópsia hepática na avaliação dos estágios da DHGNA e até o momento, o mais promissor pareceu ser a citoqueratina 18 (CK-18). Em um estudo, a CK-18 mostrou acurácia de 93% na diferenciação esteatose x esteatohepatite, mas com apenas 21 pacientes nesse segundo grupo e esse marcador falhou quando empregado em uma população maior (de 318 pacientes). Isso aponta para a importância da estratégia metabonômica (e suas vantagens em relação a biomarcadores únicos) na análise não invasiva de uma doença complexa como a DHGNA.

O pequeno número da amostra foi um fator limitante e aumentar o número de casos possivelmente traria melhores resultados.

Conclusão A análise metabonômica utilizando a espectroscopia de RMN¹H, quando comparada à biópsia hepática, foi capaz de diferenciar pacientes com esteatose dos que tem esteatohepatite não-alcoólica com boa acurácia.

Referências

- Barr J. et al. Obesity-dependent metabolic signatures associated with nonalcoholic fatty liver disease progression. *Journal of Proteome Research*, v.10, n.6, p. 2797-2806, jun. 2011.
- Beyoglu, D, Idle JR. The metabolomic window into hepatobiliary disease. *Journal of Hepatology*, Geneva, vol. 59, n.4, p. 842-858, out. 2013.
- Byrne CD, Targher G. NAFLD: A multisystem disease. *J Hepatol* 2015; 62: S47-S64.

- Coen M, Holmes E, Lindon JC, Nicholson JK. NMR-based metabolic profiling and metabonomic approaches to problems in molecular toxicology. *Chem Res Toxicol*. 2008; 21: 9-27.
- Cordeiro L. et al. Nonalcoholic steatohepatitis on preoperative period of gastric bypass: lack of correlation with degree of obesity. *Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva, São Paulo*, v. 26, s.1, p. 39-42, 2013.
- Eksted M, Franzen LE, Mathiesen UL, Thorelies L et al. Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes. *Hepatology* 2006; 44: 865-873.
- Fitzpatrick E, Dhawan A. Noninvasive biomarkers in non-alcoholic fatty liver disease: current status and a glimpse of the future. *World J Gastroenterology* 2014; 31: 10851-10863.
- Kalhan SC. et al. Plasma metabolomic profile in nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism.*, v.60, n.3, p.404-413, 2011.
- Lenz EM, Wilson ID. Analytical strategies in metabonomics. *J Proteome Res* 2007; 6:443-458.
- Li S. et al. Metabolomics study of alcohol-induced liver injury and hepatocellular carcinoma xenografts in mice. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, v. 24, 2011.
- Lindon JC, Holmes E, Nicholson JK. So what's the deal with metabonomics? *Anal Chem*. 2003; 75: 384A-391A.
- NICHOLSON J, Broadhurst DI, Wilson M, Wishart DS. Translational biomarker discovery in clinical metabolomics: an introductory tutorial. *Metabolomics* 2013; 9: 280-299.
- 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): 1181-1189.
- Ratziu V, Charlotte F, Heurtier A, Gombert S. Sampling variability of liver biopsy in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* 2005; 128: 1898-1906.
- Sanal NG. Biomarkers in nonalcoholic fatty liver disease-the emperor has no clothes? *World J Gastroenterol* 2015; 11: 3223-3231.
- Sun C, Fan JG, Qiao L. Potential Epigenetic Mechanism in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Int J Mol Sci* 2015; 16: 5161-5179.
- Takaki A, Kawai D, Yamamoto K. Multiple hits, including oxidative stress, as pathogenesis and treatment target in non-alcoholic steatohepatitis (NASH). *Int J Mol Sci* 2013; 14: 20704-20728.
- Wu D, Zhu B, Wang X. Metabonomics-based omics study and atherosclerosis. *J. Clin. Bioinforma.*, 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3222604/>>. Acesso em: 12/06/2017.