



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Centro de Ciências Exatas e da Natureza
Departamento de Química Fundamental
Programa de Pós-Graduação em Química

ÉRIKA DE ALMEIDA LEITE

**CONSTRUÇÃO DE MODELO METABONÔMICO BASEADO EM RMN DE ^1H A
PARTIR DE AMOSTRAS DE URINA PARA CLASSIFICAR PORTADORES DE
HEPATITES B OU C**

Recife
2014

Érika de Almeida Leite

**CONSTRUÇÃO DE MODELO METABONÔMICO BASEADO EM RMN DE ^1H A
PARTIR DE AMOSTRAS DE URINA PARA CLASSIFICAR PORTADORES DE
HEPATITES B OU C**

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

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Oliveira da Silva

Recife
2014

Catálogo na fonte
Bibliotecária Joana D'Arc Leão Salvador CRB4-532

L533c Leite, Érika de Almeida.
 Construção do modelo metabonômico baseado em RMN de ^1H a partir
 de amostras de urina para classificar portadores de hepatite B ou C / Érika
 de Almeida Leite. – Recife: O Autor, 2014.
 64 f.: fig., tab.

 Orientador: Ricardo Oliveira da Silva.
 Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.
 CCEN. Química Fundamental, 2014.
 Inclui referências e apêndices.

 1. Química analítica. 2. Hepatite. I. Silva, Ricardo Oliveira (Orientador).
 II. Título.

 543 CDD (22. ed.) UFPE-FQ 2014-58

Dissertação submetida ao Corpo Docente do Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Mestre em Química.

Aprovada:

Prof. Ricardo Oliveira da Silva
(Orientador)
Departamento de Química Fundamental
Universidade Federal de Pernambuco

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

Prof^a Beate Saegesser Santos
Departamento de Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Pernambuco

**"Construção de Modelo Metabonômico Baseado em RMN de
¹H a partir de Amostras de Urina para Classificar
Portadores de Hepatites B ou C"**

Por

Érika de Almeida Leite

Departamento de Química Fundamental
Centro de Ciências Exatas e da Natureza
Universidade Federal de Pernambuco
Recife-PE-Brasil
11 de Março de 2014

A minha querida mãe, que mesmo diante das maiores dificuldades, me deu a oportunidade de estudar e mostrar que é possível realizar os maiores sonhos com perseverança e dedicação.

Ao meu marido, pelo companheirismo, amor, apoio e pela paciência. Agradeço imensamente pelas palavras de incentivo concedidas naqueles momentos de fraqueza e, principalmente, por fazer parte da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao Professor Dr. Ricardo Oliveira por aceitar me orientar mesmo sem me conhecer. Obrigada pelos ensinamentos repassados durante esses dois anos de pós-graduação, pelas conversas e por me proporcionar os meios necessários para o desenvolvimento desta pesquisa. Deixo aqui registrado meu mais profundo respeito e admiração.

Agradeço aos participantes do grupo de pesquisa de metabonômica do qual também faço parte. Ao Prof. Edmundo Lopes, à Dra. Michele Godoy e à Dra. Andréa Dória pelas discussões, idéias e todas as opiniões referentes à pesquisa. Agradeço também aos colaboradores do Hospital Universitário da UFPE pela disponibilidade na coleta das amostras para compor o meu estudo.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Química da UFPE pelos conhecimentos adquiridos, em especial, à Prof^ª. Dr^ª. Thereza A. Soares pelos conselhos e pela dedicação em ensinar.

A todos os membros do laboratório da Central Analítica da UFPE. Agradeço à Eliete, Érida e Elaine pelo imenso carinho e respeito. À Abene, por me ajudar a dar os primeiros passos no RMN. Muito obrigada por tudo!

Aos funcionários Maurílio e Patrícia, do Departamento de Química da UFPE, pelas gentilezas prestadas ao longo desses anos e pela dedicação em solucionar os problemas dos discentes com presteza.

A todas as amizades conquistadas durante o mestrado. Em especial à Maria de Jesus pelos inesquecíveis momentos de alegria, pelas confidências compartilhadas e pela amizade inestimável. Agradeço pelo apoio, pela ajuda mútua e por não me deixar desistir, mesmo com todas as dificuldades que pudessem aparecer no meu caminho. Obrigada amiga!

A minha família pelo amor incondicional. A minha mãe, Maria Lucila, um exemplo de mãe e mulher. Obrigada por me apoiar em todas as minhas decisões e por estar ao meu lado nas minhas maiores vitórias. Agradeço por ter sido forte e nunca ter desistido dos seus filhos, mesmo diante dos maiores obstáculos da vida. Obrigada pelo carinho, colo, conforto e por me tratar como sua eterna filhota. Agradeço ao meu irmão, Elrick Almeida, pelos momentos de alegria e por ter me dado dois lindos sobrinhos, junto com a Nilde, minha cunhada. Amo muito vocês! Ao meu avô materno, pelas palavras de sabedoria e por todas as alegrias que foram proporcionadas por anos de vida. Sentimos muito sua falta. À minha avó materna pelo

carinho e amor dedicados à neta.

Ao meu grande amor, Allan Borges. Não tenho palavras para agradecer tudo o que você tem feito por mim. Obrigada pela confiança e tenha certeza que esta é uma vitória nossa. Amo você!

À CAPES, pela bolsa concedida nos dois anos de curso. E todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para que fosse possível a realização deste trabalho.

O êxito da vida não se mede pelo caminho que você conquistou, mas sim pelas dificuldades que superou no caminho."

Abraham Lincoln

RESUMO

As hepatites B e C são consideradas um problema de saúde pública em função de suas magnitudes e gravidades. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, 2 bilhões de pessoas foram infectadas pelo HBV e estima-se que de 2 a 3% da população mundial esteja infectada com HCV. Esses índices podem ser maiores, uma vez que muitas pessoas infectadas são assintomáticas. As hepatites B e C possuem alta taxa de cronificação, podendo evoluir para cirrose ou carcinoma hepatocelular. O diagnóstico envolve métodos sorológicos específicos para detecção dos marcadores das hepatites B e C em conjunto com a avaliação dos níveis séricos das aminotransferases (ALT, AST e GGT), fosfatase alcalina, albumina e bilirrubina. Todos esses exames requerem a coleta de sangue do paciente e, portanto, trata-se de um método invasivo. Neste contexto, buscou-se uma alternativa não invasiva ao exame de sangue para se obter o diagnóstico de hepatite. Através da estratégia metabonômica, baseada na espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), é possível obter uma "*impressão digital metabólica*", em biofluido (urina) de pacientes infectados e relacioná-la com a patologia. **Objetivo** Identificar pacientes com HBV e HCV com base no padrão espectral de RMN de ^1H de amostras de urina associadas com ferramentas estatísticas multivariadas (PCA e PLS-DA). **Amostras e Análises** Foram formados dois grupos: a) 13 pacientes (Grupo I) com o diagnóstico positivo para HBsAg, anti-HBc e DNA de HBV; e b) 18 pacientes (Grupo II) com anticorpos anti-HCV e RNA de HCV positivos e HBsAg negativo. As 31 amostras foram analisadas em ^1H RMN e os dados espectrais processados por PCA e PLS-DA. **Resultados** O modelo metabonômico identificou como positivos 11 dos 13 pacientes com HBV e teve sensibilidade 78,57% e especificidade 84,61%. Para o grupo com HCV, o modelo identificou 15 dos 18 pacientes e teve sensibilidade de 88,23% e especificidade 83,33%. **Conclusão** Neste estudo, o modelo metabonômico foi capaz de classificar corretamente 83,87% dos dados de pacientes com HBV e HCV. As variáveis mais importantes para a discriminação entre os grupos foram os deslocamentos químicos em 3,17 e 3,32 ppm, que, em princípio, podem ser associados à taurina e ao óxido de trimetilamina (TMAO).

Palavras-chaves: Hepatite B. Hepatite C. RMN de ^1H . Metabonômica. PCA. PLS-DA.

ABSTRACT

Hepatitis B and C are serious problems of public health because of their magnitude and severity. According to World Health Organization (WHO), 2 billion people have been infected with HBV and it is estimated that 2-3% of the world's population are infected with HCV. These ratios may be higher because many people infected are asymptomatic. Hepatitis B and C have a high rate of chronic infection, which may progress to cirrhosis or hepatocellular carcinoma. Diagnosis involves serological methods for detection of specific markers of hepatitis B and C together with the evaluation of serum aminotransferases ALT and AST, γ -GGT, alkaline phosphatase, albumin and bilirubin. All these tests require a blood sample from the patient and, therefore, they are invasive methods. In this context, it sought a non-invasive alternative to blood test for making the diagnosis of hepatitis. Through the study of metabonomics, based on magnetic resonance spectroscopy (NMR), is possible to get a "metabolic fingerprint" in biofluids (urine) from infected patients and relate it to the pathology. **Objective** To identify and discriminate patients with HBV and HCV based on the spectral pattern of the ^1H NMR spectra of urine samples associated with statistical tools multivariate (PCA and PLS-DA). **Samples and Analysis** Two groups were formed: a) 13 patients (Group I) with diagnosed positive for HBsAg and anti-HBc HBV DNA, and b) 18 patients (Group II) with anti-HCV and HCV RNA positive and negative HBsAg. The 31 samples were analyzed by ^1H NMR spectroscopy and spectral data processed by PCA and PLS-DA. **Results** The metabonomics model built identified as positive 11 of 13 patients with HBV, resulting in sensitivity equal to 78.57% and specificity equal to 84.61%. For the group with HCV, the model identified 15 of the 18 patients, resulting in sensitivity equal to 88.23% and specificity equal to 83.33%. **Conclusion** In this study, the metabonomics model was able to correctly classify 83.87% of patients with HBV and HCV. The most important variables for the discrimination between the groups were chemical shifts at 3.17 and 3.32 ppm, which in principle can be associated to taurine and trimethylamine oxide (TMAO).

Keywords: Hepatitis B. Hepatitis C. NMR ^1H . Metabonomics. PCA. PLS-DA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Vírus da hepatite B.....	17
Figura 2 -	Vírus da hepatite C.....	18
Figura 3 -	Casos confirmados de hepatite B e C no Brasil, 1999-2011.....	22
Figura 4 -	História natural da hepatite B.....	25
Figura 5 -	História natural da hepatite C.....	26
Figura 6 -	Etapas empregadas na estratégia metabonômica.....	30
Figura 7 -	Publicações (esquerda) e citações (direita) usando os termos <i>metabonomics</i> ou <i>metabonomic</i> na Webofscience®	31
Figura 8 -	Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, 25°C, pré-saturado) de amostra de urina de paciente diagnosticado com hepatites B e C.....	42
Figura 9 -	Gráfico dos escores PC1 <i>versus</i> PC2 na classificação do grupo com hepatite B e C.....	42
Figura 10 -	Gráfico de escores obtidos por PLS-DA entre os grupos com hepatite B e C.....	44
Figura 11 -	Gráfico VIP para a seleção das variáveis a partir da PLS-DA.....	45
Figura 12 -	Estrutura molecular da taurina e do óxido de trimetilamônio.....	46

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1</i> - Prevalência dos marcadores das hepatites B e C por macrorregião.....	21
<i>Tabela 2</i> - Resultados obtidos utilizando o formalismo kNN.....	43
<i>Tabela 3</i> - Classificação das amostras segundo o modelo metabonômico construído e na validação cruzada.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	Alanina aminotransferase
Anti-HBc	Anticorpo contra o antígeno do nucleocapsídeo (core) do HBV
Anti-HBe	Anticorpo contra o antígeno e do HBV
Anti-HBs	Anticorpo contra o antígeno de superfície do HBV
Anti-HCV	Anticorpo contra o vírus da hepatite C
AST	Aspartato aminotransferase
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças, do inglês <i>Centers of Disease Control and Prevention</i>
CHC	Carcinoma Hepatocelular
CPs	Componentes Principais
Da	Unidade de Dalton
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ELISA	<i>Ensaio de Imunoabsorção Ligado a Enzima, do inglês Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
FA	Fosfatase alcalina
γ-GT	Gama-glutamyl transferase
HBcAg	Antígeno do nucleocapsídeo (core) do vírus da hepatite B
HBeAg	Antígeno e do vírus da hepatite B
HBsAg	Antígeno de superfície do vírus da hepatite B
HIV	Vírus da Imunodeficiência Adquirida
HNANB	Hepatite não-A não-B
IC	Intervalo de Confiança
IFN	Interferon
INHV	Inquérito Nacional de Hepatites Virais
OMS	Organização Mundial da Saúde, do inglês <i>World Health Organization</i>
PCA	Análise de Componentes Principais, do inglês <i>Principal Component Analysis</i>
PCR	Reação em cadeia de polimerase, do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>

PLS-DA	Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais, do inglês <i>Partial Least Squares Discriminant Analysis</i>
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNA	Ácido Ribonucléico
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
TGO	Transaminase glutâmico oxalacético
TGP	Transaminase glutâmico pirúvico
VIP	<i>Variable Importance in the Projection</i>
HBV	Vírus da Hepatite B
HCV	Vírus da Hepatite C

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. HEPATITES B E C.....	16
2.1. Agentes etiológicos	16
2.2. Epidemiologia das hepatites B e C	19
2.3. Transmissão das Hepatites B e C	22
2.4. Manifestações clínicas e progressão da doença	24
2.5. Diagnóstico e tratamento das hepatites B e C	26
3. METABONÔMICA	28
3.1. Ressonância Magnética Nuclear e Análise de Biofluidos	31
3.2. Análise Estatística Multivariada	32
3.2.1 KNN – K-Nearest Neighbors	32
3.2.2 Análise de Componentes Principais (PCA)	33
3.2.3 Análise Discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA)	34
4. OBJETIVOS	37
4.1. Objetivo Geral.....	37
4.2. Objetivos específicos	37
5. EXPERIMENTAL.....	38
5.1. Obtenção das amostras de urina.....	38
5.2. Obtenção dos espectros de RMN de ¹ H	39
5.3. Tratamento estatístico dos dados espectrais	40
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
6.1. Considerações Finais	47
7. CONCLUSÃO.....	48
REFERÊNCIAS	49
APÊNDICE I	55
Aprovação do Projeto junto ao Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do CCS da UFPE	55
APÊNDICE II	57
Matriz original contendo os dados espectrais para a construção do modelo metabonômico	58

1. INTRODUÇÃO

A hepatite é uma inflamação das células que compõem o fígado, as quais são denominadas de hepatócitos. Essa inflamação compromete o funcionamento regular do fígado e, se não tratada a tempo, pode evoluir levando o paciente ao óbito. As hepatites podem ser de origem tóxica ou infecciosa. Quando tóxica, a lesão hepática pode ser causada por uso excessivo de medicamentos, bebidas alcoólicas, drogas ou outras substâncias tóxicas; quando infecciosa, as hepatites são causadas por agente viral.

As hepatites virais representam um sério problema de saúde pública no mundo, sendo que as de maior relevância são as provocadas pelo vírus da hepatite B (HBV) e pelo vírus da hepatite C (HCV). Esses vírus são caracterizados por agentes etiológicos distintos e com larga distribuição geográfica, variando de região para região, de modo que o número de infectados é alarmante (PASSOS, 2003; FERREIRA & SILVEIRA, 2004).

De uma maneira geral, os vírus das hepatites B e C possuem semelhanças quanto ao modo de transmissão da doença, que ocorre predominantemente por via parenteral¹ (PASSOS, 2003); bem como quanto às manifestações clínicas e possíveis complicações evolutivas da doença, pois, quando crônica, pode evoluir para estágios mais graves como cirrose e carcinoma hepatocelular (CHC), tornando o indivíduo infectado passível de transplante de fígado (AUGUSTO & LOBATO, 2003; MOELLERING, 2006; SHEPARD *e cols.*, 2006; LOPES & SCHINONI, 2011). Há também casos de hepatite fulminante, entretanto, é considerada uma forma rara da doença (ALTER, 1997; BONKOVSKY & MEHTA, 2001; SHEPARD *e cols.*, 2006; SANTOS *e cols.*, 2009).

Um dos grandes avanços alcançados, nas duas últimas décadas, no que diz respeito ao diagnóstico clínico de doenças, envolve as estratégias metabonômica e metabolômica. Esta metodologia combina técnicas espectrométricas, como a espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear – RMN e a espectrometria de massas – MS, e ferramentas de estatística multivariada, objetivando associar o perfil de metabólitos endógenos expressados pelas células, tecidos e/ou fluidos biológicos, à(s) perturbação(ões) sofrida(s) pelo sistema vivo em função de uma enfermidade, uso de drogas ou alguma outra ação externa.

No caso da estratégia metabolômica, além de associar o perfil de metabólitos endógenos com o status bioquímico da amostra, busca-se identificar, por exemplo, quais

¹ Parenteral é definida como sendo o modo de administração de medicamentos sem passar pelo sistema digestivo e, portanto, indo direto para a corrente sanguínea.

metabólitos estão associados à enfermidade bem como a rota metabólica envolvida. Com isso, é comum o uso de técnicas cromatográficas para promover a separação dos metabólitos e posterior identificação dos mesmos.

Na estratégia metabonômica, a utilização da espectroscopia de RMN é cada vez mais frequente, por se tratar de um método não destrutivo, rápido, que requer o mínimo de preparo da amostra e que permite a identificação e caracterização de um grande número de compostos orgânicos. Como os espectros gerados a partir da análise de biofluidos (urina ou sangue, por exemplo) são complexos, a utilização de ferramentas de estatística multivariada se faz necessária para o tratamento desses dados (NICHOLSON et al, 1990; BRINDLE et al, 2002; LINDON et al, 2003; NICHOLSON, 2004; NICHOLSON & LINDON, 2008).

Nos últimos anos, nosso grupo de pesquisa de metabonômica tem adotado a estratégia metabonômica para investigar diferentes problemas (GODOY et al, 2010). Aqui, desenvolvemos um modelo para classificar amostras de urina fornecidas por pacientes portadores de hepatite B ou C usando ferramentas estatísticas.

2. HEPATITES B E C

2.1. Agentes etiológicos

O vírus da hepatite B foi o primeiro a ser identificado. No início da década de 60, Blumberg e cols. detectaram no soro de aborígenes australianos a presença de um antígeno que reagia com o soro de pacientes hemofílicos, sendo denominado inicialmente de antígeno austrália. Posteriormente, descobriu-se que esse antígeno era um marcador específico para a infecção pelo vírus da hepatite B, passando a ser designado como HBsAg. Em 1970, a partícula viral do HBV pode ser visualizada pela primeira vez, a partir da microscopia eletrônica, por Dane e cols. (KAO & CHEN, 2002; FONSECA, 2010).

Pertencente à família *Hepadnaviridae*, do gênero *Orthohepadnavirus*, o vírus da hepatite B (HBV) é um vírus formado por uma molécula circular de DNA de fita parcialmente dupla e que infecta apenas os humanos (KIDD-LJUNGGREN e cols., 2002; DEHESA-VIOLANTE & NUÑEZ-NATERAS, 2007).

A partícula viral possui um formato esférico, com 42-47 nm de diâmetro (**Figura 1**), e é constituída por um invólucro externo, contendo o antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg); e formado por um nucleocapsídeo (core) constituído pelo antígeno do core

(HBcAg), o antígeno e (HBeAg), o genoma viral e o DNA polimerase (SHEPARD *e cols.*, 2006; LOPES & SCHINONI, 2011).

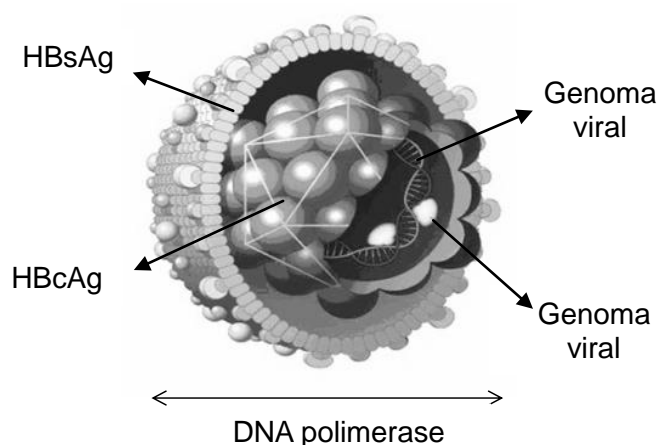


Figura 1 – vírus da hepatite B (HBV).

Além da partícula viral completa, podem ser encontradas, no soro do indivíduo infectado pelo HBV, partículas virais não infecciosas, que são caracterizadas pelo formato esférico (com diâmetro de 20 nm); as partículas com formatos tubulares e formadas apenas pelo invólucro externo do vírus (MARINHO & AGOSTINHO, 2003).

Existem oito diferentes genótipos do HBV classificados de A a H e com ampla distribuição geográfica (RONCATO *e cols.*, 2008; TE & JENSEN, 2010; LOPES & SCHINONI, 2011; SILVA *e cols.*, 2012). Eles podem ser divididos em subgenótipos, com exceção dos genótipos E e G (ALMEIDA, 2009).

Estudos mostram que a genotipagem do HBV parece estar associada com a resposta ao tratamento com antivirais e com a evolução clínica da doença. Portanto, os genótipos A e B parecem responder melhor ao tratamento com interferon e/ou lamivudina quando comparados aos genótipos C e D (RONCATO *e cols.*, 2008; LOPES & SCHINONI, 2011; SILVA *e cols.*, 2012). Por outro lado, os portadores com genótipo C do HBV, parecem ter maiores riscos em desenvolver carcinoma hepatocelular (KAO, 2002).

A descoberta do vírus da hepatite C ocorreu pouco tempo após a identificação das hepatites A e B. Isso porque, suspeitou-se da existência de outro agente viral que era responsável pela maioria dos casos de hepatite pós-transfusionais, sendo então classificado como hepatite não-A não-B (HNANB) (PRINCE *e cols.*, 1974; BONKOVSKY & MEHTA, 2001; FEINSTONE *e cols.*, 2001).

Sucessivos estudos foram realizados a fim de identificar esse novo agente viral e, na década de 80, uma pesquisa realizada por CHOO *e cols.* com chimpanzés infectados com soro de pacientes portadores de hepatite pós-transfusional não-A não-B, e

desenvolvida no Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) dos Estados Unidos, revelou a presença de um agente infeccioso constituído de ácido ribonucléico (RNA), composto por um envelope lipídico e que era transmitido pelo sangue (ALTER, 1999; BONKOVSKY & MEHTA, 2001).

Todavia, somente em 1989, mediante aplicação de técnicas de biologia molecular, que permitem a clonagem do genoma viral da HNANB, foi possível a identificação e caracterização do agente etiológico até então desconhecido. Foi então denominado de vírus da hepatite C (HCV) e pertencente à família *Flaviviridae*, do gênero *Hepacivirus* (CHOO e cols. 1989; PURCELL, 1997; BONKOVSKY & MEHTA, 2001). No mesmo ano, foi desenvolvido um teste sorológico para a detecção dos anticorpos contra o vírus C (anti-HCV) (KUO e cols., 1989).

Do ponto de vista da estrutura morfológica, as partículas do vírus da hepatite C possuem formato esférico, com diâmetro de 30-60 nm (**Figura 2**), sendo composto externamente por um envoltório lipoprotéico e internamente por um nucleocapsídeo contendo o genoma viral que é uma molécula de RNA de fita simples (BONKOVSKY & MEHTA, 2001; AUGUSTO & LOBATO, 2003).

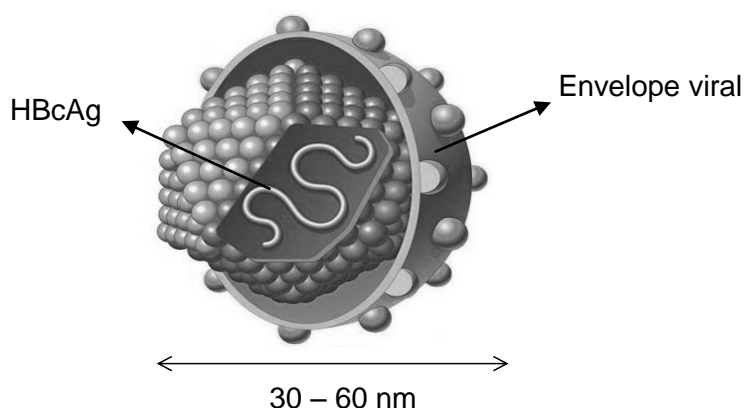


Figura 2 – Vírus da hepatite C (HCV).

O HCV pode ser classificado em seis genótipos distintos (1 a 6) divididos em múltiplos subtipos (a, b, c, etc) (STRAUSS, 2001; SIMMONDS e cols., 2005), sendo que um sétimo genótipo tem sido caracterizado provisoriamente (THOMAS, 2012).

Dentro de um mesmo genótipo e subtipo podem ocorrer variações do HCV conhecidas como “*quasiespécies*”, que resultam de replicações imperfeitas do vírus proporcionando o surgimento de pequenas e constantes mutações (STRAUSS, 2001). A relação dessas “*quasiespécies*” com a progressão da doença e à resposta ao tratamento terapêutico ainda é muito controversa e, portanto, não está bem esclarecida (AUGUSTO

& LOBATO, 2003; FRANCISCUS, 2011).

Em contrapartida, a genotipagem é um parâmetro relevante clinicamente, pois define com maior precisão as chances de resposta ao tratamento antiviral e o tempo de duração terapêutico (SCOTT & GRETCH, 2007; LEE, e *co/s.*, 2008; PERONE e *co/s.*, 2008; FRANCISCUS, 2011).

Estudos clínicos mostram que pacientes infectados pelos genótipos 1 ou 4 tendem a ser mais resistentes à resposta terapêutica em comparação com os infectados pelos genótipos 2 ou 3 do HCV (LEE, e *co/s.*, 2008; THOMAS, 2012). Quanto ao tempo de duração do tratamento, geralmente pode alcançar 24 semanas para os pacientes infectados com genótipos 2 ou 3 e atingir 48 semanas em pacientes com genótipo 1 do HCV (LAUER & WALKER, 2001; FRANCISCUS, 2011).

Diante de toda essa variabilidade genética do vírus da hepatite C, acaba tornando-se difícil a elaboração de uma vacina contra a doença (ZEIN, 2000; FRANCISCUS, 2011).

2.2. Epidemiologia das hepatites B e C

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (2012), 2 bilhões de pessoas já tiveram contato com o HBV e 240 milhões tornaram-se portadores crônicos, sendo que 15 a 40% desses infectados podem desenvolver algum tipo de complicação (CAREY, 2009). Nos países que ainda não adotaram nos seus programas nacionais de imunização a vacinação contra o HBV, estima-se que 1,5 milhão de pessoas podem vir a óbito devido à infecção pela hepatite B (GOLDSTEIN e *co/s.*, 2005).

Quanto à hepatite C, a infecção atinge cerca de 2 a 3% da população mundial (LAVANCHY, 2011) e, segundo a OMS, aproximadamente 150 milhões de pessoas estão cronicamente infectadas pelo vírus e com potenciais riscos da doença progredir para cirrose hepática e/ou câncer de fígado no futuro.

A grande maioria dos estudos de prevalência², tanto para hepatite B quanto para hepatite C, são realizados em grupos específicos, como em doadores de sangue (AUGUSTO & LOBATO, 2003; TE & JENSEN, 2010) e acaba limitando a extrapolação

² A prevalência é definida como a frequência de ocorrência de uma dada doença na população e, portanto, ela mede quantas pessoas estão doentes. Os trabalhos aqui citados (CAREY, 2009, CDC, 2012, LAVANCHY, 2011 e SHEPARD, 2005) apresentam a prevalência de uma forma diferente tanto do VHB e do VHC, considerando a presença de anticorpos na população (testes sorológicos específicos) obtidos em banco de sangue. Isso indica que a pessoa teve contato com o vírus, mas não necessariamente que esteja doente.

dessas estimativas na população em geral (SHEPARD e cols., 2005; MARTINS e cols., 2011). Além disso, a doença hepática pelo HBV ou HCV se apresenta de maneira assintomática na maioria das pessoas infectadas (NASCIMENTO e cols., 2012; AUGUSTO & LOBATO, 2003), o que dificulta o diagnóstico precoce e a obtenção desses dados epidemiológicos (AUGUSTO & LOBATO, 2003).

O número de casos da hepatite B apresenta distribuição geográfica variável. Na China, no sul da Ásia, na maioria dos países da África, nas Ilhas do Pacífico, partes do Oriente Médio e na região norte do Brasil, a prevalência do HBV é alta, variando de 8 a 15%, de forma que a infecção na infância é a mais comum, sendo transmitida de mãe para filho. A prevalência é considerada intermediária, de 2 a 7%, em algumas áreas da Ásia, leste e sul da Europa, Rússia, América Central e América do Sul. Nos Estados Unidos, na Europa Ocidental e na Austrália a prevalência da doença é considerada baixa, menor que 2%. A infecção pelo HBV nas áreas de média e baixa prevalência ocorre principalmente durante a idade adulta (CAREY, 2009; CDC, 2012).

A prevalência da hepatite C no mundo também apresenta certa variabilidade geográfica (SHEPARD e cols., 2005). Os países com maior prevalência da hepatite C estão localizados na África e na Ásia. No Egito e em Camarões, a prevalência de anticorpos anti-HCV na população é de 14%. No Paquistão, o índice chega a 5,9%. Na Índia, cujo país concentra um quinto da população mundial, a taxa de prevalência média é de 1,5%, enquanto que na China, atinge 2,2% (LAVANCHY, 2011). As áreas com menor prevalência incluem os países na América do Norte, na parte Oeste e Norte da Europa (SHEPARD e cols., 2005).

No caso do Brasil, os estudos de prevalência do HBV e do HCV na população ainda são escassos, devido principalmente as grandes variações demográficas e socioculturais entre as regiões. Isso tem dificultado a realização de estudos capazes de estabelecer com precisão a prevalência dessas doenças no país (MARTINS e cols., 2011).

O Inquérito Nacional de Hepatites Virais³ (INHV), realizado em todas as capitais brasileiras, (**Tabela 1**) apontou uma soroprevalência do marcador da hepatite B (anti-HBc) na população de 7,4% (IC95%; 6,8%-8,0%) e para o marcador HBsAg, de 0,37% (IC95%; 0,25%-0,50%).

³ Os dados desse INHV foram obtidos nos seguintes anos/por região: Nordeste, Centro-Oeste, incluindo DF (2005-2006); Sul e Sudeste (2007-2008) e Norte (2008-2009). Segundo o Ministério da Saúde, esse estudo é o primeiro levantamento nacional de hepatites virais realizado na América Latina.

Tabela 1 - Prevalência dos marcadores das hepatites B e C por macrorregião.

Prevalência	Região	Marcadores		
		<i>anti-HBc</i>	<i>HBsAg</i>	<i>anti-HCV</i>
	Norte	10,90%	0,63%	2,10%
	Nordeste	9,13%	0,42%	0,68%
	Centro-Oeste	4,30%	0,31%	1,32%
	Sudeste	6,33%	0,31%	1,27%
	Sul	9,59%	0,48%	1,19%

Fonte: BRASIL, 2010.

A taxa do antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg) na população brasileira ficou abaixo de 1% (Tabela 1). Para a hepatite C, o INHV apontou soroprevalência do marcador sorológico anti-HCV no país de 1,38% (IC95%; 1,12%-1,64%). Portanto, os resultados do inquérito sugeriram a ocorrência de baixa endemicidade tanto da infecção por hepatite B quanto por hepatite C na população brasileira. Esses resultados são diferentes das estimativas da OMS, que em relação à hepatite B, classifica a região Norte do Brasil como de alta endemicidade ($\geq 8\%$) e, nas demais regiões, com endemicidade intermediária (2-7%).

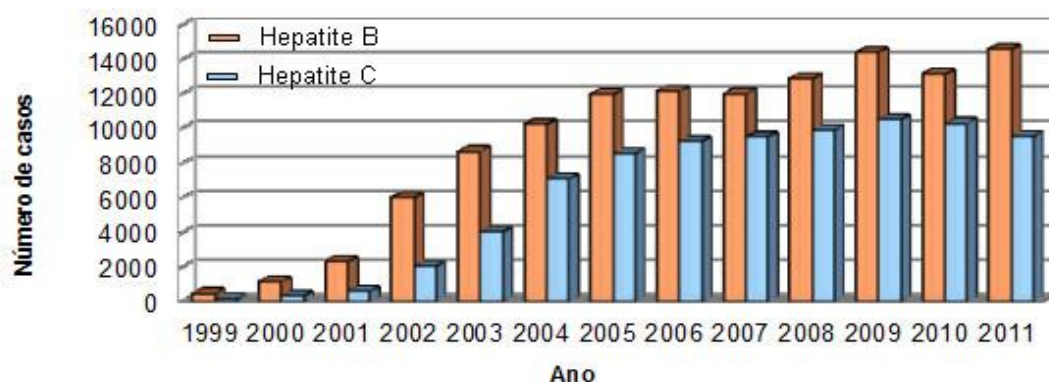
No inquérito, a maior positividade para os marcadores sorológicos dessas hepatopatias foi observada na Região Norte (Tabela 1) e com maior predominância em indivíduos na faixa etária de 20 a 69 anos de idade (BRASIL, 2010).

De acordo com o Boletim Epidemiológico de Hepatites Virais, divulgado pelo Ministério da Saúde, entre os anos de 1999 a 2011, foram confirmados⁴, no Brasil, 120.343 casos de hepatite B e 82.041 de hepatite C (Figura 3) (BRASIL, 2012). Desse total, em relação ao gênero, verificou-se maior ocorrência das hepatites B e C entre os homens, 54,18% e 60,08%, respectivamente. Quanto à faixa etária, foi mais frequente nos indivíduos entre 20 e 49 anos, para o HBV, enquanto para o HCV, maior frequência observada foi para pacientes entre 35 e 54 anos, e acima de 60 anos de idade. A transmissão mais frequente do HBV foi por via sexual (48,6%) e para o HCV, destacaram-se o uso de drogas e a transfusão de sangue, que juntas representaram 57,3% dos casos notificados de hepatite C. Quanto à forma clínica, a hepatite crônica foi predominante,

⁴ Casos confirmados com testes sorológicos e notificados junto ao SINAN.

respondendo por 78,3% dos casos de hepatite B e 97,9% dos casos de hepatite C. Também foram observados casos de hepatite fulminante (BRASIL, 2012).

Figura 3 – Casos confirmados de hepatite B e C no Brasil, 1999-2011 (BRASIL, 2012).



2.3. Transmissão das Hepatites B e C

O HBV está presente em altas concentrações no sangue e em quantidades baixas nos outros fluidos orgânicos como saliva, sêmen e secreções vaginais (FERREIRA & SILVEIRA, 2004). Além de ser considerado de 50 a 100 vezes mais infectante que o vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), o HBV é altamente resistente e pode sobreviver fora do organismo humano por 7 dias (MARINHO & AGOSTINHO, 2003; JORGE, 2003; OMS, 2012). O HCV, pode sobreviver de 16 horas a 4 dias em ambientes externos (JORGE, 2003) e no organismo, segundo Bradley (1991, *apud* BRANDÃO e cols., 2001, p. 62), o vírus circula em baixa concentração no sangue. Há relatos de casos do HCV na saliva, urina, esperma e leite materno, porém ainda não há dados conclusivos suficientes sobre a transmissão do vírus por essas vias (JORGE, 2003).

De um modo geral, as formas de transmissão das hepatites B e C são semelhantes, podendo ocorrer através da transfusão de sangue e seus derivados, em pacientes submetidos a programas de hemodiálise; pessoas transplantadas; através do compartilhamento de agulhas/seringas entre os usuários de drogas injetáveis e o reuso de agulhas contaminadas nas práticas de acupuntura, tatuagem, *piercing*; através de procedimentos odontológicos e médicos; através de relações sexuais e/ou por exposição ocupacional (STRAUSS, 2001; FERREIRA & SILVEIRA, 2004; LOK e cols., 2007; MARTINS e cols., 2011; CDC, 2012; SILVA e cols., 2012).

A transmissão sexual é o modo de infecção mais frequente do HBV em muitos países como, por exemplo, nos Estados Unidos (LOK e *co/s.*, 2007) e no Brasil (BRASIL, 2012). Alguns comportamentos de risco facilitam a transmissão, sobretudo indivíduos com múltiplos parceiros e com histórico de doença sexualmente transmissível (LOK e *co/s.*, 2007).

A transmissão do HCV entre os usuários de drogas injetáveis é a forma predominante em determinados países do mundo, a exemplo dos Estados Unidos, Austrália e Brasil (SHEPARD e *co/s.*, 2005; ALTER, 2007; BRASIL, 2012). Comportamentos de riscos como o compartilhamento de agulhas/seringas contaminadas propagam a doença entre essas pessoas. Há relatos de casos entre usuários de drogas inaláveis, na qual a infecção se dá pelo uso de canudos e espelhos contaminados (STRAUSS, 2001). Neste caso, a inalação de algumas substâncias pode causar lesão e sangramento dos tecidos nasais, e conseqüentemente, àqueles instrumentos quando inseridos dentro da cavidade nasal, entram em contato com o sangue e outros fluidos corpóreos, e acabam servindo de veículo transmissor da doença de um indivíduo para outro (NASCIMENTO e *co/s.*, 2006).

Os casos de hepatite pós-transfusionais foi reduzido substancialmente após a introdução dos testes sorológicos específicos para as hepatites B e C na triagem de doadores de sangue (POYNARD e *co/s.*, 2003; LOK e *co/s.*, 2007). Esse risco de contágio ainda não está completamente erradicado devido à janela imunológica, ou seja, o período entre a infecção e a detecção de anticorpos. Neste caso, os diagnósticos sorológicos acabam se tornando ineficazes e gerando resultados falso-negativos.

O risco de transmissão ocupacional das hepatites B e C após acidente percutâneo é mais frequente entre os profissionais de saúde. A probabilidade de contaminação pelo HBV pode atingir 40% quando o paciente-fonte apresenta sorologia positiva para o antígeno HBsAg (MOURA e *co/s.*, 2006), enquanto o risco de infecção pelo HCV é inferior a 10% (STRAUSS, 2001).

Outras formas de transmissão dessas hepatopatias ocorrem por via não-parenteral

(perinatal ou por contato pessoal). No caso da hepatite B, em especial, o risco de contágio para recém-nascido é de 70 a 90% quando a mãe é positiva para o antígeno HBeAg, e reduz para 10 a 40% quando apresenta HBeAg negativo (MARINHO & AGOSTINHO, 2003), enquanto a taxa de transmissão da hepatite C por via perinatal é de 4 a 7% (AUGUSTO & LOBATO, 2003). Entretanto, fatores como a carga viral e a coexistência com o vírus HIV aumentam o risco de transmissão da doença para o recém-nascido.

Mesmo com todos esses mecanismos de transmissão já estabelecidos, 60% dos casos de hepatite B e 44% de hepatite C ainda permanecem com via de transmissão indefinida (BRASIL, 2012).

2.4. Manifestações clínicas e progressão da doença

A maior parte das hepatites virais se apresenta de forma assintomática e apenas 10 a 20% dos casos revelam alguma manifestação clínica no paciente (MARINHO & AGOSTINHO, 2003). Os sintomas típicos da doença hepática variam entre os indivíduos, incluindo: mal-estar, náuseas, vômito, mialgia (esforço excessivo de um músculo), fadiga, prurido (coceira), cefaléias, icterícia (coloração amarelada da pele), ascite (barriga d'água), eritema palmar (palmas da mão avermelhadas) e hepatomegalia (aumento do volume do fígado) (AUGUSTO & LOBATO, 2003; MARINHO & AGOSTINHO, 2003; DÉNY & ZOULIM, 2010).

A icterícia é o resultado do acúmulo da bilirrubina no plasma (BERK, 2005). Possui importância fundamental no diagnóstico precoce da doença hepática, entretanto, em muitos casos, essa manifestação está ausente. Na hepatite B, menos de 10% dos pacientes apresentam icterícia, enquanto que para a hepatite C, os índices alcançam entre 20 a 30% dos casos (AUGUSTO & LOBATO, 2003; MARINHO & AGOSTINHO, 2003).

Na história natural da hepatite B (**Figura 4**), estima-se que dois terços dos indivíduos infectados se curam espontaneamente (LOPES & SCHINONI, 2011). Porém, quando o HBV persiste no organismo, a doença pode se tornar crônica e evoluir para uma hepatopatia mais grave como a cirrose e o câncer hepático (SHEPARD e cols., 2006; LOPES & SCHINONI, 2011).

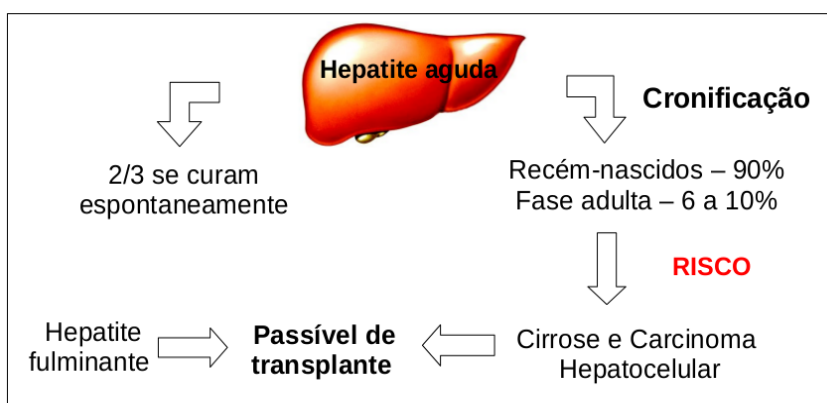


Figura 4 – História natural da hepatite B.

O período de incubação do vírus da hepatite B situa-se entre 45 a 180 dias (FERREIRA, 2000). Na fase aguda da infecção, a doença pode passar despercebida, pois em cerca de 60 a 80% dos casos, os sintomas da doença não se manifestam (DÉNY & ZOULIM, 2010). A progressão para a forma crônica atinge 90% nas infecções em recém-nascidos (SHEPARD e *cols.*, 2006; CAREY, 2009; McMAHON, 2010). Em crianças com idade entre 1 a 5 anos, essa percentagem alcança valores entre 25 e 50%, enquanto na fase adulta, a cronicidade ocorre em 6 a 10% das infecções (SHEPARD e *cols.*, 2006).

Alguns fatores aumentam as chances do indivíduo cronicamente infectado pelo vírus da hepatite B desenvolver cirrose hepática e carcinoma hepatocelular, tais como: gênero masculino, idade superior a 40 anos, histórico familiar de câncer hepático, o uso de álcool e tabagismo; além da coinfeção com o HCV e HIV (McMAHON, 2010).

Na história natural da hepatite C, estima-se que 15% a 45% das pessoas infectadas pelo vírus se curam espontaneamente (GISH, 2008). Quando a viremia persiste, o curso da infecção é lento e leva à cronificação em torno de 80% dos casos (PURCELL, 1997; LAUER & WALKER, 2001; GONZALEZ & DAVIS, 2012). O período de incubação do HCV é bastante variável (STRAUSS, 2001), de forma que na maioria das pessoas, a doença não se manifesta ou os primeiros sinais podem aparecer de 10 a 20 anos após à infecção (GISH, 2008). Com o passar do tempo, surgem pequenas cicatrizes no fígado (fibrose) que acabam comprometendo o funcionamento do fígado. Além disso, outras complicações hepáticas como a cirrose (o estágio final da fibrose) e o CHC podem surgir, tornando o indivíduo passível de transplante (AUGUSTO & LOBATO, 2003; POYNARD e *cols.*, 2003). A incidência de câncer hepático por ano é de 1% a 4% nos pacientes com cirrose (CONTE, 2000). Dentre os fatores que aceleram a evolução clínica

da hepatite C incluem o consumo de álcool, indivíduo do gênero masculino e a coinfeção com o HIV ou HBV (LAUER & WALKER, 2001).

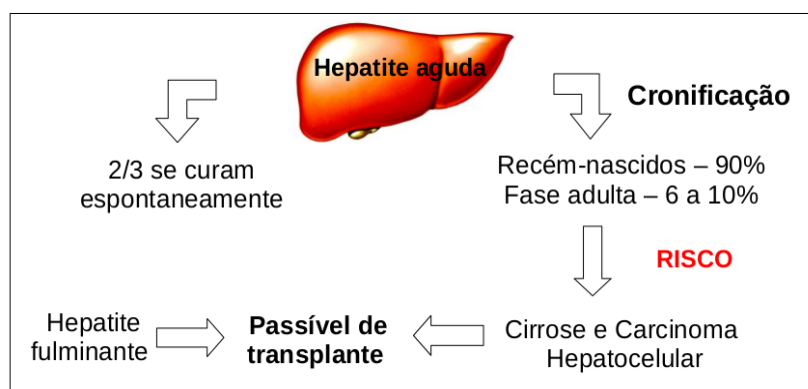


Figura 5 – História natural da hepatite C.

2.5. Diagnóstico e tratamento das hepatites B e C

O diagnóstico inicial do paciente consiste da anamnese associada aos exames físicos. As hipóteses diagnósticas possíveis são levantadas pelo profissional de saúde e, na suspeita de doença hepática, são realizados testes laboratoriais específicos, como dosagem sérica das transaminases.

A partir da coleta de sangue do paciente, avalia-se o hemograma completo e os níveis séricos de algumas substâncias, tais como, alanina aminotransferase (ALT/TGP), aspartato aminotransferase (AST/TGO), fosfatase alcalina (FA), gama-glutamil transferase (γ -GT), albumina e bilirrubina.

Em relação às transaminases, estão presentes em vários tecidos do corpo, sendo que a AST ou TGO (transaminase glutâmico oxalacético), é encontrada no coração, fígado, músculo esquelético e no rim; enquanto a ALT ou TGP (transaminase glutâmico pirúvico), encontra-se principalmente no rim e fígado (SILVA, 2010).

Diante de uma lesão hepatocelular (destruição dos hepatócitos), os níveis enzimáticos podem estar alterados. Contudo, o nível elevado de AST não é organo-específico, enquanto que o aumento no nível sérico da ALT pode ser considerado um marcador útil para avaliar o comprometimento hepático (SILVA, 2010). Mesmo com valores baixos e/ou normais, o nível das enzimas transaminases não exclui o diagnóstico de hepatite no paciente.

O aumento no nível da enzima fosfatase alcalina pode estar relacionada com distúrbios ósseos ou hepáticos. Essa diferença ocorre a partir da análise dos níveis

séricos das enzimas γ -glutamil transferase, já que a elevação da FA em consonância com GGT pode ser um indicativo de doença hepática (MINCIS & MINCIS, 2007). Por outro lado, a elevação no nível desta enzima é útil para indicar indivíduos com hepatopatia alcoólica.

De uma forma geral, a dosagem dessas enzimas hepáticas tem imensa importância clínica, pois além de indicar possíveis agressões ao fígado, orientam na sequência diagnóstica, direcionando a escolha dos exames sorológicos (MINCIS & MINCIS, 2007).

O teste sorológico mais utilizado para o diagnóstico de hepatite é o ensaio imunoenzimático (ELISA), que é baseado na identificação dos marcadores HBsAg, HBeAg, HBcAg, anti-HBs, anti-HBe, anti-HBc para hepatite B, e anti-HCV para hepatite C.

O antígeno HBsAg é o marcador mais específico do HBV. Pode ser detectado no soro entre a 1^a e a 2^a semana (LOPES & SCHINONI, 2011) após o contágio e permanecer positivo por até 180 dias, quando então desaparece e surgem os anticorpos anti-HBs. Nos indivíduos que conseguem eliminar o vírus, o HBsAg torna-se, geralmente, indetectável ao fim de 4 a 6 meses. Por outro lado, a persistência por mais de 6 meses caracteriza infecção crônica (FERREIRA, 2000; MARINHO & AGOSTINHO, 2003).

O aparecimento do anti-HBs marca a recuperação do indivíduo com hepatite B, podendo persistir por toda a vida em muitos pacientes, tornando-o imune em longo prazo (MARINHO & AGOSTINHO, 2003).

O HBcAg é um antígeno intracelular e não pode ser detectado no soro. Como resposta a este antígeno, surge então o seu anticorpo anti-HBc (MARINHO & AGOSTINHO, 2003). Além de ser considerado o único marcador da infecção pela hepatite B presente no período da janela imunológica, ou seja, o intervalo entre o desaparecimento do HBsAg e o aparecimento do anti-HBs; o anti-HBc pode confirmar o diagnóstico de hepatite aguda e indicar recente infecção (FERREIRA, 2000; CAETANO & BECK, 2006).

O antígeno HBeAg é o marcador indicativo de replicação e de infectividade do vírus da hepatite B. Pode ser detectado logo após o HBsAg e desaparece em poucas semanas, dando lugar ao anticorpo anti-HBe. Este por sua vez indica diminuição ou ausência da replicação viral e, portanto, é um marcador sorológico favorável para o prognóstico da hepatite aguda, pois mostra o início da recuperação do indivíduo (LOPES & SCHINONI, 2011).

A detecção e quantificação do DNA do HBV são realizadas por meio de técnicas de

biologia molecular. Para este fim, podem ser empregadas as técnicas de PCR (reação em cadeia de polimerase) ou por técnica de DNA-ramificado. Portanto, essas ferramentas são úteis para confirmação do diagnóstico positivo para hepatite B e avaliação da resposta do paciente ao tratamento com antiviral (LOK e cols., 2007).

No caso da hepatite C, desde o início dos anos 90, o método sorológico ELISA tem sido amplamente usado para a detecção dos anticorpos anti-HCV no soro. A sua primeira geração, o ELISA I, foi um avanço no diagnóstico da infecção desse vírus, entretanto, não é mais utilizado na prática clínica devido a sua alta taxa de falso-positivo quando comparado às demais gerações (BRANDÃO e cols., 2001). Atualmente, a terceira geração (ELISA III) é a mais empregada nos laboratórios bioquímicos. O ELISA III permite a detecção dos anticorpos do HCV entre 4 e 10 semanas após a infecção (POYNARD e cols., 2003), com especificidade maior que 99% e sensibilidade entre 95% e 99% (GONÇALES & JÚNIOR, 2008), além da simplicidade e do baixo custo. A detecção qualitativa e quantitativa do RNA do HCV é feita por PCR.

As técnicas sorológicas para hepatites B e C são fundamentais para o diagnóstico da doença, entretanto, esses métodos ainda geram resultados falso-negativos; principalmente quando realizados no período da janela imunológica. Apesar disso, a detecção dos marcadores do HBV e HCV é importante na avaliação do estado clínico do paciente e no acompanhamento da terapêutica (CARLO e cols., 2008).

Quanto ao tratamento dessas hepatopatias, o uso de antivirais e imunomoduladores são indicados para os pacientes crônicos das hepatites B e C. Essa abordagem é capaz de reduzir a replicação viral e impedir o progresso da doença para cirrose, insuficiência hepática e carcinoma hepatocelular (LOK e cols., 2007; STRAUSS, 2001).

Atualmente, no esquema terapêutico para a hepatite B, há cinco tratamentos disponíveis que podem ser empregados: interferon (IFN) alfa convencional, interferon peguilado, lamivudina, adefovir e entecavir (LOK e cols., 2007). Na hepatite fulminante, o tratamento mais indicado é o transplante de fígado (MARINHO & AGOSTINHO, 2003). Para o tratamento da hepatite C, os medicamentos usados são o interferon e a ribavirina. Quando usados em conjunto, aumentam a eficácia terapêutica (STRAUSS, 2001).

3. METABONÔMICA

Os metabólitos são definidos como moléculas químicas com baixa massa molar (<

1000 Da) e resultantes do metabolismo celular. Podem ser encontrados em qualquer nível de complexidade como uma célula ou tecido; e participam de diversas reações metabólicas diferentes (VILLAS-BÔAS & GOMBERT, 2006).

Os estudos envolvendo os metabólitos são realizados através das estratégias metabolômica e metabonômica. A metabolômica, em princípio, consiste na caracterização e quantificação de todos os metabólitos (metaboloma) presentes em um sistema biológico (GOODACRE *e cols.*, 2004; NICHOLSON & LINDON, 2008). O metaboloma, por sua vez, é formado por um conjunto químico complexo e heterogêneo, desde espécies iônicas a carboidratos, álcoois e cetonas voláteis, aminoácidos, lipídeos, entre outros. Essa diversidade química torna a análise simultânea de todos os metabólitos praticamente impossível (GOODACRE *e cols.*, 2004; VILLAS-BÔAS & GOMBERT, 2006).

Por outro lado, a metabonômica envolve a mensuração da resposta multiparamétrica dos metabólitos de sistemas vivos, em consequência de estímulos fisiopatológicos ou modificação genética (NICHOLSON, 1999). As doenças, o uso de drogas ou a ação de toxinas causam perturbações nas concentrações e no fluxo dos metabólitos endógenos envolvidos nas principais vias celulares. Essas perturbações desencadeiam mecanismos de ajuste no ambiente intra e extracelular para manter as condições internas estáveis. Por sua vez, esses ajustes metabólicos, processo denominado homeostase, podem ser expressos como uma “*impressão digital*” das perturbações bioquímicas causadas por agressão tóxica ou pelo processo de uma doença (LINDON *e cols.*, 2003).

Geralmente são utilizados, na estratégia metabonômica, fluidos biológicos que podem ser obtidos de maneira não-invasiva (urina) ou minimamente invasiva (sangue) (SILVA, 2010). Esses fluidos podem revelar alterações bioquímicas sofridas dentro de um organismo. Por isso, quando analisada por técnicas analíticas avançadas, como a espectroscopia de ressonância magnética nuclear, e os dados tratados com métodos estatísticos adequados, torna-se uma poderosa ferramenta para investigação em análises clínicas. O esquema da **Figura 6** mostra as etapas adotadas para a interpretação dos dados metabonômicos.

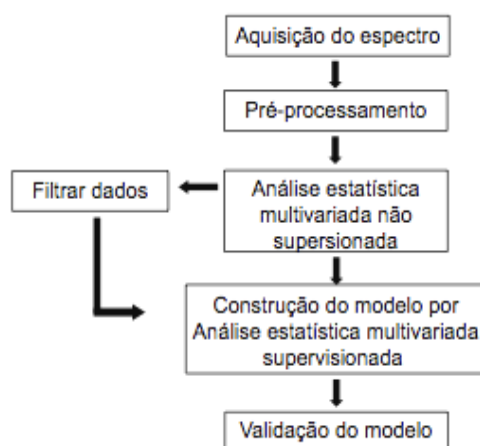


Figura 6 – Etapas da estratégia metabonômica (Adaptado de García, 2011).

Vários métodos espectroscópicos têm sido empregados para tratar conjuntos de dados de amostras biológicas complexas. A metabonômica desenvolveu-se utilizando essencialmente a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), que nos últimos anos tem sido usada com sucesso na identificação de potenciais biomarcadores, associando-os ao *status* bioquímico da amostra. Por outro lado, para identificar e quantificar os metabólitos de um sistema biológico, as técnicas cromatográficas associadas à espectrometria de massa se mostram bastante eficazes. Portanto, técnicas cromatográficas associadas à espectrometria de massas constituem-se nas principais ferramentas da estratégia metabonômica, enquanto a espectroscopia de ressonância magnética nuclear destaca-se na estratégia metabonômica. O que não são necessariamente excludentes.

Como a aplicação dessas técnicas analíticas gera um grande número de variáveis, é preciso extrair as informações a partir do uso de ferramentas quimiométricas, tais como a Análise de Componentes Principais (PCA), Análise Discriminante Linear (LDA) e a Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA), que foram os métodos utilizados nesta pesquisa.

A **Figura 7** apresenta um gráfico, produzido a partir do banco de dados *Web of Science*[®], mostrando o crescimento anual no número de artigos e citações publicados com os tópicos *metabonomic* ou *metabonomics* desde o ano 2000. Até a data da pesquisa, em 22.01.2014, os artigos publicados já somam 2.613 e 59.517 citações sobre os tópicos em questão. É uma área em plena expansão, caracterizando-se como fronteira do conhecimento na utilização de métodos espectroscópicos para fins de diagnóstico.

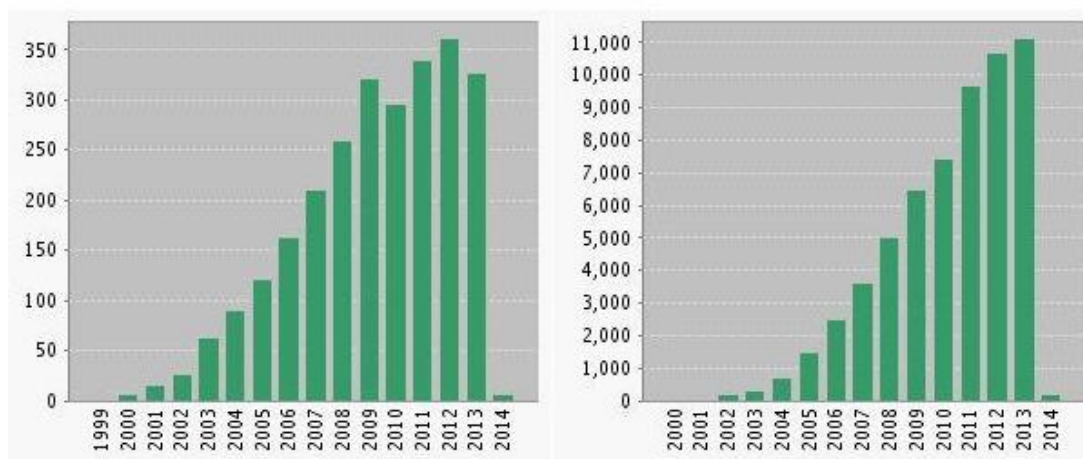


Figura 7 – Publicações (esquerda) e citações (direita) usando os termos *metabonomics* ou *metabonomic* na *Web of Science*®, a partir do ano 2000. Acessado em 22.01.2014.

3.1. Ressonância Magnética Nuclear e Análise de Biofluidos

No desenvolvimento de novas técnicas para análise de biofluidos, existe uma preferência por métodos analíticos não invasivos e com o mínimo de interferência do analista. Esses requisitos são necessários para minimizar os riscos de contaminação da amostra ou sua deterioração, o que poderiam, em conjunto ou individualmente, interferir na metodologia e nos resultados obtidos (SILVA, 2010).

A maioria dos diagnósticos ou prognósticos dos estados patológicos utiliza a urina e o soro do paciente como pontos de partida, além da anamnese. Como se tratam de sistemas biológicos complexos, a análise desses biofluidos através da espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear gera um grande número de variáveis espectrais. As informações químicas contidas nos dados espectrais que são importantes para o analista precisam ser extraídas e, por isso, são utilizadas ferramentas estatísticas adequadas para interpretação dos dados obtidos experimentalmente (WINNING *e cols.*, 2008).

Entretanto, a análise de biofluidos por RMN possui um grande desafio no estudo da metabonômica. Como os biofluidos contêm, em geral, excesso de água na sua composição química, o que poderia interferir na análise espectral, faz-se necessário aplicar uma sequência de pulsos para supressão do sinal da água. A não eliminação desse sinal impediria ou dificultaria a visualização dos sinais referentes aos metabólitos presentes na amostra. Uma forma de aumentar o sinal dos metabólitos diminuindo o sinal da água é fazer a pré-saturação do sinal atribuído à água. Este foi o procedimento que

adotamos aqui.

3.2. Análise Estatística Multivariada

A análise de metabólitos em fluidos biológicos utilizando a espectroscopia de RMN gera espectros com inúmeras frequências de ressonância e contêm uma grande quantidade de variáveis provenientes de metabólitos endógenos que dificilmente poderiam ser processados manualmente. Para facilitar a interpretação, métodos estatísticos multivariados têm sido amplamente empregados para tratamento dos conjuntos de dados a fim de extrair as informações contidas no conjunto de espectros. Dentre as técnicas multivariadas empregadas com sucesso em estudos metabonômicos, como PCA e PLS-DA, o K-Nearest Neighbors (KNN) é uma ferramenta muito utilizada no reconhecimento de padrões, mas não muito frequente na metabonômica. Entretanto, optamos por utilizá-la em nossos estudos.

3.2.1 KNN – K-Nearest Neighbors

Com o KNN, é possível classificar uma amostra a partir da distância da mesma em relação a seus vizinhos. Trata-se de uma abordagem não-paramétrica, na qual é fundamental escolher o tipo de distância que será utilizada, normalmente utiliza-se a distância euclidiana ou a distância de Mahalanobis; o número (k) de vizinhos que devem ser considerados na classificação; e qual (is) variável (is) devem ser consideradas para a classificação.

No KNN tradicional, a distância e o número de vizinhos têm o mesmo peso para a classificação. No entanto, há relatos que sugerem considerar pesos distintos para a distância e o número de vizinhos (MACLEOD, 1987). Assim, a classificação é feita considerando o número de vizinhos mais próximos do objeto desconhecido, bem como a classe dos mesmos.

3.2.2 Análise de Componentes Principais (PCA)

A análise de componentes principais (do inglês Principal Component Analysis, PCA) é uma das ferramentas quimiométricas⁵ mais utilizadas no tratamento de dados. Classificada como um método não supervisionado, na qual nenhuma informação a respeito da amostra é levada em consideração, a PCA tem como objetivo transformar um conjunto de dados originais em outro conjunto com um número menor de variáveis, não correlacionadas e sem perda significativa de informações (MATOS e cols., 2003; HAIR, 2005; CORREIA & FERREIRA, 2007).

Essa redução no número de variáveis facilita a interpretação dos resultados e, para isso, os dados contidos na matriz original, que é organizada por M linhas (amostra) e N (variáveis) colunas, passam a ser representados por novas variáveis que são denominadas componentes principais (CPs) (MATOS e cols., 2003). Cada componente principal é uma combinação linear das variáveis originais (MATOS e cols., 2003), isso quer dizer que as n variáveis originais geram, através de suas combinações lineares, (m – 1) componentes principais (NETO & MOITA, 1998). Esse novo conjunto de variáveis (CPs) contém a variância do conjunto de dados e pode ser organizado em ordem decrescente de importância (CORREIA & FERREIRA, 2007). Sendo assim, a primeira componente principal (CP1) possui a maior variância dos dados e, portanto, maior quantidade de informação estatística. A segunda componente principal (CP2), que é ortogonal à primeira, detém a segunda maior variação dos dados e assim por diante. Geralmente, grande parte da variância (informação) pode ser explicada com uma pequena quantidade de componentes principais (NETO & MOITA, 1998).

A fim de facilitar a interpretação dos dados, escolhem-se duas ou três componentes principais que são desenhadas em gráficos bidimensionais ou tridimensionais. Através de um gráfico de escores (*scores*) e/ou de pesos (*loadings*) é possível verificar possíveis relações entre as amostras e as variáveis, respectivamente, além de poder identificar amostras anômalas (MATOS e cols., 2003).

⁵ A Quimiometria é área da química que se refere à aplicação de métodos matemáticos e ferramentas de estatística multivariada a fim de extrair o máximo de informações possíveis dos dados obtidos.

3.2.3 Análise Discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA)

A regressão por mínimos quadrados parciais (PLS – do inglês, *Partial Least Squares*) é um método supervisionado usado para construir um modelo para classificar amostras e um dos mais utilizados para a construção de modelos de calibração multivariada.

Em linhas gerais, toda calibração visa encontrar um algoritmo matemático que relacione as respostas obtidas analiticamente com a propriedade de interesse. A construção dos modelos de regressão multivariada consiste de duas etapas. Na primeira, é realizada a calibração, que consiste em construir um modelo que relacione a grandeza medida com a propriedade de interesse. Na segunda etapa, é feita uma previsão, no qual o modelo de regressão construído seja capaz de prever novas amostras, a partir dos sinais analíticos medidos para elas (PIMENTEL & NETO, 1996).

Durante a etapa de calibração é usado um conjunto de amostras denominadas como conjunto de calibração ou de treinamento. O princípio básico para a PLS consiste em encontrar uma relação entre as variáveis independentes e as variáveis dependentes. No nosso estudo temos as seguintes variáveis: deslocamento químico (dependentes) e status bioquímico (independente). Os deslocamentos químicos estão diretamente relacionados com os diferentes metabólitos presentes no biofluido, no caso, urina; e o status bioquímico é o diagnóstico clínico construído pelo corpo médico a partir da anamnese e dos exames clínicos de rotina. Esse conjunto de dados é então decomposto em uma soma com n variáveis latentes, que na PLS é o termo comumente utilizado para designar as componentes principais (CPs). Além disso, dois modelos são construídos, um para as variáveis independentes (X) e outro para as variáveis dependentes (Y) sendo decompostas, conforme Equações (1) e (2).

$$X: TP' + E_x = \sum t_n p'_n + E_x \quad (\text{Equação 1})$$

$$Y: UQ' + E_y = \sum t_n q'_n + E_y \quad (\text{Equação 2})$$

Sendo que T e U são os escores da matriz de dados; P' e Q' são os pesos para a decomposição de X e Y , respectivamente, e E corresponde à matriz de resíduos. Portanto, na PLS, as matrizes X e Y podem ser decompostas em uma soma de n variáveis latentes.

Uma vez o modelo construído, este deve ser validado a fim de verificar a sua capacidade de previsão para o conjunto de amostras. Essa validação pode ser realizada por meio da validação cruzada, que consiste na retirada de uma amostra ou conjunto de amostras do conjunto de calibração para testar o modelo. Uma vez a amostra (ou conjunto de amostras) removida, constrói-se o modelo com o restante das amostras como anteriormente e testa-se a classificação para aquela amostra (ou conjunto de amostras) removida. A primeira amostra (ou conjunto de amostras) é então recolocada no conjunto de calibração e uma segunda amostra (ou conjunto de amostras) é removida. Este procedimento é repetido até que cada amostra tenha sido testada. O melhor modelo será aquele com melhor desempenho, isto é, com o menor erro possível.

A grande vantagem do método PLS é sua robustez. Isto quer dizer que os parâmetros do modelo de regressão construído não se alteram quando novas amostras são colocadas ou retiradas do conjunto de calibração.

Outro procedimento derivado do PLS é o método PLS-DA. A análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA, do inglês *Partial Least Squares Discriminant Analysis*) busca aperfeiçoar a separação entre os grupos de interesse, bem como verificar quais são as variáveis que influenciam na separação entre as classes. Portanto, na PLS-DA, a matriz Y contém as variáveis que podem indicar a classe ao qual uma amostra pertence; sendo assim, a PLS-DA pode ser aplicada quando se estuda variáveis de classe.

As ferramentas estatísticas PCA e PLS-DA têm sido amplamente utilizadas na metabonômica. Nosso grupo, em estudo publicado em 2010 (GODOY e *co/s.*), aplicou a estratégia metabonômica para identificar pacientes infectados com o vírus da hepatite C (HCV). Para este fim, foram utilizadas amostras de urina e analisadas por RMN de ^1H . Os espectros adquiridos foram então tratados utilizando métodos estatísticos de análise multivariada, como a PCA e DA. O modelo metabonômico gerado para o diagnóstico da hepatite C demonstrou sensibilidade de 94%, especificidade de 97%, com valor preditivo positivo 97% e valor preditivo negativo de 94%.

ZIRA e *co/s.* (2010) usaram a estratégia metabonômica para monitorar as alterações no perfil metabólico dos pacientes com carcinoma de células renais. As amostras de plasma foram analisadas por RMN de ^1H e os espectros tratados por PCA e PLS-DA. Os resultados mostraram que essa combinação de dados espectrais obtidos por RMN com técnicas de estatística multivariada constitui uma potencial ferramenta no diagnóstico de diferentes estados patológicos.

Munshi e cols. (2011) aplicaram a estratégia metabonômica para compreender a fisiopatologia da hepatite E, aplicando o RMN de ^1H para quantificar os vários metabólitos no plasma e na urina dos pacientes portadores dessa viremia. Os resultados obtidos ajudaram no melhor entendimento das manifestações bioquímicas e clínicas da hepatite E.

Portanto, enquanto nas análises clínicas convencionais os métodos determinam a presença ou alteração na concentração de um metabólito específico, a estratégia metabonômica vem se mostrando uma alternativa para o diagnóstico de alguma moléstia no indivíduo, associando-se mudanças no perfil dos metabólitos presentes no biofluido com a agressão sofrida (SILVA, 2010).

Diante disso, buscou-se neste estudo uma alternativa não invasiva ao exame de sangue para obtenção do diagnóstico de hepatite a partir da análise de urina de portadores de hepatite B ou C por Ressonância Magnética Nuclear.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

Construção de um modelo metabonômico baseado em RMN de ^1H a partir de amostras de urina para classificar portadores de hepatites B ou C.

4.2. Objetivos específicos

- ✓ Obter os espectros de RMN de ^1H de amostras de urina de pacientes com hepatite B e pacientes com hepatite C;
- ✓ Aplicar a análise de componentes principais (PCA) para verificar possível discriminação entre os grupos de doentes com hepatite B e hepatite C;
- ✓ Usar a matriz de scores produzida na PCA como dados de entrada para Análise Discriminante Linear (LDA);
- ✓ Utilizar a Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) para possível discriminação entre os grupos de doentes, construir um modelo metabonômico com os dados adquiridos e verificar quais regiões do espectro de RMN de ^1H são responsáveis pela discriminação;
- ✓ Identificar os possíveis metabólitos endógenos responsáveis pela discriminação das amostras de urina de hepatites B e C.

5. EXPERIMENTAL

Considerando que a pesquisa envolve material biológico humano, o projeto foi inicialmente submetido ao Sistema Nacional de Informações sobre Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos – SISNEP, do Ministério da Saúde, e ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) Envolvendo Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da UFPE.

Este estudo faz parte do projeto intitulado “*Avaliação do grau de fibrose hepática em pacientes com doença hepática crônica pelos vírus das hepatites B e C utilizando metabonômica*”, sob CAAE nº 03282.0.172.000-11, SINESP FR – 448995 e registro junto ao CEP/CCS/UFPE sob nº 396/11 (**Apêndice I**), da Dra. Andrea Dória Batista sob a coordenação dos Professores Dr. Edmundo Pessoa de Almeida Lopes e Dr. Ricardo Oliveira da Silva.

5.1. Obtenção das amostras de urina

Os pacientes portadores de hepatite B e C foram atendidos no ambulatório de hepatologia do Hospital de Clínicas (HC) da UFPE. A partir da anamnese e exames físicos realizados pela Dra. Andrea Dória Batista e Dra. Michele Godoy, doutorandas do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde da UFPE e integrantes do nosso grupo de pesquisa, os pacientes que se enquadravam no perfil da pesquisa, foram convidados a participar do projeto, e os que concordaram, receberam o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE para assinatura e inclusão no protocolo.

A partir da anamnese, foram incluídos 42 voluntários no estudo. Desses, foram selecionados 31 pacientes, no período de outubro de 2012 a dezembro de 2012. Os indivíduos foram classificados em dois grupos: **GRUPO I** - formado por 13 pacientes com hepatite B diagnosticados com HBV-DNA, HBsAg e anti-HBc positivos, e anti-HBs negativo no soro; e **GRUPO II** – formado por 18 pacientes com hepatite C diagnosticados com HCV-RNA e anti-HCV positivos; e HBsAg negativo no soro.

Foram incluídos pacientes com idade entre 18 e 65 anos, de ambos os gêneros, que não estavam sob o uso de medicamentos para o tratamento da hepatopatia viral ou outra enfermidade e que declararam a não-ingestão de álcool ou outra substância psicotrópica nos últimos 15 dias.

Foram excluídos os pacientes que apresentaram co-infecção com outras doenças,

como HIV/AIDS e esquistossomose mansônica, e os que apresentaram manifestações extra-hepáticas do HBV e HCV, como por exemplo, *diabetes mellitus*, tireoidite, artrite ou glomerulonefrite.

A coleta da amostra de sangue e urina dos indivíduos que concordaram em participar da pesquisa foi realizada no Laboratório Central do Hospital de Clínicas da UFPE, sendo coletadas 10 mL de sangue, em veia periférica, e 50 mL de urina (sendo coletada preferencialmente a primeira urina da manhã).

A amostra de sangue (após centrifugação) foi encaminhada para o Setor de Bioquímica e de Uroanálise do Laboratório Central do HC/UFPE para dosagem dos níveis séricos das enzimas alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FA) e gama-glutamil transferase (GGT). Também foi realizada a pesquisa dos marcadores sorológicos HBsAg, anti-HBc, anti-HBs e anti-HCV através de ensaio imunoenzimático Abbott®. E para a pesquisa do HBV-DNA e do HCV-RNA, foi aplicada a técnica de PCR. A amostra de urina foi encaminhada para o Laboratório da Central Analítica do Departamento de Química Fundamental (DQF) da UFPE e mantida sob refrigeração até sua análise no RMN.

5.2. Obtenção dos espectros de RMN de ^1H

Os espectros de RMN de ^1H das amostras de urina dos pacientes com hepatite B e hepatite C foram obtidos utilizando um espectrômetro Varian Unity Plus, operando na frequência de 300 MHz para o núcleo de hidrogênio. Com o auxílio de uma micropipeta automática, foram tomadas uma alíquota de 400 μL de urina e 200 μL de solução-tampão ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 / \text{NaH}_2\text{PO}_4 - 0,2 \text{ mol/L}$) e, após homogeneização, transferidas para tubos de RMN com 5 mm de diâmetro interno. Os espectros de RMN de ^1H foram obtidos aplicando uma sequência de pulsos com pré-saturação para supressão do sinal da água.

Todos os experimentos no RMN foram realizados a 25°C. Os parâmetros utilizados para aquisição dos espectros foram: janela espectral igual a 5000 Hz, tempo de aquisição igual a 6.4 s, pulso de RF de 90°, 32 transientes (*scans*) e *delay* de saturação igual a 3.0 s. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e o sinal da metila atribuída à creatinina foi utilizado como padrão interno de deslocamento químico (δ 3.06 ppm).

Os espectros de RMN de ^1H continham inicialmente apenas um sinal bastante intenso que era referente ao deslocamento químico da água (em δ 4.72 ppm) presente na

urina. Por isso, aplicou-se a pré-saturação do sinal da água, revelando inúmeros sinais na região entre 9.0 e 0.0 ppm. A fase e a linha de base dos espectros foram corrigidas manualmente. Os dados foram então pré-processados utilizando o VNMR (VARIAN NMR) *software* para obter regiões com intervalos de 0.05 ppm. A região espectral entre δ 6.4 e 4.2 ppm foi excluída para eliminar a interferência dos sinais da água e da uréia, que são os constituintes majoritários em uma amostra de urina e poderiam interferir na interpretação dos dados.

5.3. Tratamento estatístico dos dados espectrais

Após a exclusão da região espectral referente à água e à uréia, foram obtidas 154 regiões de deslocamento químico, que correspondem às variáveis dependentes do modelo metabonômico. Os dados espectrais foram organizados em uma planilha do Excel[®] e a matriz obtida contou com as amostras (espectros) dispostas em linhas e as variáveis (deslocamentos químicos) em colunas (**Apêndice II**).

Os dados foram então pré-processados e o pré-processamento utilizado foi o auto-escalamento seguido da normalização. Nesse caso, inicialmente, o valor de cada elemento da matriz foi subtraído pela média de cada variável (coluna) e, em seguida, foi normalizada dividindo o valor de cada elemento centrado na média pelo desvio padrão da variável.

Esses tipos de pré-processamento, na qual a centralização dos dados fica em torno da média permite que a presença de ruídos do equipamento de RMN não afete na análise, além de garantir que as variáveis sejam consideradas com importâncias equivalentes.

Após o tratamento inicial, a matriz final contou com 31 casos e 155 colunas, de forma que a variável independente se referiu ao diagnóstico clínico, ou seja, hepatite B ou hepatite C.

A matriz normalizada foi então transportada para o Programa *MetaboAnalyst 2.0* para realização da análise por PCA e PLS-DA. Por PCA, foram construídas 30 (n-1) componentes principais (CP's). Através da análise por discriminantes, foram selecionadas as variáveis independentes que melhor se correlacionavam com as variáveis dependentes. Para isso, as variáveis discriminatórias foram obtidas através do gráfico VIP (do inglês, *Variable Importance in the Projection*). Esse tipo de gráfico permite a realização de projeções nos escores obtidos pelo modelo PLS criado, a fim justamente de

selecionar as variáveis mais relevantes. Uma variável com índice VIP >1 (um) é considerada importante para o modelo, enquanto que variáveis abaixo desse valor, podem ser excluídas do modelo. Neste estudo foram selecionadas 54 variáveis discriminatórias.

A seguir, foi aplicada a análise por teste *t* para verificar o nível de significância estatística das variáveis selecionadas ($p < 0.05$).

Para o processo de validação do modelo PLS-DA construído, inicialmente, testou-se o algoritmo de Kennard-Stone (KS) para a seleção das amostras que fariam parte do grupo de teste. Esse método de seleção tem como base as distâncias de todas as amostras em relação ao valor médio das amostras. No estudo, as 31 amostras foram inicialmente divididas em dois grupos, sendo um grupo de treinamento (calibração), com 25 (80%) amostras, e um grupo de teste (validação) com 6 (20%) amostras. As amostras que compõem o grupo de teste foram selecionadas pelo algoritmo KS, cuja ferramenta computacional está disponível no *software Chemoface*. Então, a validação do modelo foi feita por validação cruzada. Foram construídos 31 modelos diferentes usando as mesmas componentes principais (CP's) selecionadas. No processo, foi excluída uma amostra por vez e para cada modelo construído, a amostra excluída foi testada.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na pesquisa foram avaliados, a partir da anamnese, 42 indivíduos sendo que 14 apresentaram positividade para o marcador da hepatite B (anti-HBc) e negativo para o anti-HCV, enquanto que 24 indivíduos eram positivos para o marcador da hepatite C (anti-HCV) e negativo para anti-HBc. Quatro indivíduos foram excluídos do estudo, pois 1 (um) apresentava esteatose hepática e 3 (três) eram pacientes com anti-HBc e anti-HCV negativos. Dos 14 indivíduos selecionados com hepatite B, 1 (um - 7%) foi excluído, enquanto dos 24 indivíduos com hepatite C, 6 (seis - 25%) foram excluídos. Todos eles, devido a erros na rotulagem da coleta da amostra (sangue e urina), o que dificultou a identificação junto ao banco de dados do hospital. Portanto, para este estudo, foram utilizados 31 pacientes, sendo 13 do **GRUPO I**, com hepatite B, e 18 do **GRUPO II**, com hepatite C.

Os espectros de RMN ^1H das amostras de urina de pacientes diagnosticados com hepatite B ou C apresentaram muitos sinais que revelaram semelhanças e diferenças (**Figura 8**).

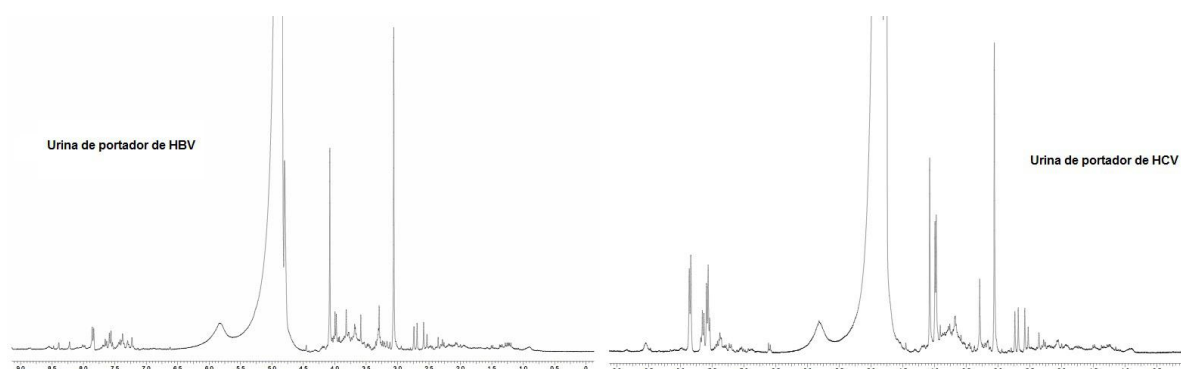


Figura 8 – Espectros típicos de RMN de ^1H (300 MHz, 25°C, pré-saturado) de amostras de urina de pacientes diagnosticados com hepatite B (esquerda) e hepatite C (direita).

Os dados espectrais obtidos por RMN foram pré-processados via autoescalamento seguido de normalização. A PCA permitiu classificar as amostras e identificaria àquelas com comportamento anômalo, ou seja, os “outliers”. A análise de componentes principais produziu 30 (n-1) CP's, sendo que as duas primeiras componentes principais descreveram 33% da variância do conjunto de dados. Com o gráfico de escores das CP1 x CP2, apresentado na **Figura 9**, observa-se que não foi possível verificar uma separação de forma satisfatória entre o **grupo I** (hepatite B) e o **grupo II** (hepatite C). Mesmo selecionando outros pares de CP, não foi possível separação satisfatória dos grupos.

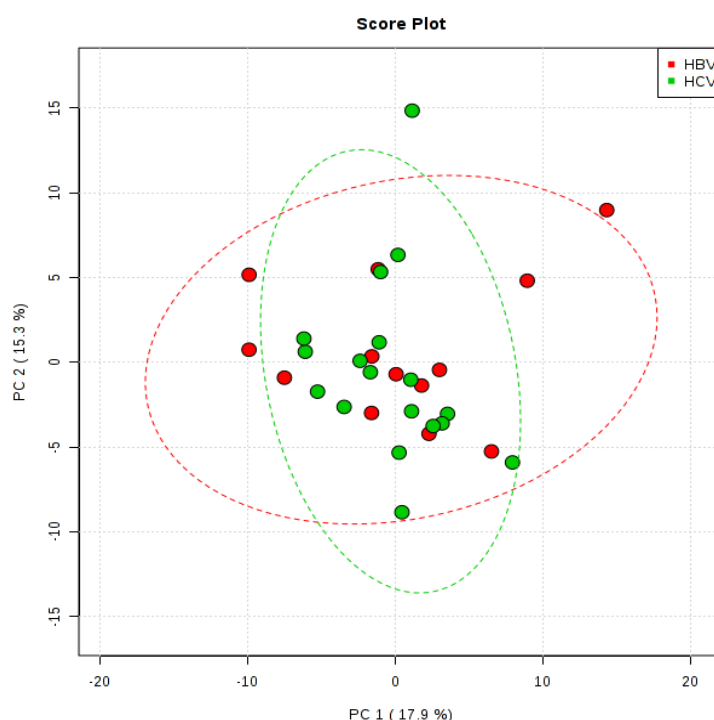


Figura 9 – Gráfico de *score* PC1 *versus* PC2 na classificação do grupo com hepatite B ou C.

A falta de separação entre os grupos pode ser atribuída à grande variabilidade dos dados, sobretudo pelos hábitos alimentares dos pacientes, que é a principal fonte de variação nos dados. Portanto, o estágio da doença infecciosa pelo HBV e pelo HCV não é a principal fonte de variação nos dados e consequentemente não estão expressas nas primeiras componentes principais, sugerindo a utilização de métodos supervisionados para tratar a questão. Recorremos aos formalismos kNN (k-vizinhos mais próximos), PLS-DA (Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais) e LDA (Análise Discriminante Linear).

A investigação utilizando o formalismo kNN, buscando classificar as amostras, foi implementada utilizando três estratégias, sendo (I) o modelo tradicional com k igual a um e distância euclidiana; (II) um modelo generalizado por Dudani; e um (III) kNN modificado, usando k igual a cinco, ponderando a distância máxima e o voto, que foram iguais a 0,552 e 0,448, respectivamente. A **Tabela 2** apresenta os resultados obtidos.

Tabela 2 - Resultados obtidos utilizando o formalismo KNN

HC-UFPE			KNN Clássico		KNN Dudani		KNN Modificado	
		Total	HBV	HCV	HBV	HCV	HBV	HCV
	HBV	13	9	4	9	4	9	4
	HCV	18	4	14	4	14	3	15
Classificações corretas			74,2%		74,2%		77,4%	

As três rotas utilizadas mostraram-se pouco eficientes na discriminação, com mais de 20% de classificações equivocadas. Mesmo assim, foi possível identificar as variáveis com maior poder discriminatório entre os grupos, são os deslocamentos δ 8,07; 3,22 e 3,07 ppm.

A partir da inspeção visual do gráfico de escores da Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais – PLS-DA (**Figura 10**), nota-se uma tendência de separação entre os dois grupos, ou seja, o **grupo I** (hepatite B) e o **grupo II** (hepatite C). A PLS-DA foi realizada com a matriz de dados original e a acurácia obtida foi de 58,06%.

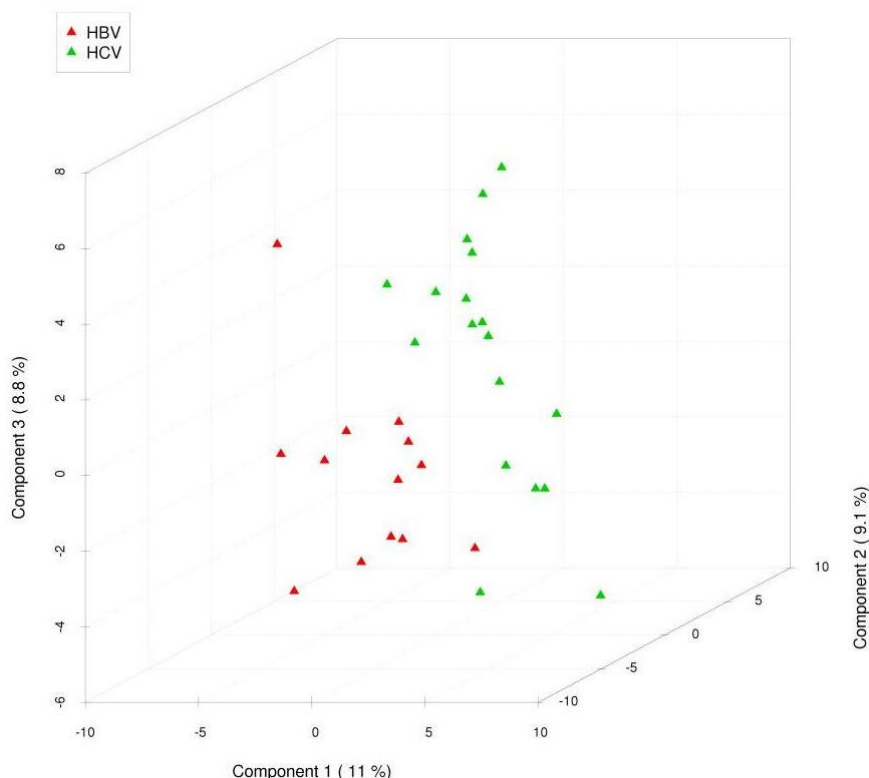


Figura 10 – Gráfico de score obtido por PLS-DA entre os grupos hepatite B (vermelho) e C (verde).

Para identificar quais as variáveis são responsáveis por essa separação entre os grupos estudados por PLS-DA, foi aplicado o índice VIP. Assim, selecionou-se as variáveis com as contribuições mais significativas que são capazes de discriminar os perfis metabonômicos dos pacientes com hepatite B e hepatite C. Apenas as variáveis mais relevantes, ou seja, com $VIP > 1$ foram selecionadas e utilizadas na construção e validação do modelo metabonômico. No total, foram 54 variáveis selecionadas. Para analisar as variáveis selecionadas pela projeção VIP, aplicou-se o teste estatístico t-student, com $p < 0.05$. O resultado mostrou que duas variáveis diferem significativamente: δ 3.32 e 3.17 ppm. Essas mesmas variáveis podem ser visualizadas no gráfico VIP (**Figura 11**) e, portanto, representam de fato as variáveis mais relevantes. No caso, as amostras fornecidas por pacientes portadores da hepatite do tipo B apresentam áreas de integral maiores para o deslocamento químico em 3,32 ppm, enquanto as amostras fornecidas por portadores da hepatite do tipo C apresentam áreas de integral maiores para o deslocamento químico em 3,17 ppm.

Alternativamente, também fizemos uma Análise Discriminante Linear – LDA, utilizando a matriz de escores obtida na PCA como matriz de entrada. Isso resultou em

um modelo que classificou corretamente 29 amostras, sendo 13 do grupo I (Hepatite B) e 16 do grupo II (Hepatite C), o que corresponde a 93,5% de acerto.

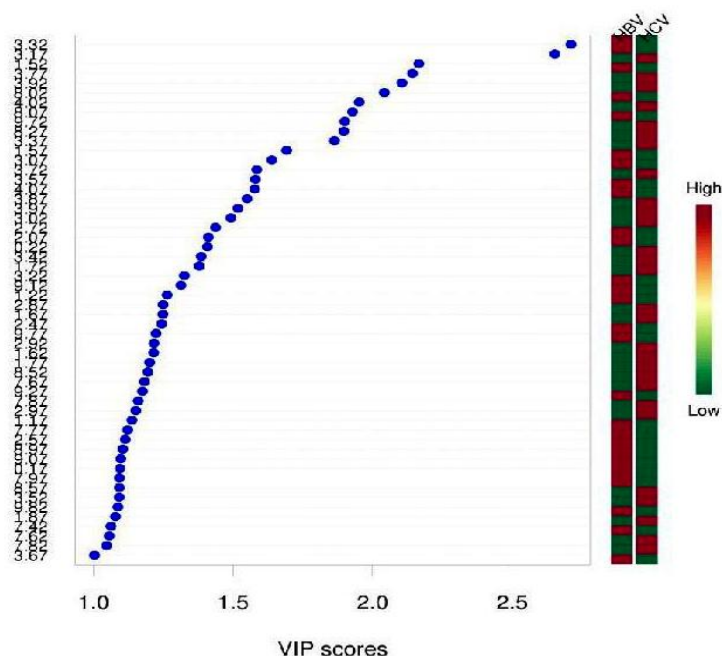


Figura 11 – Gráfico VIP para a seleção das variáveis a partir da PLS-DA .

Considerando-se os grupos isoladamente, o modelo classificou corretamente 100% das amostras do grupo I. No entanto, duas dessas amostras estão numa região de classificação que podemos considerar de região cinzenta, onde existiria uma dúvida com respeito à classificação. No caso do grupo II, o modelo classificou corretamente 88,9% das amostras, sendo que as duas classificadas erroneamente estão na região cinzenta citada.

Há de considerar que o modelo metabonômico construído apresentou valores preditivos positivos para HBV e HCV iguais a 86,7% e 100%, respectivamente. Na validação cruzada, foram classificadas corretamente 11 (onze) das 13 (treze) amostras do grupo I e 15 (quinze) das 18 (dezoito) amostras do grupo II. Isso resulta em uma classificação correta da ordem de 83,9% no total. Considerando-se os grupos, o acerto na validação cruzada ficou em 84,6% para o grupo I e 83,3% para o grupo II. Esses resultados estão resumidos na tabela 3:

Tabela 3 - Classificação das amostras segundo o modelo metabonômico construído e na validação cruzada.

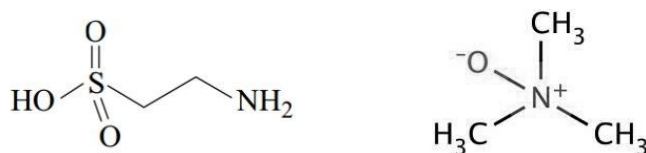
Modelo Metabonômico				Validação Cruzada			
		HBV	HCV			HBV	HCV
Dia gnó stic o	Clí nic o	HCV	2 16	Dia gnó stic o	Clín ico	HCV	3 15
		HBV	13 0			HBV	11 2

Com base nos resultados obtidos, o modelo metabonômico, utilizando a matriz de escores da PCA como *input* na LDA, mostrou um forte potencial para ser utilizado como um ensaio rápido e não invasivo para investigar o tipo de viremia.

Mas, como vimos, as manifestações dos estados patológicos são muito parecidas para as duas formas de hepatite aqui estudadas. Sendo assim, passou-se a investigar quais os metabólitos que estariam associados à classificação das amostras de urina. Os principais deslocamentos correlacionados com a classificação, segundo a análise do VIP, sugerem forte associação com a taurina e o óxido de trimetilamônio (TMAO).

Uma vez que a taurina ($C_2H_7NO_3S$ – **Figura 12**) está envolvida na biossíntese de ácidos biliares e que a alteração nos níveis de TMAO (C_3H_9NO – **Figura 12**) pode estar associada a um bloqueio da rota metabólica de N-oxidação da colina (Constantinou et al, 2007); a rota metabólita envolvida no processo e a explicação para a classificação obtida não está muito clara e, portanto, precisa de uma investigação específica para tal.

Figura 12 – Estrutura molecular da taurina (à esquerda) e do óxido de trimetilamônio (à direita).



É importante considerar que o objetivo principal deste trabalho era construir um modelo metabonômico que fosse capaz de diferenciar amostras de urina fornecidas por

portadores de hepatite do tipo B daqueles portadores de hepatite C, sendo, portanto, a estratégia aplicada alcançada.

6.1. Considerações Finais

Levando-se em consideração a possibilidade de diagnosticar pacientes com hepatite B ou com hepatite C, a partir de amostras de urina, a aplicação da espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear aliada a quimiometria mostrou ser uma ferramenta eficiente para tal fim, além de permitir que não fosse necessário o pré-tratamento das amostras. Comparando as técnicas quimiométricas aplicadas no estudo, o PLS-DA foi o mais adequado quando comparado ao kNN e à PCA, na identificação das variáveis discriminatórias. No entanto, a melhor discriminação foi alcançada quando utilizamos a matriz de escores da PCA como *input* para a Análise Discriminante Linear. Entendemos que a redução da dimensionalidade produzida pela PCA permitiu um melhor poder de discriminação dos grupos.

No que diz respeito à atribuição dos sinais no espectro de RMN de ^1H aos metabólitos que foram determinantes para a discriminação das amostras de urina, podem ser uma indicação para a taurina e o óxido de trimetilamônio (TMAO), mas estudos mais detalhados envolvendo a identificação desses metabólitos e a rota metabólica estão sendo realizados pelo nosso grupo de pesquisa.

Portanto, a aplicação da estratégia metabonômica no diagnóstico de doença é um estudo atrativo e caracterizado, sobretudo, por uma metodologia mais rápida e menos onerosa quando comparada aos métodos tradicionais de diagnóstico do vírus da hepatite B e C.

7. CONCLUSÃO

Neste trabalho, nós testamos diferentes ferramentas de estatística multivariada para construir modelos metabonômicos, a partir de dados espectrais (RMN de ^1H) de amostras de urina, capazes de discriminar amostras fornecidas por pacientes portadores de HCV daqueles portadores de HBV. Foram pré-selecionados 42 voluntários para o estudo. Desses, foram incluídos de fato 31 pacientes, sendo 13 portadores de HBV e 18 portadores de HCV.

Portanto, foram obtidos os espectros de RMN de ^1H dessas amostras e o tratamento quimiométrico revelou que PCA e kNN não são boas ferramentas para discriminar as amostras. No entanto, a PCA funcionou muito bem como pré-tratamento para reduzir a dimensionalidade dos dados e a matriz de escores da mesma foi utilizada como *input* na LDA.

O modelo metabonômico construído utilizando o formalismo LDA mostrou-se eficiente na separação dos grupos, classificando corretamente 93,5% das amostras e com valores preditivos positivos iguais a 86,7% e 100% para HBV e HCV, respectivamente. O modelo passou por validação cruzada, classificando corretamente 83,9% das amostras.

A análise por PLS-DA indicou algumas regiões espectrais com grande poder discriminatório entre os grupos, destacando-se os δ 3,32 e 3,17 ppm, que são atribuídos aos metabólitos endógenos taurina e óxido de trimetilamônio (TMAO). No entanto, até o presente, não conseguimos identificar as rotas metabólicas envolvidas na discriminação observada.

Por fim, a estratégia metabonômica mostrou-se eficiente na discriminação entre amostras fornecidas por pacientes portadores de hepatite viral do tipo B e do tipo C, utilizando espectros de RMN de ^1H de urina, caracterizando-se por ser uma abordagem simples, rápida e não-invasiva.

REFERÊNCIAS

- Almeida, D. Importância clínica dos genótipos do vírus B. *Gaz méd Bahia*, 2009. **79**(2): 39-40.
- Alter, H. Discovery of non-A, non-B hepatitis and identification of its etiology. *Am J Med.*, 1999. **107**(6B): 16S-20S.
- Alter, M. J. Epidemiology of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol.*, 2007. **13**(17): 2436-2441.
- Alter, M. J. The epidemiology of acute and chronic hepatitis C. *Clin Liver Dis.*, 1997. **1**(3): 559-568.
- Augusto, F.; Lobato, C. Hepatite C. In: Cotter, J. *Hepatites Víricas – Núcleo de Gastrenterologia dos hospitais distritais*. Portugal: 2003, p. 99-130. Disponível em: <http://www.aidsportugal.com/hepatitesviricas@76.aspx> Acesso em 28 out. 2012.
- Berk, P. D. Abordagem do paciente com icterícia ou provas de função hepática anormais. In: Goldman, L.; Denis, A. Cecil, *Tratado de Medicina*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005, v. 2, cap.149, p. 1037.
- Blumberg, B. S.; Alter H. J.; Visnich, A. A “new” antigen in leukemia sera., 1965 *apud Fonseca*, 2010, p. 324-325.
- Bonkovsky, H. L.; Mehta, S. Hepatitis C: A review and update. *J Am Acad Dermatol.*, 2001. **44**(2): 159-182.
- Bradley, D. W. Hepatitis C virus: Background and strategies for cloning a major etiologic agent of PT-NANB. In: Hollinger F. B.; Lemon, S. M.; Margolis, H. S. Eds. *Viral Hepatitis and Liver Disease*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1991. p.320-328.
- Brandão, A. B. M., et al. *Diagnóstico da hepatite C na prática médica: revisão da literatura*. *Rev Pan Am J Pub Health*, 2001. **9**(3): 161-168.
- Brasil, 2010. Ministério da Saúde. Estudo de prevalência de base populacional das infecções pelos vírus das hepatites A, B e C nas capitais do Brasil. Disponível em: www.aids.gov.br/publicacao/2011/estudo_de_prevalencia_de_base_populacional_das_infeccoes_pelos_virus_das_hepatites_b Acesso em 11 out. 2012.
- Brasil, 2012. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico de Hepatites Virais 2012. Brasília: 2012, Ano III, nº 01. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/publicacao/2012/boletim-epidemiologico-de-hepatites-virais-2012> Acesso em 11 out. 2012.
- Caetano, M. M.; Beck, S. T. Importância da detecção dos anticorpos anti-HBc na prevenção de transmissão do vírus da hepatite B (HBV) em bancos de sangue. *RBAC*, 2006. **38**(4): 235-237.
- Carey, W. D. The prevalence and natural history of hepatitis B in the 21st century. *Clev Clin J Med.*, 2009. **76**(3): S2-S5.

Carlo, F. S.; Lima, J. F.; Sene, M. Perfil do portador de hepatite B do município de Maringá. *Rev Saúde e Pes.*, 2008. **1**(3): 241-246.

CDC. Epidemiology and prevention of vaccine-preventable diseases (The pink book). Public Health Foundation, 2012. 12th Edition, Chapter 9, p.120-121. Disponível em: <http://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/hepb.html> Acesso em 05 fev. 2013.

Choo, Q. L., et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*, 1989. **244**: 359-362.

Claridge, T. D. W. High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry. Tetrahedron Organic Chemistry, 2009. 2th Edition, vol. 27, p. 11-20.

Conte, V. P. Hepatite crônica por vírus C. Parte 1. Considerações gerais. *Arq Gastroenterol.*, 2000. **37**(3): 187-194.

Constantinou, M.A., Theocharis, S.E. e Mikros, E. Application of metabonomics on an experimental model of fibrosis and cirrhosis induced by thioacetamide in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2007, 218, 11-19.

Correia, P. R. M.; Ferreira, M. M. C. Reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados: explorando procedimentos quimiométricos para tratamento de dados analíticos. *Quim Nova*, 2007. **30**(2): 481-487.

Dane, D. S.; Cameron, C. H.; Briggs, M. Virus-like particules in serum of patients with Australia antigen-associated hepatitis., 1970 apud Fonseca, 2010, p.326.

Dehesa-Violante, M.; Nuñez-Nateras, R. *Epidemiology of hepatitis virus B and C. Arch Med Res.*, 2007. **38**: 606-611.

Dény, P. Zoulim, F. Hepatitis B virus: from diagnosis to treatment. *Pathol Biol.*, 2010. **58**: 245-253.

Dudani, The distance-weighted k-nearest neighbor rule. *IEEE Trans. Syst., Man, Cybern.*, vol. SMC-6, 1976, p. 352-327.

Feinstone, S. M., et al. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *Rev Med Virol.*, 2001. **11**: 3-9.

Ferreira, C. T.; Silveira, T. R. Hepatites virais: Aspectos da epidemiologia e da prevenção. *Rev Bras Epidemiol.*, 2004. **7**(4): 473-487.

Ferreira, M. S. Diagnóstico e tratamento da hepatite B. *Rev Soc Bras Med Trop.*, 2000. **33**(4): 389-400.

Fonseca, J. C. F. Histórico das hepatites virais. *Rev Soc Bras Med Trop.*, 2010. **43**(3): 322-330.

Franciscus, A. HCV diagnostic tools: Genotype, subtype & quasispecies. HCSP Fact Sheet, 2011. Version 5: 2p.

García, J. L. I. Análisis metabonómico para la identificación de biomarcadores en enfermedades respiratorias. Universidad Complutense de Madrid. Tese-Doutorado em Ciências Físicas, 2011, p 4.

Gish, R. G. Overview of hepatitis C. In: Hepatitis C Choices: Diverse viewpoints and choices for your hepatitis C journey. Caring Ambassadors Program, 4th Edition, 2008. Chapter 2: 5-11. Disponível em:

<http://www.hepcchallenge.org/choices/chapters.htm> Acesso em 29 out. 2012.

Godoy, M. M. G.; Lopes, E. P. A.; Silva, R. O., et al. Hepatitis C virus infection diagnosis using metabonomics. *J Viral Hepatitis*, 2010. **17**: 854-858.

Goldstein, S. T., et al. A mathematical model to estimate global hepatitis B disease burden and vaccination impact. *Int J Epidemiol.*, 2005. **34**: 1329-1339.

Gonçalves, N. S. L.; Júnior, F. L. G. Diagnóstico laboratorial para hepatite C. In: I Consenso da Sociedade Brasileira de Infectologia para o Manuseio e Terapia da Hepatite C. Sociedade Brasileira de Infectologia, São Paulo: 2008, p. 35-39.

Gonzalez, S. A.; Davis, G. L. Demographics of hepatitis C virus today. *Clin Liver Dis.*, 2012. **1**(1): 2-4.

Goodacre, R. et al. Metabolomics by numbers: acquiring and understanding global metabolite data. *Trends in Biotechnol.*, 2004. **22**(5): 245-252.

Hair Jr, J. F. et al. Análise Multivariada de dados. Porto Alegre: Bookman, 2005. p. 25-32.

Jorge, S. G. Hepatite B. HepCentro, 2003. Acesso em 05 fev. 2013. Disponível em: http://www.hepcentro.com.br/hepatite_b.htm#TRANSMISSAO

Kao, J. H. Hepatitis B viral genotypes: Clinical relevance and molecular characteristics. *J Gastroenterol Hepatology*, 2002. **17**: 643-650.

Kao, J. H.; Chen, D. S. Global control of hepatitis B virus infection. *Lancet*, 2002. **2**: 395-403.

Kidd-Ljunggren, K.; Miyakawa Y.; Kidd, A. H. Genetic variability in hepatitis B viruses. *J Gen Virol.*, 2002. **83**: 1267-1280.

Kuo, G., et al. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus human non-A, non-B hepatitis. *Science*, 1989. **244**: 362-364.

Lauer, G. M.; Walker, B. D. Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med.*, 2001. **345**(1): 41-52.

Lavanchy D. Evolving epidemiology of hepatitis C virus. *Clin Microbiol and Infection*, 2011. **17**(2): 107-115.

Lee, C. M., et al. Hepatitis C virus genotypes: Clinical relevance and therapeutic implications. *Chang Gung Med J.*, 2008. **31**(1): 16-24.

Lindon, J. C.; Holmes, E.; Nicholson, J. K. So what's the deal with metabonomics?. *Anal Chem.*, 2003. **75**: 385A-391A.

Lok, A. S. F.; Conjeevaram, H. S.; Negro, F. Hepatitis B and D. In: Schiff, E. R.; Sorrel, M. F.; Maddrey, W. C. Schiff's Disease of the Liver, 10th ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2007. Chapter 29: p. 746-748; 752-754.

Lopes, T. G. S. L.; Schinoni, M. I. Aspectos gerais da hepatite B. *R Ci Med Biol.*, 2011.

10(3): 337-344.

Macleod, J. E. S. A Re-Examination of the Distance-Weighted k-Nearest Neighbor Classification Rule, *IEEE Trans. Syst., Man, Cybern.*, vol. SMC-17, N° 4, 1987, p. 689-696.

Marinho, C.; Agostinho, C. Hepatite B. In: *Hepatites Víricas – Núcleo de Gastroenterologia dos hospitais distritais*. Portugal: 2003, p. 53-98. Disponível em: <http://www.aidsportugal.com/hepatitesviricas@76.aspx> Acesso em 03 fev. 2013.

Martins, T.; Narciso-Schiavon, J. L.; Shiavon, L. L. *Epidemiologia da infecção pelo vírus da hepatite C*. *Rev Assoc Med Bras.*, 2011. **57(1)**: 107-112.

Matos, G. D., et al. Análise exploratória em Química Analítica com emprego de Quimiometria: PCA e PCA de imagens. *Rev Anal.*, 2003. **6**: 38-50.

McMahon, B. J. Natural history of chronic hepatitis B. *Clin Liver Dis.*, 2010. **14**: 381-396.

Mincis, M.; Mincis, R. Enzimas hepáticas: Por que são importantes para o estudo de doenças do fígado. *Prática Hospitalar*, 2007. Ano IX, **51**: 44-48.

Moellering, R. C. Hepatitis. Preface. *Infect Dis Clin N Am.*, 2006. **20**: xi-xii.

Moura, J. P.; Gir, E.; Canini, S. R. M. S. Acidentes ocupacionais com materiais perfurocortante em um hospital regional de Minas Gerais, Brasil. *Cienc Enferm.*, 2006. **12(1)**: 29-37.

Munshi, S. U.; Taneja, S.; Bhavesh, N. S., et al. *Metabonic analysis of hepatitis E patients shows deregulated metabolic cycles and abnormalities in amino acid metabolism*. *J Viral Hepatitis*, 2011. **18**: e591-e602.

Nascimento, C. J.; Bloch Jr, C. Ressonância Magnética Nuclear: Gradus Primus. *Biotec Cienc Des.*, 2001. **21**: 52-61.

Nascimento, L. B., et al. Soroepidemiologia da infecção pelo vírus da hepatite C em usuários de drogas ilícitas em Goiânia, Goiás. In: **Congresso de Pesquisa, Ensino e Extensão da UFG – CONPEEX**, 3., 2006. Anais eletrônicos do XIV Seminário de Iniciação Científica, Goiânia: UFG, 2006.

Nascimento, P. P., et al. *Perfil epidemiológico dos marcadores sorológicos para vírus da hepatite B dos pacientes atendidos em laboratório público*. *Rev Bras Clin Med.*, São Paulo, 2012. **10(6)**: 495-498.

Neto, J. M. M.; Moita, G. C. Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados. *Quim. Nova*, 1998. **21(4)**: 467-469.

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*, 1999. **29(11)**: 1181-1189.

Nicholson, J. K.; Lindon, J. C. Systems Biology: *Metabonomics*. *Nature*, 2008. **455(23)**: 1054-1056.

OMS, 2012. Organização Mundial da Saúde. Hepatitis B. Fact sheet n° 204. Disponível

em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/> Acesso em 30 jan. 2013.

Passos, A. D. C. Aspectos epidemiológicos das hepatites virais. *Medicina (Ribeirão Preto)*, 2003. **36**: 30-36.

Pavia, D. L., Lampman, G. M.; Kriz, G. S. Introdução à Espectroscopia. Cengage Learning: 4th ed., São Paulo, 2010.

Perone, C., et al. Alta prevalência do genótipo 1 em portadores de hepatite C crônica em Belo Horizonte, MG. *Rev Soc Bras Med Trop.*, 2008. **41**(3): 238-242.

Pimentel, M. F.; Neto, B. B. Calibração: Uma revisão para químicos analíticos. *Quim Nova*, 1996. **19**(3): 268-277.

Poynard T.; Yuen, M. F.; Ratziu V.; Lai C. L. Viral hepatitis C. *Lancet*, 2003. **362**: 2095-2100.

Prince, A. M., et al. Long-incubation post-transfusion hepatitis without serological evidence of exposure to hepatitis-B virus. *Lancet*, 1974. **3**: 241-246.

Purcell, R. The Hepatitis C virus: Overview. *Hepatology*, 1997. **26**(3): 11S-14S.

Roncato, M.; Ballardin, A. Z.; Lunge, V. R. Influência dos genótipos no tratamento da hepatite B. *Rev HCPA*, 2008. **28**(3): 188-193.

Santos, D. C. M., et al. Fulminant hepatitis failure in adults and children from a public hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *Braz J Infect Dis.*, 2009. **13**(5): 323-329.

Scott, J. D.; Gretch D. R. Molecular diagnostics of hepatitis C virus infection: A systematic review. *JAMA*, 2007. **297**(7): 724-732.

Shepard, C. W., et al. Hepatitis B virus infection: Epidemiology and vaccination. *Epidemiol Rev.*, 2006. **28**: 112-125.

Shepard, C. W.; Finelli, L.; Alter, M. J. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet*, 2005. **5**: 558-567.

Silva, A. L., et al. Hepatites virais: B, C e D: atualização. *Rev Bras Clin Med.*, 2012. **10**(3): 206-218.

Silva, R. O. A Espectroscopia de RMN como ferramenta elucidativa: estruturas moleculares, mecanismos de reação e metabonômica. Universidade Federal de Pernambuco. Tese-Doutorado em Química, 2010.

Simmonds, P., et al. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology*, 2005. **42**(4): 962-973.

Strauss, E. Hepatite C. *Rev Soc Bras Med Trop.*, 2001. **34**(1): 69-82.

Te, H. S.; Jensen, D. M. Epidemiology of hepatitis B and C viruses: A global overview. *Clin Liver Dis.*, 2010. **14**: 1-21.

Thomas, D. L. Predicting the response to the treatment of hepatitis C virus infection. *Clin Liver Dis.*, 2012. **1**(2): 46-48.

Villas-Bôas, S. G. Gombert, A. K. Análise do metaboloma: Uma ferramenta biotecnológica

emergente na era pós-genômica. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, 2006. Ano IX, **36**: 58-69.

Winning, H.; Larsen, F. H.; Bro, R.; Engelsen, S. B. Quantitative analysis of NMR spectra with chemometrics. *JMR J Magnetic Resonance*, 2008. **190**: 26-32.

Zein, N. N. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *Clin Microbiol Rev.*, 2000. **13**(2): 223-235.

Zira, A. N.; Theocharis, S. E.; Mitropoulos, D., et al. ^1H NMR metabonomic analysis in renal cell carcinoma: a possible diagnostic tool. *J Proteome Research.*, 2010. **9**(8): 4038-4044.

APÊNDICE I

*Aprovação do Projeto junto ao Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos
do CCS da UFPE*



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Comitê de Ética em Pesquisa

Av. da Engenharia, s/n - 1º Andar, Cid. Universitária, CEP 50740-600, Recife - PE.
Tel/fax: 81 2126 8588 - www.ufpe.br/ccs; e-mail: cepccs@ufpe.br

Of. Nº. 335/2012 - CEP/CCS

Recife, 04 de setembro de 2012

A
Prof. Michele Maria de Godoy
Hospital das Clínicas - UFPE

Registro do SISNEP FR - 448996
CAAF - 0382.0.1/2.000-11
Registro CEP/CCS/UFPE Nº 396/11
Título: Emprego da metabonômica no diagnóstico das doenças hepáticas em amostras de urina.
Pesquisador Responsável: Michele Maria de Godoy

Senhor (a) Pesquisador (a):

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE) registrou e analisou de acordo com a Resolução N.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, o protocolo de pesquisa em epigrafe, liberando-o para início da coleta de dados em 03 de setembro de 2012.

Ressaltamos que a aprovação definitiva do projeto será dada após a entrega do relatório final, conforme as seguintes orientações:

- a) Projetos com, no máximo, 06 (seis) meses para conclusão: o pesquisador deverá enviar apenas um relatório final.
- b) Projetos com períodos maiores de 06 (seis) meses: o pesquisador deverá enviar relatórios semestrais.

Dessa forma, o ofício de aprovação sumente será entregue após a análise do relatório final.

Atenciosamente

Sônia Ribeiro Ramos
Prof. Geraldo Bosco Lindoso Couto
Coordenador do CEP/CCS / UFPE

APÊNDICE II

Matriz original contendo os dados espectrais para a construção do modelo metabonômico

Matriz de dados: linhas (amostras) x colunas (deslocamentos químicos);

Paciente	Diagnóstico	9,97	9,92	9,87	9,82	9,77	9,72	9,67	9,62	9,57	9,52	9,47	9,42	9,37	9,32	9,27	9,22	9,17
A.M.S.	Hepatite B	0	2,66	5,61	3,8	0	0	0	0	7,43	17,97	23,71	26,34	25,92	19,41	15,02	10,46	15,52
A.R.S.	Hepatite B	4,6	2,8	0,96	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6,75
E.E.N.	Hepatite B	1,3	0	1,55	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,11
E.M.S.(176)	Hepatite B	0,64	0	1,52	0,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,6	0	5,7
G.L.A.	Hepatite B	0	0	0,92	3,39	5,93	0	0	1,24	5,53	14,33	17,4	18,14	11,75	15,33	23,44	25,46	36,01
L.M.B.	Hepatite B	0,46	0,63	0,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M.C.S.	Hepatite B	0,78	0,16	0,31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M.D.G.	Hepatite B	0,31	0,24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M.J.C.	Hepatite B	0	0	0	4,51	2,23	1,38	3,73	2,44	1,82	2,37	0	0	0	3,45	11,94	6,97	7,62
M.L.O.	Hepatite B	0	0,34	1,15	0,21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O.G.S.	Hepatite B	2,64	1,51	0,4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P.R.F.S.	Hepatite B	0	0	1,09	0	0,63	0	0,68	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	3,69
R.B.A.	Hepatite B	4,12	0,7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R.F.M.	Hepatite C	0,51	0,6	0	0	0	0	0,02	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T.C.A.	Hepatite C	0,18	0	0	0	0,15	0,41	0,07	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,38
A.B.S.	Hepatite C	0	0	0,49	0	0,14	0,3	0,45	1,39	0,61	0	0,63	0,75	0,92	1,98	1,82	1,57	1,66
A.P.S.	Hepatite C	0	0,82	0,17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,02	0	0	0	0
A.S.M.	Hepatite C	0,39	1,04	0,24	0	0	0	0,04	0	0	0	0,1	0	0	0	0	0	3,77
A.T.S.	Hepatite C	0	0	0	0,41	0	1,06	2,07	0,02	0,87	1,25	0,18	0	0	0	0	0	0
E.A.S.	Hepatite C	0,99	0,48	0,3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F.C.M.B.	Hepatite C	1,48	1,78	0,2	0,18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H.F.N.	Hepatite C	2,41	0,51	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
J.F.B.	Hepatite C	0	0	0	0	0,07	0,93	1,37	0,54	0,8	1,46	1,03	2,08	2,83	2,96	2,29	3,85	4,6
J.S.R.	Hepatite C	2,92	0,07	2,01	0,83	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L.F.F.	Hepatite C	0,08	0,23	0,24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,37	0	0	0
L.N.	Hepatite C	0,72	0	0,47	1,08	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4
L.S.M.P.	Hepatite C	0	0,47	0,76	0,49	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M.A.S.	Hepatite C	1,32	0,41	0,19	0,73	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M.G.S.	Hepatite C	5,34	3,65	1,37	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M.S.S.	Hepatite C	0	0	0	2,37	3,49	5,25	6,36	5,97	7,62	9,17	11,46	12,32	14,11	17,55	14,7	15,4	19,21
R.C.O.S.	Hepatite C	0	0	0,4	0	0	1,47	0,75	0,94	1,9	0,63	0	0	0	0	0	0	0

Matriz de dados: linhas (amostras) x colunas (deslocamentos químicos);

9,12	9,07	9,02	8,97	8,92	8,87	8,82	8,77	8,72	8,67	8,62	8,57	8,52	8,47	8,42	8,37	8,32	8,27	8,22	8,17
25,37	8,02	9,04	13,09	2,74	28,82	19,17	0	0	0	0	10,15	15,97	1,15	0	0	0	0	0	0
96,05	0	0	0	0	199,34	102,84	0	0	0	162,91	117,3	0	76,33	0	0	78,85	0	0	0
10,55	0	0	0,54	0	28,75	8,65	0	0	0	7,34	71,99	64,74	36,44	34,29	62,74	0	5,21	112,32	0
17,77	0	1,62	8,71	5,51	37,68	19,6	0,69	1,19	5,65	19,03	84,33	79,33	51,64	49,03	80,28	16,4	22,61	131,2	17,34
54,3	41,55	32,07	24,47	19,27	32,32	45,5	44,24	37,71	27,04	1,57	9,19	22,14	41,8	17,1	41,47	28,87	10,32	36,42	136,41
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,87	0	0	0	0	0	0	0	1,44
0,73	0	0	0	0	1,31	2,45	0	0	0	0,04	5,83	7,53	4,33	1,72	2,64	4,06	2,18	3,53	6,91
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,57	0	0	0
32,28	11,35	18,44	24,11	19,83	32,97	28	0	0	0	0	5,58	0,91	11,23	0	10,47	21,65	0,64	17,47	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14,82	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2,19	1,64	0	0	0
11,16	0	0,18	1,43	0,92	20,35	11,83	1,02	0,97	2,16	1,89	19,11	20,55	13,72	6,91	7,96	18,48	5,63	7,86	25,31
11,22	0	0	0	0	26,8	7,98	0	0	0	0	83,32	88,76	0	0	0	0	0	31,16	0
0	0	0	0	0	0,21	0	0	0	0	0	0	0	1,78	0	0	0	0	0	0
0,9	0	0,4	0,6	1,48	3,76	1,02	0,04	0,09	1,15	1,5	3,21	2,97	3,77	2,33	3,23	3,29	5,9	4,2	5,49
1,85	1,49	2,71	2,21	3,14	3,67	3	1,28	1,9	2,74	3,63	8,32	9,21	11,24	10,36	8,95	17,8	6,24	6,47	9,01
0,49	0	0	0	0	4,51	1,15	0	0	0	0	1,58	2,18	0	0	0	0	0	0	0
10,31	0,15	1,16	0	1,54	17,32	9,56	0	0	0,18	2,11	16,3	15,2	12,16	5,04	5,43	3,99	26,25	4,36	2,54
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	56,09	40,69	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6,65	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	64,68	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	38,83	40,24	3,63	0	0	0	0	0	0
5,54	3,52	3,81	5,26	7,4	10,59	7,65	6,61	7,92	8,28	9,06	20,82	17,73	14,97	9,72	11,6	15,22	14,46	12,04	11,83
14,36	0,23	0	0	0	1,58	30,41	2,46	0	0	0	0	9,79	0	0	0	0	0	6,29	0
0	0	0	0	0	0,77	0,05	0,17	0,23	0,61	0,82	2,17	2,25	3,1	0,48	1,35	1,69	2,3	3,8	3,41
55,46	0	0	3,17	0	71,08	63,29	0,69	0	0	0	21,05	31,12	20,46	21,29	23,23	12,6	3,51	30,48	10,27
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,15	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0,92	0	0	0	0	0	0,1	1,8	1,04	0	0	0	7,75	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20,91	17,23	20,8	21,29	19,87	34,05	22,68	17,91	21,77	26,12	40,08	103,11	64,4	23,28	21,72	24,98	30,58	23,4	34,65	47,7
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	24,25	32,92	31,5	5,62	110,66	8,63	4,03	61,86	6,35

Matriz de dados: linhas (amostras) x colunas (deslocamentos químicos);

8,12	8,07	8,02	7,97	7,92	7,87	7,82	7,77	7,72	7,67	7,62	7,57	7,52	7,47	7,42	7,37	7,32	7,27	7,22	7,17
82,04	250,69	367,63	346,83	190,78	118,42	0	0	0	0	5,16	116,58	24,48	10,8	47,59	70,54	14,3	33,24	53,66	0
83,71	271,03	0	0	0	561,79	1221,74	614,62	280,48	415,31	917,86	1375,3	346,22	137,76	777,85	1008,41	320,21	362,14	186,1	26,92
31,64	51,59	111,08	85,63	44,6	403,12	264,81	0	41,02	197,69	174,75	463,4	114,58	103,72	274,18	404,89	165,26	164,68	235,82	17,03
51,68	72,82	132,86	109,06	68,1	426,94	293,84	13,84	69,5	227,27	205,69	496,16	148,12	138,48	310,2	441,64	203,97	203,67	275,85	58,3
46,49	71,16	118,18	159,74	37,69	154,07	184,71	18,76	46,45	115,35	79,28	231,25	109,43	80	275,92	492,89	157	171,9	299,69	105,49
5,08	1,47	7,49	5,37	6,96	27,9	8,96	0	4,15	14,29	17,86	26,28	8,63	20,03	37,73	34,62	11,98	16,65	20,37	8,5
8,69	9,85	8,9	11,01	10,56	39,22	41,02	9,92	12,97	27,89	31,39	56,65	30,18	19,49	24,98	34,66	25,34	25,05	30,16	25,71
0	0	0	0	0	0,39	0,82	0	0	0,5	2,24	2,71	0	0	1,17	3,13	0	2,13	0	0
0	139,3	33,34	8,61	0	124,77	169,07	19,35	12,75	70,09	48,47	218,8	111,36	41,12	54,25	82,83	12,86	10,33	91,48	234,42
0	6,59	0	0	0	181,23	106,87	0	0	34,82	22,41	243,6	0	0	80,18	173,59	0	0	10,6	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	32,43	0	23,88	3,81	0
22,05	26,71	21,45	26,8	23,32	121,1	94,15	10,18	21,36	65,02	62,83	148,54	43,88	25,33	48,64	70,7	33,73	46,95	58,23	26,45
10,16	56,89	174,4	124,22	11,03	299,31	246,87	0	0	141,55	152,75	382,36	133,31	286,16	757,78	1010,66	334,23	316,31	309,53	70,97
0	1,31	0	0	0	2,94	4,4	0	0	0	0	0,81	2,53	2,63	1,29	3,51	1,19	0,87	3,53	3,71
9,82	13,81	10,31	10,27	10,16	21,53	10,74	7,86	11,82	18,74	18,81	24,56	16,74	24,4	34,18	34,05	20,36	22,66	27,14	20,01
13,22	10,08	17,15	16,53	13,52	38,66	19,82	4,8	10,19	21,45	22,05	37,08	14,01	26,45	54,38	63,51	24,54	37,67	41,3	14,32
3,25	5,9	6,56	9,94	5,64	36,76	25,61	0	4,22	14,97	14,6	37,92	11,93	16,4	37,17	53,27	15,81	18,48	24,56	7,25
24,06	23,32	15,65	21,96	11,47	117,31	82,17	6,59	13,66	60,38	57,05	141,91	32,84	20,53	48,53	70,62	34,63	29,6	54,25	27,21
0	0	0	0	0	464,35	314,04	0	0	206,61	253,16	581,66	56,39	0	19,25	23,58	0	0	9,94	0
0	0,78	0	1,71	0	9,74	9,85	0	0	4,67	5,07	14,5	5,37	4,04	11,21	17,88	6,91	6,14	16,37	8,09
0	0	0	3,22	0	16,22	36,73	0	0	4,07	0	38,66	7,7	0	29,08	68,43	11,87	83,56	46,66	13,39
0	0,22	5,98	15,63	3,66	307,68	279,15	0	0	151,57	167,39	434,74	85,41	22,72	62	121,21	38,36	22,66	40,97	5,35
24,17	21,21	23,02	20,74	27,65	111,62	113,6	13,35	13,29	57,19	65,15	120,08	53,88	26,9	26,17	37,92	20,87	25,53	25,46	18,91
0	0	0	24,46	0	0	164,88	0	0	0	0	111,88	50,16	0	54,01	208,14	97,46	42,06	126,92	50,86
5,18	8,53	7,6	8,53	10,95	25,98	14,77	7	10,38	18,25	19,47	26,29	12,81	14,89	18,12	21,37	15,61	14,7	17,89	19,41
49	61,43	47,77	48,28	29,49	148,3	172,54	18,19	21,39	91,55	98,52	198,26	80,5	49,72	76,33	122,53	76,66	61,02	98,54	41,26
3,1	1,15	6,95	5,82	1,39	18,82	4,36	0	8,48	12,31	15,48	36,09	39,88	54,4	69,22	76,88	22,08	22,53	31,19	4,69
7,6	9,19	18,78	23,84	4,52	49,66	36,16	0	2,72	25,87	22,6	67,21	35,03	135,38	124,73	262,22	132,45	64,61	70,99	81,31
0	0	0	0	0	0	34,57	0	0	0	0	59,06	0	0	49,32	130,34	20,1	12,82	47,09	0
44,14	47,3	69,57	79,24	102,35	555,95	261,97	6,58	60,81	283,34	291,6	548,96	55,6	45,63	111,89	143,93	38,19	45,37	65,17	1,19
13,75	25,8	64,47	73,74	30,73	179,63	177,92	9,08	12,73	112,67	69,84	233,8	80,96	71,93	204,13	346,7	126,11	239,16	230,66	57,61

Matriz de dados: linhas (amostras) x colunas (deslocamentos químicos);

7,12	7,07	7,02	6,97	6,92	6,87	6,82	6,77	6,72	6,67	6,62	6,57	6,52	6,47	4,17	4,12	4,07	4,02	3,97	3,92
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	237,92	436,61	1247,63	397,03	517,16	384,51
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	480,09	918,42	5840,52	1617,43	2567,05	1309,98
0	0,71	9,94	0	15,57	24,4	2,48	3,38	0	0	1,44	0	0	3,03	219,51	311,65	2481,8	717,44	914,41	536,61
42,74	46,42	56,58	46,48	66,06	76,51	57,49	59,63	43,03	50,12	65,22	48,75	64,25	76,17	144,82	297,79	2372,63	623,08	800,14	441,64
81,83	127,56	198,42	220,45	227,07	157,59	45,91	0	0	0	0	27,92	75,23	105,7	0	0	1854,42	39,06	369,74	157,82
7,07	8,71	6,82	6,59	8,05	8,45	8,98	9,61	7,87	8,1	8,49	8,91	10,5	11,88	19,41	56,32	109,96	52,3	78,94	29,08
22,77	23,06	27	28,1	30,43	31,86	31,29	33,28	36,19	39,87	43,38	45,1	50,13	55,4	33,87	51,23	196,07	74,9	115,27	76,47
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	25,12	25,08	69,71	29,39	30,55	23,71
66,77	43,52	1,73	0,41	57,56	78,52	32,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1138,77	100,33	383,2	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	233,37	140,3	927,2	300,7	525,88	184,54
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	313,42	380,86	1354,51	473,46	430,53	361,16
23,49	18,23	22,72	20,31	24,54	26,76	20,65	21,25	20,86	25,27	25,94	26,68	30,87	34,13	117,94	170,46	724,38	248,41	345,38	186,85
0	0	0	0	0	0	10,45	9,12	0	0	0	0	0	0	673,42	2156,68	3307,53	1051,25	1109,16	837,63
0	4,54	2,44	3,04	1,41	0	0	0	0	0	0	0	0	0	22,26	32,65	72,43	41,12	41,47	32,59
13,5	17,1	17,49	19,85	21,56	22,31	24,74	26,93	29,37	31,92	36,08	39,8	45,14	51,94	63,96	93,78	155,17	80,14	88,82	68,07
4,53	5,17	3,73	2,7	7,94	5,52	3,52	5,14	2,82	1,89	0,45	1,22	2,91	4,04	11,51	78,27	285,23	72,71	94,09	59,23
1,12	8,31	8,85	4,82	5,38	5,62	5,92	7,29	4,79	5,05	5,59	9,5	10,39	12,81	43,07	41,92	141,39	58,98	84,48	43,17
9,78	11,74	10,1	11,47	19,85	15,8	7,98	8,65	7,13	8,68	9,12	8,1	11,51	13,24	98,75	111,95	525,66	201,2	304,83	141,85
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	278,06	279,29	634,51	84,28
1,79	2,77	2,95	3,79	5,38	7,05	6,85	8,36	8,98	9,81	10,81	11,9	14,29	16,46	31,35	30,27	139,02	56,06	63,98	35,26
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	133,58	129,09	729,3	285,74	284,39	175,91
0	9,37	11,52	0	7,69	9,43	0	0	0	0	5,4	2,42	0	0	51,14	51,24	537,96	205,63	603,3	151,53
14,32	64,42	44,82	3,91	6,24	3,87	1,1	1,03	1,15	1,87	0,55	1,44	3,33	2,86	72,23	78,09	439,99	189,39	297	115,18
25,97	21,27	62,97	78,35	97,58	124,06	72,53	32,46	0	0	0	0	0	0	0	0	2022,97	431,21	555,34	253,67
15,2	17,18	18,03	21,03	23,53	24,25	26,58	28,3	31,36	33,93	37,64	41,04	45,7	52,27	36,13	47,09	78,29	48,31	51,86	35,34
34,82	16,81	25,01	23,56	28,85	30,86	12,03	8,75	7,91	14,33	7,66	4,78	5,71	7,94	184,77	195,13	1212,97	374,28	560,83	372,36
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	91,09	150,2	394,81	125,76	143,35	134,33
18,82	8,21	11,59	2,59	0,46	0	0	0	0	0	0	0	0	0	187,11	156,52	713,78	258,04	330,78	281,71
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	117	203,94	888,63	335,21	726,65	3963,98
9,83	9,56	12,16	17,33	17,08	14,06	7,56	9,93	2,31	1,95	6,65	6,17	10,15	16,77	123,21	168,9	988,97	419,28	797,1	268,92
20,33	21,93	12,13	2,78	9,06	15,74	0	0	0	0	0	0	0	0	297,91	288,96	1924,16	540,55	743,52	455,18

Matriz de dados: linhas (amostras) x colunas (deslocamentos químicos);

3,87	3,82	3,77	3,72	3,67	3,62	3,57	3,52	3,47	3,42	3,37	3,32	3,27	3,22	3,17	3,12	3,07	3,02	2,97	2,92
440,91	587,61	522,48	545,27	690,51	537,09	565,97	428,15	394,42	306,82	328,3	638,52	592,45	322,37	279,35	281,14	1939,25	456,04	288,86	318,45
1969,36	2443,13	2139,77	1899,99	2280,9	1434,95	1626,68	885,15	684,56	267,21	338,09	2836,91	1532,15	826,17	652,63	386,37	8617,92	787,98	157,39	207,95
580,57	988,39	727,71	647,37	939,8	561,69	636,63	315,54	296,42	136,55	190,58	689,06	639,08	347,47	276,54	202,13	3466	420,07	142,01	131,59
509,8	913,01	637,02	576,13	852,11	475,34	539,89	229,31	224,5	74,22	156,48	673,89	558,78	296,86	244,78	216,55	3476	217,56	30,03	42,65
417,08	691,17	495,53	431,1	651,86	321,03	1397,12	79,27	206,34	65,58	50,99	313,86	695,26	220,3	93,38	0	3101,77	0	0	0
37,94	56,11	45,14	44,73	57,72	42,47	30,74	11,49	21,29	11,25	12,65	56,37	66,05	32,73	23,71	45,47	229,1	13,12	4,88	4,94
83,23	98	97,97	97,31	111,6	75,87	59,11	38,56	28,6	18,74	28,87	49,82	69,49	43,2	35,13	29,56	229,79	63,9	8,78	6,65
27,46	33,54	35,09	35,33	73,73	39,34	25,65	22,86	16,99	14,24	38,36	27,2	32,3	19,56	14,34	16,67	71,04	22,48	11,38	11,04
33	280,09	366,17	307,33	379,32	226,17	574,01	156,54	171,3	8,7	2,27	96,83	660,77	316,73	65,66	0	2151,71	17,98	0	28,63
256,84	447,86	374,59	301,54	589,98	352,36	371,98	222,53	250,05	169,31	233,23	319,05	375,06	178,41	154,31	63,46	1348,97	305,97	121,41	121,54
515,19	814,02	635,12	942,28	1626,57	635,52	485,43	467,35	342,06	284,93	383	476,99	734,93	707,19	282,23	243,29	1727,71	282,9	173,86	173,77
221,83	320,27	359,66	287,37	311,13	181,96	175,75	117,16	97,89	72,07	84,15	157,46	249,06	200,9	104,81	86,61	981,3	76,92	31,88	38,72
1163,3	1429,49	1632,48	1404,6	1784,18	865,81	604,17	405,88	389,74	261,08	495,74	2118,41	749,47	789,02	452,27	1140,78	5894,96	342,74	105,82	108,89
43,34	52,12	57,32	47,72	48	32,41	31,52	20,18	18,12	13,54	16,64	22,34	26,73	18,17	21,91	20,2	86,18	13,92	11,03	14,59
78,43	97,89	95,52	94,39	94,38	65,87	60,42	36,1	37,93	36,09	51,39	55,34	58,81	47,62	49,09	70,95	200,71	27,4	17,43	18,42
88,88	146,24	128,49	124,97	156,06	93,67	70,48	48,74	46,14	63,53	158,34	87,98	114,38	72,16	52,6	47,29	496,27	79,38	31,97	28,75
46,37	49,48	73,75	71,18	105,53	62,96	66,45	41,11	29,4	16,69	30,25	54,98	94,89	23,65	38,23	44,25	469,5	39,09	13,5	25,76
167,57	222,58	254,94	196,29	234,05	147,35	136,14	92,54	91,51	57,01	87,33	159,47	174,42	108,32	95,99	70,59	700,93	75,81	32,71	36,32
109,58	118,48	166	156,07	210,83	128,83	114,98	66,46	39,07	14,18	57,23	87,48	61,58	71,26	50,69	38,08	420,22	63,82	18,97	15,52
36,46	46,38	73,77	51,03	58,03	34,11	28,35	20,5	19,82	16,48	24,65	32,44	38,78	26,63	22,82	19,84	161,22	52,38	11,34	8,92
195,73	411,4	399,5	269,78	309,11	187,16	176,8	115,1	99,4	86,68	82,67	185,92	251,27	164,52	114,4	83,38	868,37	193,94	46,17	53,46
159,58	179,68	218,19	188,63	271,43	140,4	97,83	60,46	50,14	19,53	16,89	62,71	196,36	57,72	76	22,92	723,95	92,67	0	0
120,19	156,73	208,64	192,7	305,8	151,35	99,49	74,04	64,78	60,87	312,22	94,87	180,26	101,94	92,61	60,75	531,91	140,74	48,93	43,57
402,47	608,97	1018,13	707,15	831,21	415,66	463,88	277,19	257,74	137,37	206,32	504,39	707,95	150,07	190,86	80,04	2935,78	44,67	0	30,99
41,06	43,4	45,64	47,36	46,68	32,76	28,26	20,17	18,17	20,74	37	39,47	38,5	22,23	29,42	40,44	88,44	9,55	8,54	9,43
376,55	508,58	520,61	436,65	539,51	343,64	351,88	215,25	204,57	121,15	169,81	363,75	552,6	276,13	245,28	181,93	2666,71	575,11	118,55	137,03
174,29	210,99	198,05	248,68	309,19	162,96	125,37	84,3	73,79	54,31	68,77	88,64	118,19	94,33	69,12	66,83	566,09	64,29	34,19	31,58
298,77	318,28	366,5	337,38	494,86	380,06	241,71	189,25	176,45	139,21	112,95	147,21	361,42	203,12	137,56	112,81	831,79	233,96	92,17	78,04
4505,37	5396,96	5716,4	5639,42	1240,04	720,95	3000,72	5646,64	9904,65	6149,95	1402,02	944,15	4982,59	1823,41	374,54	280,82	1918,79	286,34	140,78	197,56
314,13	361,97	371,17	349,82	458,36	318,33	325,67	211,72	153,43	101,88	114,11	257,54	297,71	197,6	148,01	161,03	1345,28	302,63	135,89	115,94
605,81	1052,57	730,09	701,43	914,81	586,49	517,72	311,46	259,45	200,32	773,78	413,93	504,65	270,01	271,92	159,99	2658,37	304,13	139,99	141,58

Matriz de dados: linhas (amostras) x colunas (deslocamentos químicos);

2,87	2,82	2,77	2,72	2,67	2,62	2,57	2,52	2,47	2,42	2,37	2,32	2,27	2,22	2,17	2,12	2,07	2,02	1,97	1,92
334,04	365,28	457,03	541,02	465,93	426,67	594,18	527,57	441,75	401,57	416,76	419,25	477,51	530,24	509,86	460,44	529,27	485,45	624,86	1016,51
227,68	354,68	731,16	1241,44	226	249,91	1103,09	797,29	488,33	297,82	495,27	528,11	635,19	456,12	649,4	717,5	1383,65	669,49	786,88	824,89
94,16	99,76	143,13	372,8	325,53	114,97	394,33	301,04	214,34	128,43	278,81	235,67	333,18	222,05	290,6	267,2	354,26	243,38	236,95	237,41
23,3	40,82	109,51	319,82	257,45	78,46	342,99	249,07	165,65	86,78	247,86	200,44	291	186,68	253,49	232,03	314,91	200,29	198,18	193,8
8,22	47,68	131,58	298,22	169,6	0	216,16	153,82	127,82	15,89	118,56	64,91	176,65	46,35	179,24	201,34	349,63	115,76	65,98	86,14
4,02	4,74	12,48	21,72	19,45	11,67	25,22	17,52	13,5	8,37	23,24	24,43	23,15	10,12	17,42	20,43	27,48	13,67	14,94	13,63
6,52	8,19	10,03	19,51	7,23	5,85	9,35	16,3	18,42	15,28	20,94	20,46	23,18	27,63	27,55	24,47	46,85	32,78	19,12	18,46
7,97	8,81	8,58	15,23	13,4	7,24	12,94	11,53	11,54	10,21	7,93	8,4	10,81	11,58	9,2	7,49	11,49	9,45	6,55	7,44
4,75	0	0	277,41	424,07	0	488,27	264,16	101,34	0	39,63	13,41	63,74	44,82	120,83	91,43	236,17	106,99	70,14	128,95
125,84	121,38	98,01	301,25	371,58	72,72	341,22	249,25	134,29	77,22	152,4	138,73	214,77	95,89	134,83	147,86	235,21	130,31	129,17	162,95
134,06	138,77	147,14	234,41	147,52	121,84	144,01	150,12	162,35	128,23	162,4	144,25	193,3	129,23	218,91	146,81	247,8	183,49	120,55	120
41,75	38,2	52,67	90,93	56,9	33,38	73,36	74,92	74,21	47,88	65,53	52,49	65,54	69,34	85,21	81,26	140,52	73,72	63,65	63,05
111,57	250,32	733,8	1003,66	507	971,34	679,35	373,7	317,11	252,69	595,23	580,75	646,64	271,03	403,88	520,8	624,39	371,55	405,09	305,83
10,67	9,38	12,98	25,74	28,57	11,07	26,95	19,25	11,78	8,79	9,64	9,06	10,19	11,77	12,08	12,68	18,11	11,88	10,3	10,36
18,55	19,36	23,65	27,08	20,6	17,38	29,02	28,92	26,23	22,31	34,26	30,3	31,2	24,2	32,56	41,09	48,23	31,11	24,05	23,88
24,56	28,5	40,03	73,3	67,84	34,71	68,26	49,89	36,82	29,81	53,78	46,58	54,68	36,71	42,64	49,88	71,31	47,46	43,01	40,7
21	17,32	15,88	42,48	47,44	12	48,71	35,42	22,08	16,04	43,85	26,12	43,13	24,26	25,76	24,29	36,49	50,3	42,14	74,81
40,72	40,46	47,86	90,26	76,29	29,41	82,85	69,12	55,31	37,65	59,9	49,27	61,59	48,32	63,18	66,32	119,23	68,65	53,31	59,23
12,15	12,21	15,48	75,25	91,06	6,82	87,43	61,6	25,55	7,77	60,1	36,17	48,77	54,77	21,9	17,11	50,16	16,78	3,86	8,09
6,79	8,05	8,48	19,04	16,53	5,37	16,73	14,84	12,69	8,58	14	13,18	17,7	10,04	11,67	14,59	23,46	16,9	11,49	11,16
45,06	46,73	49,64	130,21	114,96	43,12	120,55	97,36	79,58	55,69	75,09	70,18	93,05	64,75	76,1	76,65	103,3	73,93	59,7	66,81
0	4,52	9,68	92,48	107,31	2,09	113,13	75,72	32,48	22,39	69,46	39,89	70,28	45,23	47,33	44,97	93,53	51,31	44,13	60,06
42,82	41,49	42,79	64,64	45,45	27,92	49,23	45,57	39,17	33,2	42,5	41,09	45,53	39,67	40,86	42,14	79,45	62,21	49,45	39,92
74,55	132,25	278,27	367,04	184,34	69,77	334,53	227,96	139,27	75,54	151,17	139,49	216,54	138,2	175,96	186,75	318,66	130,79	106,52	120,35
7,81	7,29	11,92	23,03	25,8	13,34	25,34	17,35	10,7	7,77	11,11	11,81	13,79	14,25	16,16	14,48	19,35	12,27	8,73	9
95,79	125,03	129,62	273,34	256,87	87,06	268,41	218,06	178,57	136,35	149,12	130,65	161,79	198,57	192,16	174,55	279,83	204,58	148,74	149,35
31,17	32,34	50,3	76	57,62	31,54	72,28	65,68	56,06	46,1	90,08	69,13	74,72	61,42	67,84	69,38	98,14	64,83	51,89	48,48
71,68	83,98	78,01	115,27	63,42	53,15	63,84	73,04	85,43	70,98	137,95	102,87	159,12	146,87	398,21	145,37	188,9	127,84	115,09	120,09
161,35	123,92	122,73	311,2	340	100,67	353,09	270,31	211,38	154,08	226,75	172,1	212,05	168,66	172,95	157,55	248,14	150,54	135,84	260,48
97,72	106,03	105,91	198,53	204,25	95,14	208,68	174,59	143,6	96,77	141,17	137,07	176,65	150,21	161,83	155,91	221,22	159,16	133,65	123,79
100,82	131,3	128,33	295,75	244,9	96,32	227,29	197,53	168,03	140,16	302,06	219,86	287,54	171,44	201,16	232,75	408,95	246,57	215,54	215,13

Matriz de dados: linhas (amostras) x colunas (deslocamentos químicos);

1,87	1,82	1,77	1,72	1,67	1,62	1,57	1,52	1,47	1,42	1,37	1,32	1,27	1,22	1,17	1,12	1,07	1,02	0,97	0,92
1484,9	2022,53	2357,59	2352,99	2106,4	1526,27	924,86	385,22	22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	19,78
420,36	396,85	605,44	590,04	408,08	472,55	1032,65	865,77	741,61	400,53	548,23	480,44	598,46	560,84	319,84	195,85	140,53	122,25	292,8	369,83
168,75	153,69	159,3	157,73	161,48	137,99	159,04	156,95	173,49	139,95	208,69	226,87	294,37	311,31	193,95	123,72	105,71	73,96	116	186,71
127,76	117,68	126,1	126,77	130,91	109,63	132,51	134,87	148,38	118,88	193,31	206,24	272,52	278,98	149,99	88,94	73,06	48,2	95,93	162,22
38,38	46,77	50,11	49,44	58,12	33,17	39,79	107,07	97,23	46,7	149,43	147,12	164,96	189,03	78,96	26,89	9,39	21,16	69,45	100,69
8,03	6,53	6,4	6,63	6,43	5,79	7,32	9,67	11,91	8,71	12,6	8,26	9,33	8,23	4,55	3,8	2,08	2,03	6,95	9,04
16,73	18,75	17,78	16,12	16,2	13,98	13,35	12,78	12,81	11,45	16,81	18,22	26,08	25,23	19,87	7,34	4,09	3,74	8,64	12,96
5,6	5,52	5,66	4,24	4,93	3,79	3,99	3,73	2,85	2,96	5,1	3,81	3,15	35,81	48,82	14,14	6,02	4,17	4,74	5,3
9,48	0	30,04	66,43	43,05	27,38	29,11	102,34	89,79	43,99	129,18	113,44	104,96	80,29	37,81	9,12	0	0	24,03	46,9
101,47	88,85	104,64	108,93	104,66	80,51	79,04	92,27	118,65	82,2	118,67	117,68	123,31	158,29	102,65	75,23	63,05	51,74	74,22	98,22
92,74	98,55	92,9	85,62	88,36	75,01	72,36	70,71	67,08	61,62	103,01	135,33	392,75	1512,23	912,06	130,74	99,78	72,03	101,56	128,93
49,75	45,18	42,21	41,94	42,41	39,81	44	50,98	53,89	47,58	68,82	66,8	90,68	81,47	50,75	38,35	22,46	13,37	29,62	45,36
185,71	167,08	192,41	202,38	168,47	161,79	172,26	158,69	189,39	181,34	265,24	278,15	453,11	349,5	144,49	119,72	71,38	67,7	141,65	184,84
7,75	9,01	8,57	7,47	7,73	7,19	7,81	7,51	8,71	6,41	7,76	9,9	10,44	10,09	13,74	4,72	3,15	3,15	4,65	5,7
19,53	20,48	20,87	18,14	16,19	14,97	14,39	15,27	16,46	14,01	18,05	16,8	17,36	15,79	12,01	7,26	6,23	6,15	10,77	10,41
31,54	29,38	29,11	29,71	28,22	24,54	23,77	26,79	31,68	26,87	33,04	32,6	49,63	50,92	29,64	20,19	17,51	15,33	21,76	26,71
18,54	42,62	23,01	13,91	25,67	18,78	11,31	12,7	13,44	17,66	66,7	48,92	28,33	33,91	24,54	12,86	8,94	5,33	8,93	11,95
44,71	42,76	44,82	43,33	40,28	33,81	32,14	37,38	43,38	34,52	46,31	44,99	58,11	45,24	30,99	22,38	13,37	11,95	26,27	33,27
0	0	0	0	0,64	0	0	0	3,35	2,49	13,84	22,35	30,38	52,73	30,56	8,71	2,12	1,18	6,77	16,15
7,45	7,03	7,1	6,11	6,17	4,91	3,74	4,38	5,65	4,06	5,99	6,15	9,13	7,98	4,45	2,45	1,29	1	3,56	5,17
46,72	45,5	48,87	46,84	46,17	41,43	45,19	46,58	54,74	45,12	55,21	54,38	75,79	61,67	34,28	27,05	24,18	15,94	28,35	43,62
28,82	30,39	44,96	40,61	32,44	21,68	23,65	34,59	42,71	26,52	39,09	43,27	57,79	45,87	25,8	15,5	9,03	4,1	17,72	28,78
31,16	40,82	44,29	33,88	38,01	30,73	27,05	26,17	26,53	24,31	33,43	32,6	49,72	161,94	176,71	42,54	29,33	22,03	26,02	33,36
78,03	106,38	128,89	102,33	101,04	76,6	88,47	112,95	106,65	70,31	152,84	133,98	179,14	132,17	61,67	8,03	0	3,55	66,49	99,14
6,56	8,1	8,48	7,13	6,58	4,65	5,08	5,49	5,26	5,28	8,36	10,8	12,8	20,34	15,08	4,35	2,59	3,04	4,93	6,33
134,7	121,84	121,08	121,62	122,12	116,54	118,74	123,39	129,64	107,58	151,91	156,3	178,3	168,29	101,61	77,9	57,33	51,41	87,81	111,99
40,31	43,59	45,07	41,99	41,16	38,02	36,55	35,62	34,18	30,2	39,27	45,97	63,74	170,62	81,94	27,46	20,29	19,06	26,89	34,79
100,89	81,82	74,94	69,74	75,15	69,83	68,05	67,39	70,06	63,96	93,46	98,29	117,49	98,55	79,21	63,18	39,67	36,54	49,35	87,3
95,38	94,73	99,37	103,03	91,54	82,31	84,86	136,7	130,7	82,9	213,38	208,3	161,13	129,1	66,67	65,73	63,76	46,94	78,22	94,82
98,04	90,33	87,17	80,69	91,34	75,59	73,55	70,28	74,95	60,12	92,7	110,24	127,59	125,5	100,43	80,31	63,63	47,56	67,03	97,53
152,71	156,69	157,17	207,18	159,39	140,69	141,13	142,27	165,57	160,16	221,43	235,59	273,52	224,64	135,96	96,51	68,44	69,91	117,55	141,27