

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



MICHELE MARIA GONÇALVES DE GODOY

DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA
HEPATITE C UTILIZANDO RESSONÂNCIA
MAGNÉTICA NUCLEAR DE ^1H EM AMOSTRAS DE
URINA

RECIFE - 2008

MICHELE MARIA GONÇALVES DE GODOY



**DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA HEPATITE C
ATRAVÉS DA RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ^1H EM
AMOSTRAS DE URINA**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde da Universidade
Federal de Pernambuco, como
requisito parcial para a obtenção do
grau de Mestre.

ORIENTADORES

Prof. Dr. Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto

Professor Adjunto do Departamento de Medicina Clínica do Centro de Ciências da
Saúde da Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a Dr. Fernando Hallwass

Professor Adjunto do Departamento de Química Fundamental do Centro de Ciências
Exatas e da Natureza da Universidade Federal de Pernambuco

RECIFE

2008

Godoy, Michele Maria Gonçalves de.

Diagnóstico da infecção pelo vírus da hepatite C utilizando ressonância magnética nuclear de ^1H em amostras de urina / Michele Maria Gonçalves de Godoy. – Recife : O Autor, 2009.

70 folhas : il., tab. e gráf.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Ciências da Saúde, 2009.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Hepatite C. 2. HCV. 3. Metabonômica. 4. RMN.
I. Título.

616.36-002

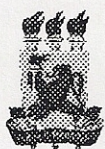
CDU (2.ed.)

UFPE

616.362 3

CDD (21.ed.)

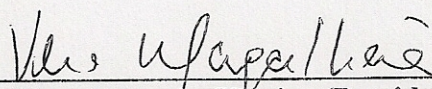
CCS2009-149



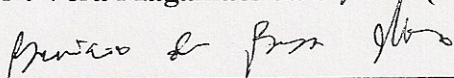
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

RELATÓRIO DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MICHELE MARIA GONÇALVES DE GODOY, ALUNA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE, TURMA INICIADA EM 2006 (DOIS MIL E SEIS)

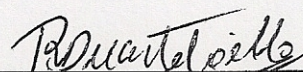
Às nove horas, do dia catorze de agosto de dois mil e oito, no Auditório do Prédio das Pós-Graduações do CCS, tiveram início, pelo Coordenador do Curso, Prof^o. Dr. Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto, o trabalho de Defesa de Dissertação, da mestranda Michele Maria Gonçalves de Godoy, para obtenção do **Grau de Mestre em Ciências da Saúde** do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco. A Comissão Julgadora eleita pelo Colegiado do Curso e homologada pelas Câmaras de Pesquisa e Pós-Graduação foi formada pelos professores: **Dr^a. Vera Magalhães da Silveira**, na qualidade de Presidente, do Departamento de Medicina Tropical da UFPE, **Dr. Benício de Barros Neto**, do Departamento de Química Fundamental da UFPE e **Dr^a. Maria Rosângela Cunha Duarte Coelho**, do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFPE. A Dissertação apresentada versou sobre: “Diagnóstico da Infecção pelo Vírus da Hepatite C Através da Ressonância Magnética Nuclear de ¹H (Rmn¹H) em Amostras de Urina”, tendo como orientador o Prof.^o Dr. Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto, do Departamento de Medicina Clínica da UFPE. Após a explanação de 30 minutos feita pela candidata, justificando a escolha do assunto, objetivos da Dissertação, metodologia empregada e resultados obtidos, ilustrados com diapositivos, foram realizadas as arguições pela Banca Examinadora, todos no tempo regulamentar e respondido pela candidata. Ao término das arguições, a Banca avaliou em secreto e proferiu o seguinte resultado: Aprovado. Nada mais havendo a registrar, foram encerrados os trabalhos, do que, para constar, foi elaborado o presente relatório que vai assinado pelo Senhor Presidente e demais membros da Comissão Julgadora. Recife, 14 de agosto de 2008.



Prof^a. Dr^a. Vera Magalhães da Silveira (Presidente)



Prof. Dr. Benício de Barros Neto



Prof^a. Dr^a. Maria Rosângela Cunha Duarte Coelho

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Amaro Henrique Pessoa Lins

VICE-REITOR

Prof. Gilson Edmar Gonçalves e Silva

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DIRETOR

Prof. José Thadeu Pinheiro

HOSPITAL DAS CLÍNICAS

DIRETOR SUPERINTENDENTE

Prof. George da Silva Telles

DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLÍNICA

Prof^a. Jocelene Madruga

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA INTERNA

COORDENADOR

Prof. Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto

VICE-COORDENADORA

Prof^a. Ana Lúcia Coutinho Domingues

CORPO DOCENTE

Prof^a. Ana Lúcia Coutinho Domingues

Prof^a. Ângela Luiza Pinto Duarte

Prof. Antônio Roberto Leite Campelo

Prof. Brivaldo Markman Filho

Prof. Edgar Guimarães Victor

Prof. Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto

Prof. Ênio Torreão Soares Castellar

Prof. Fernando Tarcísio Miranda Cordeiro

Prof^a. Heloísa Ramos Lacerda de Melo

Prof. Hilton de Castro Chaves Jr.

Prof. José Ricardo Barros Pernambuco

Prof. Lurildo Cleano Ribeiro Saraiva

Prof^a. Maria de Fátima Militão de Albuquerque

DEDICATÓRIA

Aos meus pais que sempre me impulsionaram a trilhar os caminhos da ciência, incansáveis no incentivo, no apoio, possibilitando a realização deste trabalho.

À Stenio, meu marido, pela imensa compreensão, ajuda constante e eterno amor.

Às minhas filhas, Carolina, Mariana e Beatriz, fonte da minha energia e paixão.

AGRADECIMENTOS

Aos pacientes que com boa vontade, concordaram em participar deste estudo.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto, pelas orientações, confiança, dedicação e ajuda inestimável na realização deste estudo.

À Prof. Dra. Simone Maria Cruz Gonçalves pelo incentivo e valiosa contribuição à execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Fernando Hallwass pelos ensinamentos da Ressonância Magnética Nuclear.

Ao Prof. Dr. Alfredo Simas cuja experiência científica muito acrescentou ao nosso estudo.

À Ricardo Oliveira da Silva, por suas pertinentes observações, alto astral, incentivo e ajuda na realização dos espectros de RMN, essenciais para o trabalho.

Ao Prof. Dr. Benício de Barros Neto pela sua amizade, disponibilidade, acolhimento nas horas difíceis, ensinamentos e realização da PCA.

Ao Laboratório de Análises Clínicas do Hospital das Clínicas – Universidade Federal de Pernambuco, em especial à Dra. Izolda Maria Fernandes possibilitando a coleta, realização dos exames.

À Dra. Cláudia Ângela, médica da UTI, pelo apoio e compreensão.

Aos colegas do mestrado pela amizade, incentivo, convívio agradável facilitando nossa jornada de aulas e tornando possível o término deste trabalho.

À Andréa Rocha por ter feito a análise estatística, permitindo concluirmos o estudo.

Aos Médicos Residentes do Ambulatório de Hepatites do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, a ajuda na seleção dos pacientes.

Às secretárias do mestrado Andréia e Esmeralda, sempre solícitas e solidárias com os mestrandos.

E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste estudo.
MUITO OBRIGADA!

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	09
Referências Bibliográficas	13
ARTIGO DE REVISÃO	
Análise Metabonômica Baseada na Ressonância Magnética Nuclear de ^1H na Prática Médica	16
Resumo	17
Abstract	18
Introdução	19
Metabonômica	19
Ressonância Magnética Nuclear	22
Aplicações Clínicas	26
Referências Bibliográficas	30
ARTIGO ORIGINAL	
Diagnóstico da Infecção pelo Vírus da Hepatite C Através da Ressonância Magnética Nuclear de ^1H em Amostras de Urina	35
Resumo	36
Abstract	37
Introdução	38
Material e Métodos	
População do Estudo	40
Análise das Amostras	41
Espectroscopia de RMN^1H	41
Análise estatística e redução dos dados dos espectros de RMN^1H	42
Resultados	44
Discussão	45
Referências Bibliográficas	47
Tabela 1	51
Tabela 2	52

Gráfico 1	53
------------------------	-----------

ANEXOS

Anexo A – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa	55
Anexo B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	57
Anexo C – Questionário utilizado para obtenção dos dados da pesquisa	59
Anexo D – Instruções para publicação na <i>CLINICS</i>, Revista do Hospital das Clínicas da FMUSP	60
Anexo E – Instruções para publicação do artigo original no <i>JOURNAL OF VIRAL HEPATITIS</i>.....	65

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

ARTIGO DE REVISÃO - Análise Metabonômica baseada na Ressonância Magnética Nuclear de ^1H na Prática Médica

Figura 1	Espectros de RMN- ^1H das amostras de urina (A) e de soro (B), obtidos num espectrômetro de 300 MHz, representativos da região alifática de alguns metabólitos do espectro.....	24
-----------------	--	----

ARTIGO ORIGINAL - Diagnóstico da Infecção pelo Vírus da Hepatite C através da Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (RMN ^1H) em Amostras de Urina

Tabela 1	Médias dos níveis séricos divididas pelo valor máximo da normalidade (VMN-1) das enzimas de 66 indivíduos, sendo 34 com hepatite C (doença) e 32 com anti-HBc positivo (controle).....	51
Tabela 2	Resultados do modelo metabonômico pela análise dos espectros de RMN ^1H de amostras de urina associada a ferramentas de estatística multivariada de 66 indivíduos, sendo 34 com hepatite C (doença) e 32 com anti-HBc positivo (controle).....	52
Gráfico 1	Classificação das amostras de urina de 34 pacientes com infecção pelo vírus da hepatite C (grupo doença) e de 32 indivíduos com anti-HBc positivo (grupo controle), de acordo com os escores obtidos no modelo metabonômico.....	53

ABREVIATURAS

Anti-HBc	– Anticorpo anti-centrômero vírus da hepatite B
Anti-HBs	– Anticorpo anti-antígeno de superfície do vírus da hepatite B
Anti-HCV	– Anticorpo contra o HCV
AIDS	– Síndrome da imunodeficiência adquirida
ALT	– Alanina Aminotransferase
AST	– Aspartato Aminotransferase
CCEN	– Centro de Ciências Exatas e da Natureza
CCS	– Centro de Ciências da Saúde
DQF	– Departamento de Química Fundamental
EIE	– Enzima Imunoensaio
GGT	– Gama glutamiltransferase
^1H	– Próton de Hidrogênio
HBsAg	– Antígeno de superfície do vírus da hepatite B
HCV	– Vírus da hepatite C
HCV-RNA	– Ácido ribonucléico do HCV
HC-UFPE	– Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco
HIV	– Vírus da Imunodeficiência Humana
Ig G	– Imunoglobulina G

LCR	– Líquido céfalo-raquiano
PC	– Componente principal
PCA	– Análise de componentes principais
PCR	– Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês <i>Polimerase Chain Reaction</i>)
ppm	– partes por milhão
RIBA	– <i>Recombinant Immunoblot Assay</i>
RMN	– Ressonância Magnética Nuclear
VMN	– Valor máximo de referência
RNA	– Ácido Ribonucléico
RT-PCR	– <i>Reverse Transcription Polimerase Chain Reaction</i>
UFPE	– Universidade Federal de Pernambuco

APRESENTAÇÃO

APRESENTAÇÃO

A infecção pelo vírus da hepatite C (HCV) representa problema de saúde tanto no mundo desenvolvido como nos países em desenvolvimento.⁽¹⁾

Na maioria dos casos é difícil estabelecer a história natural da infecção pelo HCV devido ao seu início silencioso e à ausência de sintomas durante anos. Após a contaminação, a infecção pelo HCV num pequeno percentual dos casos (15% a 45%) é autolimitada, evoluindo para cura. Na maioria das vezes (55% a 85%), contudo, ela evolui para a cronicidade, com persistência da viremia.^(2,3)

Os testes utilizados na rotina, tanto para rastreamento como para confirmação diagnóstica da infecção pelo HCV, são divididos em dois grupos: métodos sorológicos para detecção de anticorpos e moleculares para identificação de partículas virais no sangue periférico.

A pesquisa do anti-HCV no soro é realizada pelo ensaio imuno-enzimático (EIE) de 3ª geração, que apresenta elevadas sensibilidade e especificidade, chegando a diagnosticar aproximadamente 97% dos casos. Todavia a identificação de anticorpos não distingue infecções agudas, crônicas ou resolvidas, sendo necessários outros testes para pesquisar a própria viremia.^(4,5) A detecção do HCV-RNA, que reflete infecção em curso, é realizada rotineiramente por reação em cadeia da polimerase (PCR).^(6,7)

Tanto a pesquisa do anti-HCV como a do HCV-RNA são realizadas no soro, o que torna necessária a punção de veia periférica por profissional habilitado. Além disso, o tempo prolongado para a realização da PCR, o risco potencial de contaminação e o alto custo limitam sua aplicação.⁽⁸⁾ Assim, um teste mais simples, rápido e de menor custo seria necessário para rastrear e identificar os pacientes infectados pelo HCV.

Ultimamente, observa-se crescente interesse na tecnologia metabonômica, por dispor da capacidade de diagnosticar doenças através da identificação de metabólitos que ocorrem no organismo durante agressão ambiental, patológica ou toxicológica.^(9,10)

A metabonômica envolve a geração de dados metabólicos de amostras de tecido ou biofluido, baseada principalmente na espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), uma das técnicas que fornece maiores informações da estrutura molecular átomo-específica. Tem ainda como vantagens requerer nenhuma ou mínima preparação da amostra, rapidez na sua execução, e pouca quantidade amostral.⁽¹¹⁾

Tipicamente, o espectro de RMN de hidrogênio-1 (^1H) de biofluidos, como urina e plasma, contém milhares de sinais provenientes de centenas de moléculas endógenas de muitas vias bioquímicas. O espectro é utilizado para detectar a resposta metabólica do organismo a determinada doença, toxina ou componente farmacêutico extraída desse complexo de dados, sujeito à presença da variação biológica natural, tornando difícil a interpretação das alterações pela análise visual. Portanto, geralmente, é necessária a aplicação da análise estatística multivariada, apropriada na redução da dimensão do grupo de dados, de maneira a obter informações bioquímicas latentes presentes no espectro.⁽¹²⁾ Geralmente é atribuída à quimiometria os métodos de análise estatística multivariada aplicada a dados químicos numéricos. Esses métodos podem ser divididos em duas categorias: não supervisionados e supervisionados.

As técnicas multivariadas não supervisionadas são usadas para estabelecer se existe algum agrupamento dentro do conjunto de dados. Esses métodos mapeiam as amostras de acordo com suas propriedades, sem o conhecimento das classes das amostras. Um dos métodos não supervisionados mais utilizado e facilmente aplicado é o de análise de componentes principais (PCA). Em uma PCA a matriz de dados originais é projetada em um subespaço definido por combinações lineares das variáveis originais com

máxima variância, isto é, com máxima informação.⁽¹³⁾ Assim, a primeira componente principal (PC1) é o eixo que descreve o máximo possível da variância no espaço multidimensional original, a segunda componente é ortogonal a (em termos estatísticos, não correlacionada com) PC1 e descreve o máximo de variância ainda não descrito por PC1, e assim por diante. As duas ou três primeiras PCs dão a melhor representação possível, em termos de variação bioquímica, do grupo de dados no respectivo subespaço (de duas ou três dimensões).

Os métodos supervisionados de análise usam a informação de classes para treinar um grupo de amostras de dados, otimizando a separação entre duas ou mais classes de dados. Essas técnicas incluem *soft independent modeling of class analogy (SIMCA)*, análise de K vizinhos mais próximos (*K-nearest neighbor analysis*), redes neurais, entre outros. Os métodos supervisionados requerem um segundo grupo de dados independentes para testar ou validar qualquer classe feita inicialmente usando o grupo treinado.⁽¹⁴⁾

A metabonômica tem se estabelecido como ferramenta analítica bem sucedida aplicada em diferentes campos, por exemplo, no estudo de processos patológicos e toxicidade de drogas e na detecção dos metabólitos de erros inatos do metabolismo.

Nosso projeto contou com a colaboração do Laboratório da Central Analítica do Departamento de Química Fundamental (DQF), onde foram realizadas as análises de RMN. Este é um projeto realizado em conjunto entre dois centros, o CCS e o CCEN, ou, mais especificamente, entre o Hospital das Clínicas e o Laboratório da Central Analítica.

O objetivo principal deste estudo foi identificar os pacientes com infecção pelo vírus da hepatite C (HCV), através da análise comparativa dos espectros de RMN de ^1H em amostras de urina de pacientes infectados e indivíduos saudáveis, atendidos no ambulatório

de Hepatites do Hospital das Clínicas – UFPE, no período de outubro de 2007 a março de 2008.

Desta pesquisa resultaram dois artigos que compõem esta dissertação de mestrado.

O primeiro deles consta em uma revisão da literatura sobre o tema ANÁLISE METABONÔMICA BASEADA NA RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR de ^1H NA PRÁTICA MÉDICA. Para tanto se buscaram, no banco de dados MEDLINE e SciELO, os artigos publicados no período de janeiro de 1998 a dezembro de 2007, escritos nos idiomas inglês ou português que avaliassem seres humanos e utilizassem biofluidos para análise em RMN de ^1H , sendo empregados os seguintes termos: metabonomics and ^1H NMR and nuclear magnetic resonance spectroscopy and disease.

O segundo artigo, original, intitulado: DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA HEPATITE C ATRAVÉS DA RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ^1H EM AMOSTRAS DE URINA. Configura um estudo piloto para avaliação de teste diagnóstico, através da análise comparativa dos espectros de RMN de ^1H em amostras de urina de indivíduos sadios e pacientes infectados pelo HCV.

O artigo de revisão será submetido à *CLINICS*, Revista do Hospital das Clínicas da FMUSP e o artigo original ao *JOURNAL OF VIRAL HEPATITIS*, ambos indexados nos bancos de dados MEDLINE, Lilacs e SciELO.

Referências Bibliográficas

1. World Health Organization. Global surveillance and control of hepatitis. Report of a WHO Consultation organized in collaboration with viral Hepatitis Prevention Board, Antwerp, Belgium. *J Viral Hepatol*. 1999;6:35-47.
2. Niederau C, Lange S, Heintges T et al. Prognosis of chronic hepatitis C: results of a large, prospective cohort study. *Hepatology*. 1998;28:1687-95.
3. Poynard T; Ratziau V; Opolon P; et al. Natural history of HCV infection. *Baillière Clinical Gastroenterol*. 2000;14:211-28.
4. Lopes EPA; Granato CH; Lanzoni V; Granero L; Baccala GP; Tomiyama H; et al. Evaluation of an enzyme immunoassay for hepatitis C virus antibody detection using a recombinant protein derived from the core region of hepatitis C virus genome. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*. 2000;95(5):717-720.
5. Gretch DR. Diagnostic tests for hepatitis C. *Hepatology*. 1997;26:43-47S.
6. Camacho R. Diagnóstico e monitorização laboratorial da infecção pelo vírus da hepatite C. *J Port Gastroenterol*. 2000;7:101-4.
7. Pawlotsky J, Lonjon I, Hézode C, et al. What strategy should be used for diagnosis of hepatitis C virus infection in clinical laboratories? *Hepatology*. 1998;27:1700-2.
8. Zaaijer HL, Cuypers HT, Reesink HW, Winkel IN, Gerken G, Lelie PN. Reliability of polimerase chain reaction for detection of hepatitis C vírus. *Lancet*. 1993;341:722-4.
9. Robertson DG; Reily MD, singler RE, Wells DF, Paterson DA, and Braden TK. Metabonomics: Evaluation of NMR and pattern recongnition technology for rapid in vivo screaning of liver and kidney toxicants. *Toxicol Sciencies*. 2000;57:326-337.
10. Nicholson JK, Connelly J, Lindon JC, Holmes E. Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function. *Nat Rev Drug Discover*. 2002;1:153-161.

11. Lindon JC, Holmes E, Bollard ME, Stanley EG, and Nicholson JK. Metabonomics technologies and their applications in physiological monitoring, drug safety assessment and disease diagnosis. *Biomarkers*. 2004;9:1-31.
12. Nicholson JK, Lindon JC, and Holmes E. Metabonomics: understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica*. 1999;29:1181-1189.
13. Jolliffe, IT. *Principal Component Analysis*. 2nd ed., Springer, 2002, New York.
14. Lindon JC, Holmes E, Nicholson JK. So what's the deal with metabonomics? *Anal Chem*. 2003;75:384A-391A.

ARTIGO DE REVISÃO

Análise Metabonômica Baseada na Ressonância Magnética Nuclear de ^1H na Prática Médica

Running head: Análise metabonômica por RMN de ^1H na prática médica

Michele Maria Gonçalves de Godoy¹, Edmundo Pessoa de Almeida Lopes², Fernando Hallwass³, Ricardo Oliveira da Silva³, Simone Maria da Cruz Gonçalves³

¹ Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Brasil.

² Departamento de Medicina Clínica - Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

³ Departamento de Química Fundamental - Centro de Ciências Exatas e da Natureza da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

Endereço para correspondência:

Michele Maria Gonçalves de Godoy

Rua Francisco Cunha, 206, apto. 2301, Boa Viagem.

CEP 51020-041, Recife - PE, Brasil.

E-mail: michelegodoy@oi.com.br

Resumo

A metabonômica constitui nova metodologia que vem em ascensão pelo seu importante papel na análise de materiais biológicos para o diagnóstico e o prognóstico de certas doenças, principalmente as crônico-degenerativas e as alterações genéticas, além do seu lugar frente à toxicidade por drogas. Refere-se à detecção, identificação, quantificação e classificação das mudanças metabólicas, tempo-relacionadas, integrada ao sistema biológico, numa visão global ao invés da avaliação da célula individualmente. Essa revisão visa introduzir o conceito da metabonômica baseada na utilização da espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio-1 (RMN ^1H), uma das ferramentas analíticas preferidas por apresentar a vantagem de ser técnica não destrutiva, rápida e requerer pouco ou nenhum pré-tratamento das amostras. Além disso, dispensa o uso de amostras padrões para a co-injeção e identificação dos compostos, necessitando, entretanto, de métodos estatísticos multivariados para a análise dos complexos espectros obtidos. Buscaram-se, no banco de dados MEDLINE e SciELO, os artigos publicados no período de janeiro de 1998 a dezembro de 2007, escritos nos idiomas inglês ou português, que avaliassem seres humanos e utilizassem biofluidos para análise em RMN de ^1H , sendo empregados os seguintes termos: metabonomics and ^1H NMR and nuclear magnetic resonance spectroscopy and disease. Os artigos publicados inicialmente estavam mais relacionados à investigação dos erros inatos do metabolismo e à toxicidade de drogas, sendo bastante aplicados à indústria farmacêutica. Recentemente, os estudos estão mais voltados ao diagnóstico e ao prognóstico das doenças crônico-degenerativas e infecciosas, um dos motivos para a elaboração desta revisão.

Palavras-chave: Metabonômica; Espectroscopia de ressonância magnética nuclear; RMN ^1H .

Abstract

Metabonomics is a new technology that is playing an increasing its role in the analysis of biological materials for disease diagnosis and prognosis, especially chronic-degenerative and genetic changes, and devaluation of drug toxicity. It is concerned with to the detection, identification, quantification and classification of metabolic changes, and is time-related and integrated with biological systems, yielding a global vision instead of evaluating individual cells. This review aims to introduce the concept of metabonomics based on the use of proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. This is one of the preferred analytical tools, presenting the advantage of being non-destructive, fast and requiring no chemical pre-treatment of samples. Moreover, it does not need co-injection of standard samples for the compound identification. On the other hand, it does require multivariate statistical methods for the analysis of the complex spectra data obtained. We did a search for articles published from January 1998 to December 2007 in the MEDLINE and SciELO database, written in English or Portuguese, to assess human biofluids for analysis using of ^1H NMR, and searched the keywords: metabonomics, ^1H NMR, nuclear magnetic resonance spectroscopy, and disease. The search revealed that the articles were of first more related to inherent metabolic errors and drug toxicity, and were mainly related to pharmaceutical industry research and development. Recently, the studies are more focused on diagnosis and prognosis of chronic-degenerative and infectious diseases.

Keywords: Metabonomics; ^1H NMR; Nuclear magnetic resonance spectroscopy.

Introdução

Uma nova metodologia para análise de materiais biológicos foi desenvolvida, a metabonômica, que vem desempenhando papel importante no diagnóstico e prognóstico de certas enfermidades, particularmente em doenças degenerativas e alterações genéticas, além de avaliar os efeitos da toxicidade de drogas.^{1,2}

Esta revisão tem como objetivo introduzir o conceito da metabonômica, sua aplicação à prática médica, baseada na utilização da espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio-1 (RMN de ^1H). Buscaram-se, nos bancos de dados MEDLINE e SciELO, os artigos publicados no período de janeiro de 1998 a dezembro de 2007, escritos nos idiomas inglês ou português, que avaliassem seres humanos e utilizassem biofluidos para análise em RMN de ^1H , sendo empregados os seguintes termos: metabonomics and ^1H NMR, nuclear magnetic resonance spectroscopy and disease.

Metabonômica

A metabonômica é definida como uma “medida quantitativa da resposta metabólica dinâmica e multiparamétrica dos organismos vivos às modificações fisiopatológicas ou genéticas”.^{3,4} Envolve a determinação do perfil, dinâmico e tempo dependente, dos metabólitos dentro do organismo e como ele se altera em decorrência de algum processo biológico. O termo tem origem grega “meta” significando mudança e “nomos” regras ou leis e foi criado por Jeremy Nicholson, Elaine Holmes e John Lindon do Imperial College of London para descrever a geração de modelos quimiométricos que têm capacidade para classificar as mudanças do metabolismo. Refere-se à detecção,

identificação, quantificação e classificação das mudanças metabólicas tempo-relacionadas, integrada ao sistema biológico, numa visão global ao invés da avaliação da célula individualmente.^{5,6}

Os materiais biológicos mais freqüentemente utilizados nesses estudos são os fluidos, alguns dos quais podem ser obtidos de maneira não invasiva, como a urina, ou de forma minimamente invasiva, como o soro/plasma. Contudo uma grande variedade de materiais, tais como líquido cefalorraquiano (LCR), seminal, sinovial, amniótico, bile, aspirados pulmonares, sobrenadantes de cultura celular e até amostras de tecido também podem ser utilizados.^{1,7}

Urina e plasma são amostras de fácil obtenção e propiciam uma visão do organismo como um todo, sendo apropriadas tanto para diagnóstico como para monitoração de condutas terapêuticas. Ao analisar o plasma, obtêm-se os dados do que ainda está ativo no sistema, enquanto, ao analisar a urina, obtêm-se informações daquilo que está sendo excretado pelo organismo. Em outras palavras: a análise do plasma fornece dados em tempo real, enquanto que aqueles disponíveis a partir da análise da urina habitualmente estão defasados no tempo. Apesar disso, a análise através da urina apresenta grande vantagem, em termos clínicos, pois o paciente pode ser reavaliado repetidamente de forma não invasiva, sobretudo aquele com enfermidade crônica.⁸

A estratégia metabonômica fundamenta-se num princípio básico dos seres vivos chamado homeostase. Quando um organismo é exposto a situações de estresse, a uma doença ou a algum agente químico sofre alterações na concentração e fluxo dos metabólitos endógenos, quebrando o equilíbrio, o que desencadeia ajustes do ambiente intra e/ou extracelular de forma a manter o meio interno constante. Essa resposta do organismo altera o perfil dos metabólitos endógenos nos biofluidos e, conseqüentemente a mudança dos espectros de RMN.⁹ Mesmo com a homeostase

celular mantida, respostas súbitas à toxicidade ou doenças são expressas na composição alterada do biofluido.

A análise dos biomateriais, por exemplo, pela espectroscopia de RMN de ^1H é capaz de gerar um perfil espectral dos metabólitos de baixo peso molecular, refletindo o estado metabólico do organismo. Cada biofluido tem uma composição bioquímica característica e única, que se altera em resposta ao estímulo fisiológico ou patológico, provendo uma “impressão digital” metabólica, a qual é específica da natureza ou sítio da agressão.^{5,9}

A maneira mais efetiva de obter as principais informações metabonômicas é pela combinação da espectroscopia de RMN com métodos estatísticos multivariados, métodos quimiométricos, necessários na interpretação do conjunto de dados obtidos.^{3,10}

A análise estatística dos espectros de RMN utilizando, por exemplo, técnicas como análise de componentes principais e análise de discriminantes, permite identificar mudanças no perfil de metabólitos endógenos dos biofluidos quando expostos a agentes químicos, hábitos alimentares ou estados patológicos.⁴

Além da espectroscopia de RMN, outros métodos podem ser utilizados para produzir o perfil metabólico dos biomateriais, como a espectrometria de massa (MS), a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC/MS), a cromatografia líquida de alta performance (HPLC) ou técnicas de espectroscopia óptica. A RMN e a MS são as melhores técnicas, na medida em que podem produzir rápida e adequadamente um conjunto de dados metabonômicos.¹¹ Esta revisão, entretanto, restringe-se aos trabalhos em que o perfil metabólico foi obtido exclusivamente pela espectroscopia de RMN de ^1H .

Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A espectroscopia de RMN é muitas vezes preferida em relação às outras ferramentas analíticas por apresentar a vantagem de constituir técnica não destrutiva, rápida, requerer pouco ou nenhum pré-tratamento, além de dispensar o uso de amostras padrões para a co-injeção e identificação dos compostos.^{4,7} A abundância natural do isótopo de hidrogênio-1 (99,98%) e a sua ocorrência no organismo fazem com que a RMN de ^1H seja a escolhida para gerar o perfil de biomateriais, embora existam outros isótopos, como o ^{13}C , o ^{31}P e o ^{15}N , que também poderiam ser utilizados.²

A espectroscopia de RMN fundamenta-se na interação dos núcleos atômicos com a radiação eletromagnética, quando estes estão sujeitos a um campo magnético. Os núcleos atômicos possuem uma propriedade chamada *spin*, que faz com que os mesmos se comportem como barras magnéticas muito pequenas. Na presença de um campo magnético, alinham-se a favor ou contra este campo, originando diferentes estados de energia. Quando se irradia a amostra com a correta radiofrequência, provoca-se a excitação dos spins que absorvem esta energia, posteriormente liberando-as e fornecendo o espectro de RMN, que é um registro gráfico correspondente a intensidade dessas absorções *versus* às frequências absorvidas.¹²

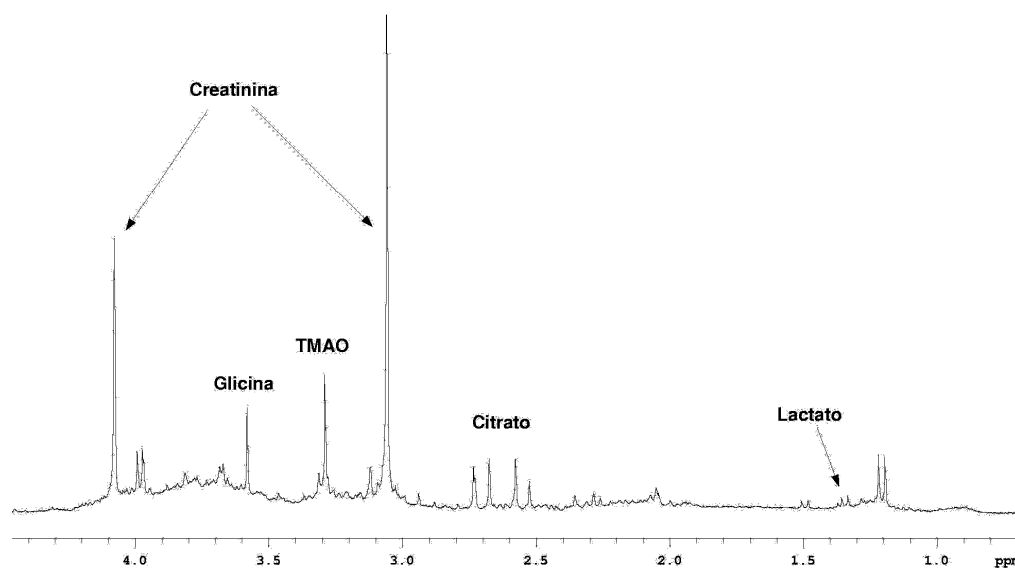
O espectro de RMN pode detectar vários componentes numa única medida e nele cada metabólito pode gerar um ou mais sinais (picos). A intensidade do sinal está relacionada à quantidade de *spins* e corresponde à concentração de determinado metabólito, refletindo alterações bioquímicas fisiológicas ou patológicas. Apesar da espectroscopia de RMN de ^1H ter seu papel original na elucidação das estruturas químicas, a técnica tem alcançado imenso e crescente valor em caracterizar as conseqüências de doenças, toxicidades por drogas ou modificações genéticas.¹³

Para exemplificar, a Figura 1 mostra os espectros de RMN de ^1H (300 MHz) de amostras de urina (A) e de soro (B) representativos da região alifática do espectro, onde alguns metabólitos estão identificados.

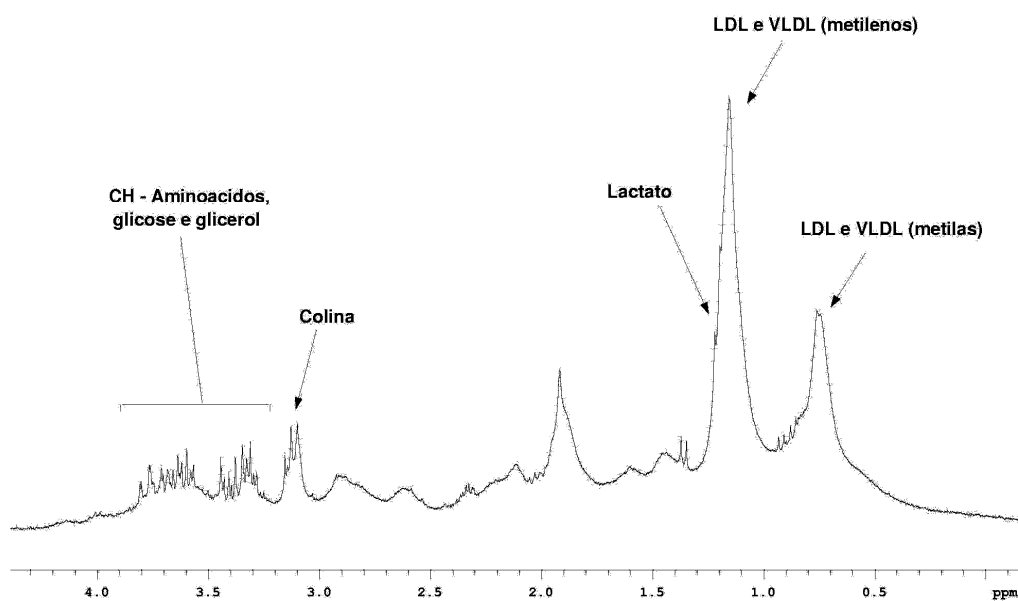
Os biofluidos possuem grande quantidade de água, ocasionando sinal intenso no espectro de RMN ^1H , o que dificulta a visualização dos sinais associados às moléculas dos metabólitos. Assim, os espectros de RMN de ^1H da urina são medidos utilizando-se uma sequência de pulsos para supressão do sinal da água.⁹

Uma grande preocupação, em relação ao uso da metabonômica em estudos clínicos, são as variações inerentes aos pacientes, quando comparadas às de experimentos com animais, nos quais se consegue melhor controle. Contudo, apesar da grande variação existente na população humana, em que os fatores genéticos e ambientais (incluindo dieta) são apenas minimamente controlados, amostras, tanto de urina como de plasma, podem ser utilizadas para análise metabonômica em estudos clínicos bem controlados.¹⁴⁻¹⁶ Informações ocultas, contidas no estado metabólico “global” decorrentes da resposta metabólica codificada e individual para fatores genéticos e ambientais, tais como idade, gênero, nutrição e doença podem ser retiradas dos dados espectrais empregando análises matemáticas multivariadas.^{3,12}

Recentemente, foi descrita a importância de se levar em consideração certos procedimentos metodológicos, como a estocagem das amostras de urina a -25°C por até 26 semanas, a adição de solução tampão de fosfato para concentração de 0,3M e a utilização de solução de preservação, com azida de sódio, caso seja necessária a estocagem temporária das amostras até 4°C , com o intuito de padronizar a prática da metabonômica, tornando-a mais reprodutível.¹⁷



(A) - Espectro de RMN- ^1H de amostra de urina



(B) - Espectro de RMN- ^1H de amostra do soro

Figura 1: Espectros de RMN- ^1H das amostras de urina (A) e de soro (B), obtidos num espectrômetro de 300 MHz, representativos da região alifática de alguns metabólitos do espectro.

No contexto da espectroscopia de RMN, um fator limitante para o entendimento da informação dos espectros de biofluidos e de tecidos é a sua grande complexidade. Em muitos casos, a inspeção visual de tais espectros resulta apenas em informações pouco significativas. Medidas convencionais dos sinais maiores do espectro de RMN podem ser usadas para detectar mudanças bioquímicas, mas a complexidade do espectro em si e a presença da variação biológica natural tornam difícil a sua avaliação.⁹ Desta forma, o emprego de métodos estatísticos, como a quimiometria, é indispensável para a extração do máximo de informações desses espectros.

Muitas vezes, as informações obtidas apenas da interpretação dos espectros das amostras, podem ser suficientes, sem a necessidade do detalhamento da análise da estrutura química dos metabólitos. Por outro lado, questionamentos mais avançados envolvem a identificação das substâncias no espectro, podendo servir como um “biomarcador”, diferenciando o estado patológico do normal. Sendo assim, os espectros de RMN de biofluidos de RMN podem ser avaliados de duas maneiras: uma quantitativa, em relação à forma física do espectro e outra qualitativa, em relação à estrutura química das substâncias que compõem o espectro. Em suma, com a espectroscopia de RMN, ora pode-se obter um perfil de frequências ou impressão digital de determinada alteração metabólica ora pode-se identificar a substância química que está sendo refletida no mesmo. O objetivo, a partir de então, deixou de ser quantificar determinada substância no biofluido, mas sim observar as mudanças no perfil dos metabólitos endógenos, produzindo um padrão daquela determinada alteração ou uma impressão digital bioquimicamente baseada, que tem significado diagnóstico ou classificatório. Outra meta importante é identificar as substâncias que levaram ao diagnóstico ou classificação, fazendo com que o conjunto desses biomarcadores estabeleçam um contexto clínico ou biológico.¹

A construção de um modelo quimiométrico deste perfil é realizada através de programas de computador (softwares), que analisam os espectros dos biofluidos com determinadas enfermidades. De fato, alguns estudos aplicando conjuntamente a espectroscopia de RMN de ^1H e a análise multivariada conseguiram evidenciar diferenças consistentes no perfil metabólico dos biofluidos, embora a grande maioria deles tenha sido realizada em animais. Por exemplo, trabalho de Wang Y et al., utilizando amostras de urina de ratos infectados ou não pelo *Schistosoma mansoni*, conseguiu estabelecer as alterações características do espectro desta parasitose, ou seja, sua impressão digital.¹⁸

Aplicações Clínicas

Nos últimos anos, vem crescendo o número de trabalhos em pesquisa clínica, enfocando a metabonômica, utilizando amostras de urina ou de soro de seres humanos.^{19,20}

Muito dos estudos clínicos publicados, inicialmente, com a aplicação da espectroscopia de RMN para o perfil de urina e soro foram analisados, ficando evidente a concentração desses no campo dos erros inatos do metabolismo.^{21,22} Recentemente os estudos metabonômicos, baseados na aplicação da RMN associada à análise estatística multivariada, vêm mostrando seu potencial no diagnóstico de doenças cardiovasculares, neurológicas, infecciosas, entre outras. Paralelamente, plataformas analíticas mais sensíveis e ferramentas estatísticas mais avançadas vêm contribuindo para a descoberta de biomarcadores. Os parágrafos seguintes sumarizam estudos que utilizaram técnicas metabonômicas baseadas na espectroscopia de RMN de ^1H de biofluidos, associadas às análises quimiométricas para o diagnóstico ou classificação de doenças.

Em 2002, Moyec LL et al. demonstraram, através da espectroscopia de RMN de ^1H em urina, que a nefrotoxicidade dos aminoglicosídeos e glicopeptídeos não está limitada apenas à toxicidade tubular proximal, mas envolve também a região medular (alça de Henle e ducto coletor) do nefron. Este método tem importância particular, pois é de mais fácil execução quando comparado aos métodos rotineiros e poderia ser utilizado no segmento dos pacientes, tratados tanto com aminoglicosídeos como com glicopeptídeos visando explorar a extensão da lesão renal.²³

Outro exemplo dessa aplicação foi o estudo de Brindle JT et al., também em 2002, que determinou com mais de 90% de acurácia a gravidade da doença arterial coronariana em amostras de soro, comparada com a angiografia, técnica padrão, porém invasiva e mais cara.²⁴ Cabe salientar que este estudo teve interpretação controversa, pois em 2006, Kirschenlohr HL et al. contestaram seus resultados e demonstraram que a análise da espectroscopia de RMN de ^1H do soro seria um fraco preditor de doença arterial coronariana.²⁵

No ano seguinte, em 2003, o mesmo grupo, utilizando a metabonômica baseada na RMN de ^1H , demonstrou existir uma relação entre o perfil metabólico sérico e os níveis de pressão arterial, a qual foi atribuída à composição das partículas de lipoproteínas nas amostras. Os resultados indicaram que as alterações séricas eram evidentes quando associadas a níveis de pressão arterial sistólica maiores que 130 mmHg, estabelecido como limite de normalidade pela World Health Organization e International Society of Hipertention.²⁶

Van QN et al. (2003-2004) aplicaram a espectrometria de massa associada a RMN de ^1H na urina de três grupos de indivíduos, pacientes com cistite intersticial ou com cistite bacteriana e pessoas saudáveis. Conseguiram discriminar, com taxa de sucesso de 84%, o

padrão espectral de pacientes acometidos por cistite intersticial e por cistite bacteriana e indivíduos sãos.²⁷

Em 2005, Coen M et al. publicaram estudo piloto de análise metabonômica em amostras de LCR por RMN de ^1H e demonstraram rapidez no diagnóstico de meningite ou ventriculite associada à drenagem ventricular externa. Concluíram que esta análise representa boa ferramenta diagnóstica e é potencialmente mais eficaz do que os exames laboratoriais de rotina diagnóstica do LCR, indicados para diferenciar meningite viral de bacteriana e para monitoração terapêutica. O exame de cultura do LCR é o teste de rotina mais sensível, mas é mais demorado. Portanto os resultados desta pesquisa podem trazer implicações terapêuticas importantes, redução do uso empírico de antimicrobianos e do tempo de tratamento das meningites.²⁸

O desenvolvimento e aplicação da metabonômica baseada principalmente na espectroscopia de RMN nas doenças neurovegetativas, como a doença de Alzheimer, a coreia de Huntington, a distrofia muscular e a ataxia cerebelar, foram amplamente revisados em 2006. Verificou-se o potencial da metabonômica em prover o diagnóstico precoce dessas enfermidades, permitindo também a descoberta de novos biomarcadores, que irão proporcionar maior conhecimento da base molecular dessas doenças e monitoração mais eficiente da resposta terapêutica.¹²

A metabonômica baseada na RMN de ^1H , em amostras de soro consegue claramente distinguir pacientes diabéticos tipo I dos não diabéticos. No grupo dos diabéticos, o diagnóstico de nefropatia através da RMN de ^1H quando comparado aos das análises bioquímicas, apresenta sensibilidade de 87% x 84%, especificidade de 88% x 96% e valores preditivo positivo e negativo de 89% x 96% e 84% x 79%, respectivamente. Portanto, o diagnóstico da nefropatia diabética em pacientes com *diabetes mellitus* tipo I no soro pela RMN de ^1H parece ser tão acurado quanto as variáveis bioquímicas.²⁹

Em 2006, Hower R et al. publicaram trabalho empregando essa metodologia em soros de pacientes com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) sob tratamento antiretroviral e em pacientes sem infecção, conseguindo classificar corretamente os grupos em mais de 95%. Além disso, este estudo também foi capaz de discriminar os casos com AIDS que não estavam sob terapia antiretroviral.³⁰

Outra área onde estão sendo realizados progressos é a oncologia. Estudo recente avaliou o diagnóstico de câncer epitelial de ovário baseado na análise do soro pela espectroscopia de RMN. A curva Receiver–Operating Characteristic (ROC) indicou que os soros de pacientes com e sem doença puderam ser identificados com 100% de sensibilidade e especificidade nas regiões de deslocamento químico do espectro de RMN de ^1H entre 2,77 ppm e 2,04 ppm.³¹

Utilizando-se também a espectroscopia de RMN foi possível diagnosticar doenças inflamatórias intestinais, tais como a doença de Crohn e a colite ulcerativa. Os resultados demonstraram rápida e clara diferença entre os espectros de RMN dos extratos fecais de pacientes e dos controles.³²

Enfim, a metabonômica está alcançando elevado grau de maturidade e começa a preencher os potenciais requisitos para constituir método de avaliação diagnóstica e prognóstica. Apóia-se, principalmente, no avanço dos equipamentos de RMN, gerando espectros de amostras biológicas com maior resolução e sensibilidade, evidenciando com maior eficiência as alterações biológicas significantes nos metabólitos endógenos, além do desenvolvimento de ferramentas estatísticas mais aprimoradas capazes de aprimorar a interpretar os dados da RMN. Com o estudo intenso das potencialidades da metabonômica vem aumentando, cada vez mais as perspectivas para sua aplicação na prática médica em futuro próximo.

Referências Bibliográficas

1. Lindon JC, Holmes E, Nicholson JK. Metabonomics techniques and applications to pharmaceutical research and development. *Pharm Res.* 2006;23(6):1075-88.
2. Keun HC. Metabonomics modeling of drug toxicity. *Pharm Therap.* 2006;109:92-106.
3. Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. Metabonomics: understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica.* 1999;29:1181-9.
4. Nicholson JK, Connelly J, Lindon JC, Holmes E. Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function. *Nat Rev Drug Discover.* 2002;1:153-61.
5. Lindon JC, Holmes E, Bollard ME, Stanley EG, Nicholson JK. Metabonomics technologies and their applications in physiological monitoring, drug safety assessment and disease diagnosis. *Biomarkers.* 2004;9:1-31.
6. Lindon JC, Nicholson JK, Holmes E, Everett JR. Metabonomics: Metabolic processes studied by NMR spectroscopy of biofluids. *Conc Mag Res.* 2000;12(5):289-320.
7. Lenz EM, Wilson ID. Analytical strategies in metabonomics. *J. Proteome Res.* 2007;6:443-58.
8. Robertson DG, Reily MD, Singler RE, Wells DF, Paterson DA, and Braden TK. Metabonomics: Evaluation of NMR and pattern recognition technology for rapid in vivo screening of liver and kidney toxicants. *Toxicol Sciencies.* 2000;57:326-37.
9. Lindon JC, Holmes E, Nicholson JK. So what's the deal with metabonomics? *Anal Chem.* 2003;75:384A-91A.

10. Lindon JC, Holmes E, Nicholson JK. Pattern recognition methods and applications in biomedical magnetic resonance. *Prog NMR Spectroscopy*. 2001;39:1-40.
11. Slupsky CM, Rankin KN, Wagner J, Fu H, Chang D, Weljie AM, et al. Investigations of the effects of gender, diurnal variation, and age in human urinary metabolomic profiles. *Anal Chem*. 2007;79(18):6995-7004.
12. Holmes E, Tsang TM, Tabrizi SJ. The application of NMR-based metabonomics in neurological disorders. *NeuroRx*. 2006;3(3):358–72.
13. Tang H, Wang Y, Nicholson JK, Lindon JC. Use of relaxation edited one-dimensional and two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy to improve detection of small metabolites in blood plasma. *Anal Biochem*. 2004;325:260–72.
14. Lenz EM, Bright J, Wilson ID, Morgan SR, Nash AF. A ^1H NMR-based metabonomic study of urine and plasma samples obtained from healthy human subjects. *J. Pharm. Biomed. Anal*. 2003;129:535-41.
15. Lenz EM, Bright J, Wilson ID, Hughes JM, Lindberg H, Lockton A. Metabonomics, dietary influences and cultural differences: a ^1H NMR-based study of urine samples obtained from healthy British and Swedish subjects. *J. Pharm. Biomed. Anal*. 2004;36:841-9.
16. Keun HC, Ebbels TMD, Antti H, Bollard ME, Beckonert O, Schlotterbeck G, Senn H, Niederhauser U, Holmes E, Lindon JC, Nicholson JK. Analytical Reproducibility in ^1H NMR-based metabonomic urinalysis. *Chem. Res. Toxicol*. 2002;15:1380-6.
17. Lauridsen M, Hansen SH, Jaroszewski JW, Cornett C. Human urine as test material in ^1H NMR-based metabonomics: recommendations for sample preparation and storage. *Anal.Chem*. 2007;79(3):1181–6.

18. Wang Y, Holmes E, Nicholson JK, Cloarec O, Chollet J, Tanner M, et al. Metabonomic investigations in mice infected with *Schistosoma mansoni*: An approach for biomarker identification. *Proc. Natl. Acad. Sci. (PNAS)*. 2004;101(34):12676-81.
19. Nicholson JK, Wilson ID. Understanding 'Global' Systems Biology: Metabonomics and the Continuum of Metabolism. *Nature Reviews*. 2003;2:668-76.
20. Solanky KS, Bailey NJ, Beckwith-Hall BM, Bingham S, Davis A, Holmes E, et al. Biofluid ¹H NMR-based metabonomic techniques in nutrition research – metabolic effects of dietary isoflavones in humans. *J Nutr Biochem*. 2005;16:236-44.
21. Moolenaar SH, Engelke UF, Wevers RA. Proton nuclear magnetic resonance spectroscopy of body fluids in the field of inborn errors of metabolism. *Ann. Clin. Biochem*. 2003;40:16–24.
22. Vangala S, Tonelli A. Biomarkers, metabonomics, and drug development: can inborn errors of metabolism help in understanding drug toxicity? *AAPS. J*. 2007;9(3):E284–97.
23. Moyec LL, Racine S, Toumelin PL, Adnet F, Larue V, Coeh Y, et al. Aminoglycoside and glycopeptide renal toxicity in intensive care patients studied by proton magnetic resonance spectroscopy of urine. *Crit Care Med*. 2002;30(6):1242-45.
24. Brindle JT, Antti H, Holmes E, Tranter G, Nicholson JK, Bethell WL, et al. Rapid and noninvasive diagnosis of the presence and severity of coronary heart disease using ¹H NMR-based metabonomics. *Nature Medicine*. 2002;8(12):1439-44.
25. Kirschenlohr HL, Griffin JL, Clark SC, Rhydwen R, Grace AA, Schofield PM, et al. Proton NMR analysis of plasma is a weak predictor of coronary artery disease. *Nature Medicine*. 2006;12(6):705-10.

26. Brindle JT, Nicholson JK, Schofield PM, Grainger DJ, Holmes E. Application of chemometrics in ^1H NMR spectroscopic data to investigate a relationship between human serum metabolic profiles and hypertension. *Analyst*. 2003;128:32-6.
27. Vann QN, Klose JR, Lucas DA, Prieto DA, Luka B, Collins J, et al. The use of urine proteomic and metabonomic patterns for the diagnosis of interstitial cystitis and bacterial cystitis. *Dis Markers*. 2003-2004;19(4-5):169-83.
28. Coen M, O'Sullivan M, Bubb WA, Kuchel PW, Sorrel T. Proton nuclear magnetic resonance- based metabonomics for rapid diagnosis of meningitis and ventriculitis. *CID*. 2005;41:1582-90.
29. Makinen VP, Soininen P, Forsblom C, Parkkonen M, Ingman P, Kaski K. Groop PH, la-Korpela M. Diagnosing diabetic nephropathy by ^1H NMR metabonomics of serum. *Magn Reson Mater Phy (MAGMA)*. 2006;19(6):281–96.
30. Hewer R, Vorster J, Steffens FE, Meyer D. Applying biofluid ^1H NMR-based metabonomic techniques to distinguish between HIV-1 positive/AIDS patients on antiretroviral treatment and HIV-1 negative individuals. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2006;41:1442-6.
31. Odunsi K, Wollman RM, Ambrosone CB, Hutson A, McCann SE, Tammela J, et al. Detection of epithelial ovarian cancer using ^1H -NMR-based metabonomics. *Int. J. Cancer*. 2005;113(5):782–8.
32. Marchesi JR, Holmes E, Khan F, Kochhar S, Scanlan P, Shanahan F, Wilson ID, Wang Y. Rapid and noninvasive metabonomic characterization of inflammatory bowel disease. *J. Proteome Res*. 2007;6(2):546–51.

ARTIGO ORIGINAL

DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA HEPATITE C ATRAVÉS DA RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ^1H (RMN ^1H) EM AMOSTRAS DE URINA*

Michele Maria Gonçalves de Godoy¹, Edmundo Pessoa de Almeida Lopes¹, Ricardo Oliveira Silva², Fernando Hallwass², Luisa Khouri¹, Izolda Maria Moura¹, Simone Maria da Cruz Gonçalves², Alfredo Mayall Simas².

Estudo realizado no Ambulatório de Hepatites do Hospital das Clínicas (HC) e no Laboratório da Central Analítica do Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Brasil.

¹ Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco

² Centro de Ciências Exatas e da Natureza da Universidade Federal de Pernambuco

Endereço para correspondência:

Michele Maria Gonçalves de Godoy

Rua Francisco Cunha, 206, apto. 2301, Boa Viagem.

CEP 51020-041, Recife - PE, Brasil.

E-mail: michelegodoy@oi.com.br

*Artigo aceito no *Journal of Viral Hepatitis*, com o título “Hepatitis C diagnosis by metabonomics”, de acordo com normas contidas no Anexo E.

RESUMO

A metabonômica, baseada na espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), pode revelar, em biofluidos, o perfil de metabólitos endógenos, de baixo peso molecular, relacionados a uma doença. O perfil pode ser identificado como se fosse uma “impressão digital metabólica” do processo patológico, razão pela qual a metabonômica vem sendo utilizada como método diagnóstico.

O objetivo deste estudo foi aplicar a metabonômica para identificar pacientes com infecção pelo vírus da hepatite C (HCV) através da análise dos espectros de RMN¹H de amostras de urina associada a ferramentas de estatística multivariada.

Trata-se de estudo piloto para avaliação de teste diagnóstico, no qual foram incluídos dois grupos: a) 34 pacientes (grupo doença) com anti-HCV e HCV-RNA positivos e anti-HBc negativo e b) 32 indivíduos (grupo controle) com anti-HBc positivo, HBsAg e anti-HCV negativos. As amostras de urina foram analisadas por RMN¹H, aplicando-se a análise de componentes principais e análise discriminante para classificação das amostras.

O modelo metabonômico construído foi capaz de identificar como positivos 32 dos 34 pacientes do grupo doença e, como negativos, 31 dos 32 indivíduos do grupo controle, apresentando sensibilidade de 94%, especificidade de 97% e valores preditivos positivo e negativo de 97% e 94%, respectivamente, e acurácia de 95% ($p < 0,001$).

Em conclusão, o modelo obtido a partir dos espectros de RMN¹H de amostras de urina, neste estudo inicial, discriminou com elevada sensibilidade e especificidade pacientes com infecção pelo HCV, conferindo a este modelo uma potencial ferramenta para ser utilizada na prática médica em futuro próximo.

Palavras chave: hepatite C; HCV; metabonômica; RMN, RMN¹H.

ABSTRACT

Metabonomics, based on nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy of biofluids, is capable of revealing the profile of endogenous metabolites of low molecular weight, related to a disease. The profile may be identified as though it were a “metabolic fingerprint” of the pathological process. It is consequently for this reason that metabonomics has been employed as a method for diagnosis.

The aim of the present study has been to apply metabonomics in order to identify patients infected with hepatitis C virus (HCV) through an analysis of the RMN¹H spectra from urine samples, associated to multivariate statistical tools.

A pilot study was carried out to evaluate the diagnostic test, in which two groups were involved: a) 34 anti-HCV and HCV-RNA positive patients who were anti-HBc negative (disease group), and b) 32 anti-HBc positive individuals who were HBsAg and anti-HCV negative. Urine samples were analyzed through ¹H NMR, applying principal component analysis and discriminant analysis for classification.

The metabonomics model was capable of identifying 32 of the 34 patients in the disease group as positive and 31 of the 32 individuals in the control group as negative, thus demonstrating 94% sensitivity and 97% specificity, as well as positive and negative predictive values of 97% and 94%, respectively, and 95% accuracy ($p < 0.001$).

In conclusion, the metabonomics model based on ¹H NMR spectra of urine samples in this preliminary study discriminated patients with HCV infection with high sensitivity and specificity, thereby demonstrating this model to be a potential tool for use in medical practice in the near future.

Keywords: HCV; hepatitis C; ¹H NMR; metabonomics; spectroscopy.

Introdução

A infecção pelo vírus da hepatite C (HCV) representa problema de saúde tanto nos países desenvolvidos como naqueles em desenvolvimento [1]. Dados recentes indicam o HCV como responsável por 70% dos casos de hepatite crônica e 30% dos transplantes hepáticos realizados em países desenvolvidos [2,3].

Na maioria das situações é difícil estabelecer a história natural da infecção pelo HCV devido ao seu início silencioso e seu curso pouco sintomático. Após a contaminação, alguns pacientes evoluem para cura da virose, mas, na maioria das vezes, a infecção evolui para a cronicidade, com persistência do anticorpo (anti-HCV) e da viremia (HCV-RNA) [4-8].

Os testes utilizados na rotina, tanto para rastreamento como para confirmação diagnóstica da infecção pelo HCV, praticamente são divididos em dois grupos: ensaios imuno-enzimáticos (EIE) para detecção do anti-HCV e testes moleculares para identificação do HCV-RNA. A pesquisa do anti-HCV com os EIE de 3ª geração apresenta elevadas sensibilidade e especificidade, chegando a diagnosticar cerca de 97% dos casos. Já a detecção do HCV-RNA, que reflete infecção em curso, é realizada rotineiramente por reação em cadeia de polimerase (PCR) [9-12]. Na prática, tanto a pesquisa do anti-HCV como a do HCV-RNA são realizadas em amostras de soro, o que torna necessária a punção de veia periférica por profissional habilitado. Além disso, o tempo mais prolongado para realização da PCR, o risco potencial de contaminação e o seu custo mais elevado limitam sua aplicação na rotina diária [13]. Assim, um teste mais simples, rápido e de menor custo seria importante para rastrear e identificar os pacientes infectados pelo HCV.

Nos últimos anos, observa-se crescente interesse na tecnologia metabonômica por dispor da capacidade de associar mudanças no perfil de metabólitos em um dado biofluido orgânico com agressões ambientais, patológicas ou toxicológicas [14-17]. A espectroscopia de RMN vem se tornando uma das principais ferramentas para a análise dessas mudanças, já que o espectro pode acuradamente demonstrar os metabólitos e suas concentrações [18-23].

O perfil dos espectros de RMN é complexo, contendo centenas de informações, e para sua eficiente interpretação faz-se necessário o uso de ferramentas estatísticas, tais como: principal components analysis (PCA), partial least square (PLS), discriminant analysis (DA) e simple classification analysis (SIMCA). O tratamento estatístico dos dados espectrais permite analisá-los de forma mais simples, rápida e reprodutível, sendo designada quimiometria [24-26].

A metabonômica pode revelar através do padrão espectral de RMN em biofluidos, como soro e urina, ou em tecidos, as alterações orgânicas, como se fosse uma “impressão digital metabólica” do processo patológico [27-30]. Os estudos clínicos, portanto, buscam identificar biomarcadores que sofrem variações quando ocorrem desequilíbrios. Recentemente, foram publicados artigos, tanto experimentais como clínicos, que empregaram a metabonômica para avaliar, por exemplo, as infecções pelo *Schistosoma mansoni* e pelo HIV, colocando esta ferramenta na prática propedêutica [30,31].

A presente pesquisa tem como objetivo identificar os pacientes com infecção pelo HCV, através da análise dos espectros de RMN¹H de amostras de urina associada a ferramentas de estatística multivariada de redução de dados.

Material e Métodos

2.1. População do Estudo

Trata-se de estudo piloto para avaliação de teste diagnóstico composto por dois grupos:

- a) pacientes com anti-HCV e HCV-RNA positivos e anti-HBc negativo (grupo doença),
- b) indivíduos com anti-HBc positivo, HBsAg e anti-HCV negativos (grupo controle).

No período de janeiro a dezembro de 2007, foram avaliados consecutivamente os pacientes com infecção pelo HCV, que preenchessem os critérios de inclusão e exclusão, de acordo com a demanda do ambulatório de Hepatites do Hospital das Clínicas da UFPE. Os indivíduos do grupo controle foram encaminhados pelo banco de sangue para o referido ambulatório e atendidos conforme agendamento.

Foram excluídos aqueles que estavam em tratamento da hepatite C ou em uso de álcool nos últimos 15 dias. Assim como pacientes infectados pelo HCV que apresentassem manifestações extra-hepáticas do HCV, tais como diabetes melito, tireoidite, artrite, glomerulonefrite ou indícios de outras enfermidades, como esquistossomose mansônica, HIV/AIDS, doença auto-imune ou neoplasias.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Centro de Ciências da Saúde da UFPE.

Foram incluídos 82 indivíduos, dos quais 2 tiveram a amostra de urina extraviada. Entre os 80 restantes, 48 apresentavam o anti-HCV positivo e 32 eram do grupo controle. Entre os 48 pacientes com anti-HCV positivo, 14 (29%) foram excluídos (em 10 a pesquisa do HCV-RNA resultou negativa e em 4 o anti-HBc foi positivo), permanecendo 34 pacientes. Foram avaliados 66 indivíduos, sendo 34 do grupo doença e 32 controles.

No grupo doença, 47% dos pacientes eram do sexo masculino e no grupo controle 78% dos indivíduos ($p = 0,02$). A idade média no grupo doença foi 48 ± 14 anos e no grupo controle foi 41 ± 12 anos ($p = 0,035$). A média do IMC no grupo doença foi $26,8 \pm 3,1$ Kg m^{-2} e no grupo controle foi $26,5 \pm 5,9$ Kg m^{-2} ($p = 0,769$).

2.2. *Análise das Amostras*

No Laboratório Central do Hospital das Clínicas da UFPE, de cada indivíduo foram retirados 10 mL de sangue em veia periférica e colhidos 50 mL de urina. No soro, foram dosados os níveis séricos de: alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e gama-glutamil transferase (GGT), todas por método cinético automatizado (Abbott®). Foram também pesquisados o HBsAg, o anti-HBs, o anti-HBc e o anti-HCV através de ensaio imuno-enzimático (Abbott®). A pesquisa do HCV-RNA dos pacientes com o anti-HCV positivo foi realizada através da técnica de PCR no Laboratório Central da Secretaria de Saúde de Pernambuco (LACEN-PE).

As amostras de urina foram analisadas através de fitas-reagentes para urina (Labstix®), no Laboratório Central do Hospital das Clínicas, e enviadas para a Central Analítica do Departamento de Química Fundamental da UFPE, para avaliação dos testes por RMN.

2.3. *Espectroscopia de RMN^1H*

Os espectros de RMN^1H foram obtidos através do espectrômetro Varian Unit Plus (Varian NMR) operando a 300 MHz, utilizando tubos de 5 mm de diâmetro interno. Às

amostras de 400 μL de urina *in natura* foram adicionados 200 μL de solução-tampão ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 / \text{NaH}_2\text{PO}_4 - 0.2 \text{ mol L}^{-1}$). Após homogeneização, o espectro de RMN^1H foi obtido, utilizando uma sequência de pulsos com pré-saturação do sinal da água.

Os seguintes parâmetros foram empregados: janela espectral igual a 5 kHz, tempo de aquisição igual a 6.4 s, pulso de 90° , *delay* de saturação igual a 3.0 s e 32 repetições. Todos os espectros foram processados utilizando *line broadening* igual 0.3 Hz e o sinal em $\square 3.06 \text{ ppm}$, atribuído ao grupo metil da creatinina, foi utilizado como referência de deslocamento químico. As distorções da linha de base e fase foram corrigidas manualmente.

Os espectros de RMN^1H (δ 0.0-10.0 ppm) foram automaticamente reduzidos a 154 regiões de igual comprimento (δ 0.05 ppm), excluindo a região entre δ 4.2 e 6.4 ppm, para eliminar os sinais da água e da uréia. Além disso, o espectro foi normalizado em função da intensidade de cada região, utilizando o *VNMR6.1C software* (Varian, Inc.).

2.4. Análise estatística e redução dos dados dos espectros de RMN^1H

Para a análise de frequência entre os grupos, foi utilizado o teste do qui-quadrado ou o teste exato de Fisher. A comparação entre as médias foi realizada através do teste t. O nível de rejeição, para a hipótese de nulidade, foi menor ou igual a 1% ($p \leq 0,01$).

Para avaliação dos espectros, foi realizada a análise de componentes principais, que resultou em 65 ($n - 1$) componentes principais (PC). Essa análise não conseguiu separar os dois grupos, mas se utilizou da matriz produzida pelas PC e a contribuição de cada amostra para realizar a análise de discriminantes.

Para seleção das variáveis foi empregado o método *Forward Stepwise*, utilizando valor de $p \leq 0.05$. Foram selecionadas 16 das 65 PC, que apresentavam correlação significativa com o problema em questão (grupos doença e controle) e construídas duas funções: P e N, para classificar as amostras como positivas e negativas, respectivamente. O teste F para a função foi realizado com 16 variáveis e 49 ($n - 17$) graus de liberdade. Encontrou-se valor de F igual a 9.632, o que significa que o modelo tem significância estatística ($p < 0.001$), uma vez que o valor de $F_{16,49}$, com 95% de confiança, é igual a 0.470.

O número de amostras utilizadas, 66, não permitiu a separação de um grupo de calibração e outro de teste, uma vez que reduziria em muito o número de graus de liberdade. Com isso, optou-se por fazer uma validação cruzada do modelo metabonômico, para tanto, foram construídos 66 modelos diferentes com as mesmas 16 PC selecionadas e foi excluída uma amostra por vez, sendo testada aquela amostra retirada naquele modelo.

Os dados originais foram padronizados calculando-se a média e o desvio padrão por amostra, subtraindo-se a média da amplitude de cada uma e dividindo-se seu resultado pelo desvio padrão.

Como foram avaliadas 66 amostras, a matriz construída apresentava 66 linhas (casos) e 155 colunas (154 do espectro de RMN mais um, referente ao diagnóstico).

Resultados

Na Tabela 1 observam-se as médias dos níveis séricos de AST, ALT e GGT divididas pelo valor máximo de normalidade dos pacientes, constatando-se que as médias das enzimas daqueles com doença foram significativamente mais elevadas.

Dentre as 34 amostras de urina do grupo doença, o modelo metabonômico obtido, a partir dos espectros de RMN, identificou 32 como positivas (94%) e 2 como negativas (6%). Entre os 32 indivíduos do grupo controle, o modelo identificou 31 amostras como negativas (97%). Na Tabela 2, observa-se que a sensibilidade do teste foi 94% e a especificidade foi 97%, o valor preditivo positivo e negativo foi 97% e 94%, respectivamente, e a acurácia foi 95% ($p < 0,001$).

Na validação cruzada do modelo metabonômico, retirando-se uma amostra por vez e reconstruindo-se 66 modelos, para testar a amostra excluída, verificaram-se, entre as 34 amostras do grupo doença, os mesmos resultados obtidos no modelo. Já no grupo controle, entre as 32 amostras, observou-se concordância em 28 das 31 amostras consideradas negativas e em 1 amostra considerada positiva no modelo metabonômico. A acurácia da validação cruzada foi 91%.

O gráfico 1 demonstra a classificação das amostras de urina, de acordo com o escore da função P do modelo metabonômico, dos 34 pacientes do grupo doença e dos 32 indivíduos do grupo controle. Observa-se distinção entre os grupos, tendo as amostras do grupo doença altos valores para a função P e baixos, no caso das amostras do grupo controle. Verifica-se região de sobreposição (*gray zone*) contendo 2 amostras que deveriam ter sido classificadas como positivas e 4 como negativas. Entre estas 4 que deveriam ter sido classificadas como negativas, o modelo metabonômico classificou 3 corretamente como negativas, mas a validação cruzada não obteve tal acerto.

Discussão

Alterações na homeostase irão desencadear respostas do organismo, refletidas no perfil de metabólitos endógenos nos biofluidos e consequente mudanças nos espectros de RMN [27,32].

A metabonômica tem sido aplicada, sobretudo em trabalhos experimentais com amostras de animais e poucos são os estudos que utilizaram tecidos ou biofluidos de seres humanos. Isto ocorre, por exemplo, por causa da maior facilidade de controle dietético, das condições climáticas e da idade dos animais, resultando em variações mínimas [33-34]. Apesar das variações serem maiores entre as amostras humanas, a metabonômica vem sendo utilizada para avaliar toxicidade por drogas e no diagnóstico de enfermidades [35].

Neste estudo, diferenças demográficas foram observadas entre os dois grupos, como a menor frequência do sexo masculino e a maior média de idade dos pacientes do grupo doença. Esses achados podem estar relacionados à procedência de bancos de sangue dos indivíduos do grupo controle, ou seja, homens jovens e saudáveis. Estas diferenças, contudo, não foram significativas ($p > 0,01$) e provavelmente não devem ter interferido nos perfis dos metabólitos urinários.

Os achados desse estudo piloto revelam o potencial da metabonômica para o rápido e não invasivo diagnóstico da infecção pelo HCV, através da urina. Todos os pacientes do grupo doença apresentavam o anti-HCV e cursavam com viremia, contudo o modelo metabonômico obtido a partir dos espectros de RMN, não deve ter detectado nem o anticorpo nem o RNA viral. Não foi o anticorpo, posto que o grupo controle também apresentava proteína sérica da classe IgG, o anti-HBc, nem foi o RNA em virtude de seu elevado peso molecular. O teste deve ter registrado alterações no perfil metabólico

relacionadas à agressão hepática provocada pelo HCV. De fato, os níveis séricos das enzimas AST, ALT e GGT foram maiores no grupo doença (Tabela 1), visto que os pacientes deste grupo estavam infectados por um vírus hepatotrópico. Mais estudos com pacientes com hepatite C sem elevação das enzimas hepáticas estão em andamento.

Apesar da maioria dos estudos ser realizada com equipamento de maior campo magnético, como os aparelhos de RMN de 600 MHz, este trabalho utilizou a RMN de 300 MHz e foi capaz de discriminar os dois grupos com elevadas sensibilidade e especificidade. Com efeito, o estudo que avaliou pacientes com HIV/AIDS também utilizou equipamento de 300 MHz [31]. Pesquisas posteriores empregando aparelhos que forneçam maior resolução poderão gerar resultados ainda melhores do que estes dados preliminares.

Em decorrência da complexidade e da quantidade de informações obtidas pela análise da urina, utilizaram-se métodos estatísticos para a interpretação dos dados espectroscópicos de RMN. A análise de componentes principais não obteve sucesso em discriminar os dois grupos (controle e doença). Por outro lado, os resultados da análise de componentes principais foram utilizados na análise discriminante, tendo sido selecionadas 16 PC que melhor classificaram as amostras.

Enfim, este estudo piloto com espectroscopia de RMN, em amostras de urina, para diagnóstico da infecção pelo HCV, demonstrou ter potencial para ser aplicado na prática clínica, revelando acurácia de 95%. Saliente-se que na validação cruzada, para checar o modelo empregado, o teste continuou ainda com bom desempenho. Pesquisas com maior número de pacientes estão em curso, bem como com pacientes com hepatite pelos vírus B e C, e com outras doenças não infecciosas do fígado. Adicionalmente, as estruturas químicas das substâncias que produzem as diferenças nos espectros da urina dos dois grupos estão sendo analisadas e deverão ser reveladas nas próximas pesquisas.

Referências Bibliográficas

1. Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol* 2007; **13**: 2436-41.
2. Sherman M, Shafran S, Burak K, *et al.* Management of chronic hepatitis C: consensus guidelines. *Can J Gastroenterol* 2007; **21**: 25C-34C.
3. Davis GL, Albright JE, Cook SF, Rosenberg DM. Projecting future complications of chronic hepatitis C in the United States. *Liver T@* □□□ýð< □□31-8.
4. Seeff LB, Miller RN, Rabkin CS, *et al.* 45-Year follow-up of hepatitis C virus infection in healthy young adults. *Ann Intern Med* 2000; **132**: 105-11.
5. Lauer GM, Walker BD. Medical progress: hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2001; **345**: 41–52.
6. Seeff LB. The history of the “natural history” of hepatitis. *Liver Int* 2009; **29**: 89-99.
7. Niederau C, Lange S, Heintges T, *et al.* Prognosis of chronic hepatitis C: results of a large, prospective cohort study. *Hepatology* 1998; **28**: 1687-95.
8. Alter HJ, Seeff LB. Recovery, persistence, and sequelae in hepatitis C virus infection: a perspective on long-term outcome. *Semin Liver Dis* 2000; **20**: 17-35.
9. Lopes EPA, Granato CH, Lanzoni V, *et al.* Evaluation of an enzyme immunoassay for hepatitis C virus antibody detection using a recombinant protein derived from the core region of hepatitis C virus genome. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2000; **95**: 717-20.
10. Gretch DR. Diagnostic tests for hepatitis C. *Hepatology* 1997; **26**: 43-7S.
11. Ferreira-Gonzalez A, Shiffman ML. Use of diagnostic testing for managing hepatitis C virus infection. *Semin Liver Dis* 2004; **24**: 9-18.

12. Pawlotsky JM, Lonjon I, Hézode C, *et al.* What strategy should be used for diagnosis of hepatitis C virus infection in clinical laboratories? *Hepatology* 1998; **27**: 1700-2.
13. Zaaijer HL, Cuypers HT, Reesink HW, Winkel IN, Gerken G, Lelie PN. Reliability of polimerase chain reaction for detection of hepatitis C virus. *Lancet* 1993; **341**: 722-4.
14. Robertson DG. Metabonomics in toxicology: a review. *Toxicol Sci* 2005; **85**: 809-22.
15. Lindon JC, Nicholson JK, Holmes E, Everett JR. Metabonomics: Metabolic processes studied by NMR spectroscopy of biofluids. *Concepts Magn Reson* 2000; **12**: 289-320.
16. Robertson DG, Reily MD, Singler RE, Wells DF, Paterson DA, Braden TK. Metabonomics: Evaluation of NMR and pattern recongnition technology for rapid in vivo screaning of liver and kidney toxicants. *Toxicol Sci* 2000; **57**: 326-37.
17. Nicholson JK, Connelly J, Lindon JC, Holmes E. Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function. *Nat Rev Drug Discover* 2002; **1**: 153-61.
18. Moyec LL, Racine S, Toumelin PL, *et al.* Aminoglycoside and glycopeptide renal toxicity in intensive care patients studied by proton magnetic resonance spectroscopy of urine. *Crit Care Med* 2002; **6**: 1242-5.
19. Brindle JT, Nicholson JK, Schofield PM, Grainger DJ, Holmes E. Application of chemometrics in ^1H NMR spectroscopic data to investigate a relationship between human serum metabolic profiles and hypertension. *Analyst* 2003; **128**: 32-6.
20. Mäkinen VP, Soininen P, Forsblom C, *et al.* Diagnosing diabetic nephropathy by ^1H NMR metabonomics of serum. *Magn Reson Mater Phy* 2006; **19**: 281-96.

21. Marchesi JR, Holmes E, Khan F, *et al.* Rapid and noninvasive metabonomic characterization of inflammatory bowel disease. *J Proteome Res* 2007; **6**: 546-51.
22. Weljie AM, Dowlatabadi R, Miller BJ, Vogel HJ, Jirik FR. An inflammatory arthritis-associated metabolite biomarker pattern revealed by ¹H NMR spectroscopy. *J Proteome Res* 2007; **6**: 3456-64.
23. Coen M, O'Sullivan M, Bubb WA, Kuchel PW, Sorrel T. Proton nuclear magnetic resonance-based metabonomics for rapid diagnosis of meningitis and ventriculitis. *Clin Infect Dis* 2005; **41**: 1582-90.
24. Lindon JC, Holmes E, Nicholson JK. Pattern recognition methods and applications in biomedical magnetic resonance. *Prog NMR Spectroscopy* 2001; **39**: 1-40.
25. Keun HC. Metabonomic modeling of drug toxicity. *Pharm Therap* 2006; **109**: 92-106.
26. Coen M, Holmes E, Lindon JC, Nicholson JK. NMR-based metabolic profiling and metabonomic approaches to problems in molecular toxicology. *Chem Res Toxicol* 2008; **21**: 9-27.
27. Lindon JC, Holmes E, Nicholson JK. So what's the deal with metabonomics? *Anal Chem* 2003; **75**: 384A-91A.
28. Odunsi K, Wollman RM, Ambrosone CB, *et al.* Detection of epithelial ovarian cancer using ¹H-NMR-based metabonomics. *Int J Cancer* 2005; **113**: 782-8.
29. Holmes E, Tsang TM, Tabrizi SJ. The application of NMR-based metabonomics in neurological disorders. *NeuroRx* 2006; **3**: 358-72.
30. Wang Y, Holmes E, Nicholson JK, *et al.* Metabonomic investigations in mice infected with *Schistosoma mansoni*: an approach for biomarker identification. *Proc Natl Acad Sci* 2004; **101**: 12676-81.

31. Hewer R, Vorster J, Steffens FE, Meyer D. Applying biofluid ^1H NMR-based metabonomic techniques to distinguish between HIV-1 positive/AIDS patients on antiretroviral treatment and HIV-1 negative individuals. *Pharm Biom Anal* 2006; **41**: 1442-6.
32. Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. Metabonomics: understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica* 1999; **29**: 1181-9.
33. Lenz EM, Bright J, Wilson ID, Morgan SR, Nash AF. A ^1H NMR-based metabonomic study of urine and plasma samples obtained from healthy human subjects. *J Pharm Biomed Anal* 2003; **33**: 1103-15.
34. Lenz EM, Bright J, Wilson ID, *et al.* Metabonomics, dietary influences and cultural differences: a ^1H NMR-based study of urine samples obtained from healthy British and Swedish subjects. *J Pharm Biomed Anal* 2004; **36**: 841-9.
35. Bollard ME, Stanley EG, Lindon JC, Nicholson JK, Holmes E. NMR-based metabonomic approaches for evaluating physiological influences on biofluid composition. *NMR Biomed* 2005; **18**: 143-62.

Tabela 1 – Médias dos níveis séricos divididas pelo valor máximo da normalidade (VMN-1) das enzimas de 66 indivíduos, sendo 34 com hepatite C (doença) e 32 com anti-HBc positivo (controle).

ENZIMAS	Média $\pm$ DP	GRUPOS		<i>P</i>
		Doença	Controle	
N	66	34	32	
AST VMN-1	1,2 $\pm$ 1,3	1,6 $\pm$ 1,6	0,7 $\pm$ 0,2	0,002
ALT VMN-1	1,3 $\pm$ 1,5	1,7 $\pm$ 1,8	0,6 $\pm$ 0,2	0,001
GGT VMN-1	1,3 $\pm$ 1,1	1,5 $\pm$ 1,2	0,8 $\pm$ 0,9	0,010

AST – aspartato aminotransferase; ALT – alanina aminotransferase;

GGT – gama-glutamilttransferase; VMN - Valor Máximo da Normalidade

Tabela 2 – Resultados do modelo metabonômico pela análise dos espectros de RMN¹H de amostras de urina associada a ferramentas de estatística multivariada de 66 indivíduos, sendo 34 com hepatite C (doença) e 32 com anti-HBc positivo (controle).

MODELO	GRUPOS		Total
	Doença (%)	Controle	
Positivo	32 (94)	01 (03)	33
Negativo	02 (06)	31 (97)	33
Total	34	32	66
Sensibilidade = 94%		Valor preditivo positivo = 97%	
Especificidade = 97%		Valor preditivo negativo = 94%	
Acurácia = 95%		p = 0,001	

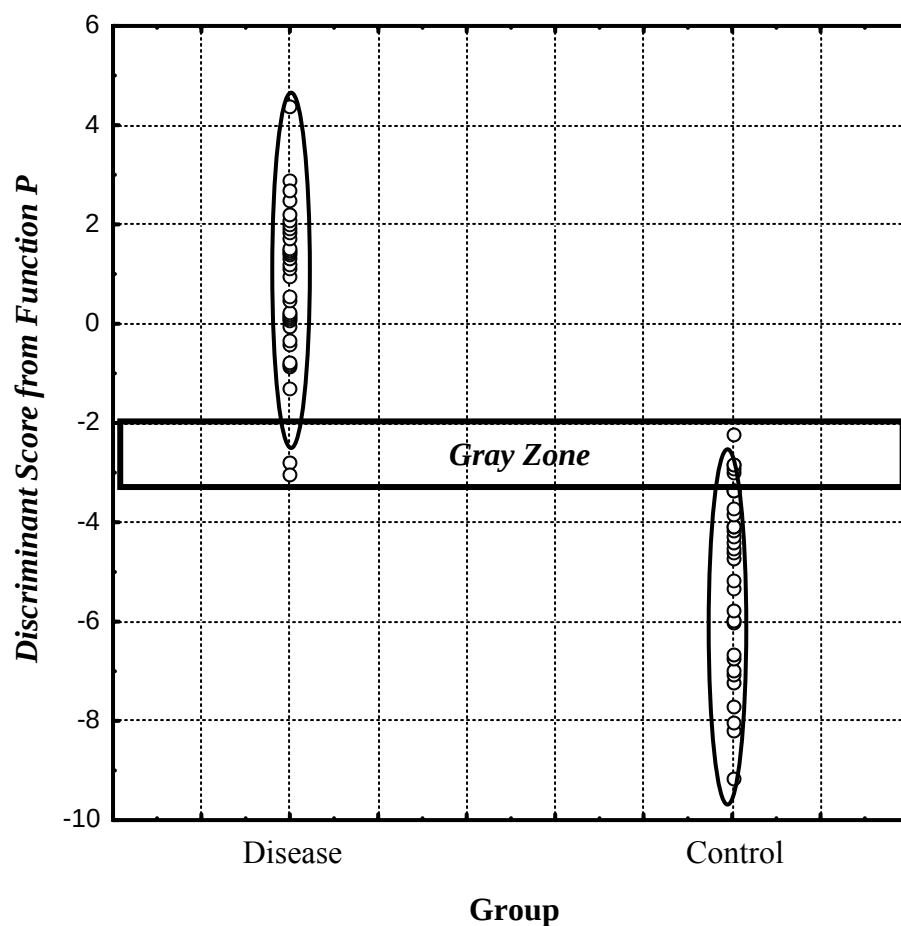


Gráfico 1 - Classificação das amostras de urina de 34 pacientes com infecção pelo vírus da hepatite C (grupo doença) e de 32 indivíduos com anti-HBc positivo (grupo controle), de acordo com os escores obtidos no modelo metabonômico.

ANEXOS

ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



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

Of. N.º 311/2007-CEP/CCS

Recife, 11 de outubro de 2007.

Registro do SISNEP FR – 123091

CAAE – 0029.0.172.000-07

Registro CEP/CCS/UFPE N.º 032/07

Título: "Emprego da espectroscopia de ressonância magnética nuclear em amostras de soro e de urina para diagnóstico de infecção pelo vírus da hepatite C"

Registro CONEP: 13978

Pesquisador Responsável: Michele Maria Gonçalves de Godoy

Senhora Pesquisadora:

Informamos que a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, analisou o protocolo em epígrafe e emitiu o seguinte parecer: **PROTOCOLO APROVADO**.

Ressaltamos que o pesquisador responsável deverá apresentar relatório anual da pesquisa.

ANEXO: Parecer CONEP N.º: 789/2007

Atenciosamente

Prof. Geraldo Basso Lindoso Couto
Coordenador do CEP/ CCS / UFPE

A

Mestranda Michele Maria Gonçalves de Godoy
Programa de Pós-Graduação Ciências da Saúde – CCS/UFPE



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

Of. N.º 067/2007 - CEP/CCS

Recife, 13 de abril de 2007

Registro do SISNEF FR - 123091

CARE - 0029.0 172.000-07

Registro CEP/CCS/UFPE Nº 032/07

Título: "Emprego da espectroscopia de ressonância magnética nuclear em amostras de soro e de urina para diagnóstico de infecção pelo vírus da hepatite C"

Pesquisador Responsável: Michele Maria Gonçalves de Godoy

Senhora Pesquisadora:

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 epígrafe, aprovando-o em 04 de abril de 2007.

Obs. O pesquisador só poderá iniciar a coleta de dados após aprovação da CONEP.

Ressaltamos que o pesquisador responsável deverá apresentar relatório ao final da pesquisa.

Atenciosamente

Prof. Gerardo Bosco Lindoso Couto
Coordenador do CEP/ CCS / UFPE

A.
Mestranda: Michele Maria Gonçalves de Godoy
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - CCS/UFPE

Av. Prof. Moraes Rego, s/n Cid. Universitária 50670-901, Recife - PE, Tel/fax: 81 2126 8588, cepccs@ufpe.br

ANEXO B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



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

DMC

DQF

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) a participar, como voluntário (a), da pesquisa intitulada “EMPREGO DA ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) EM AMOSTRAS DE URINA PARA DIAGNÓSTICO DE HEPATITE VIRAL”, no caso de você concordar em participar, favor assinar ao final do documento. Sua participação não é obrigatória, e, a qualquer momento, você poderá desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com a instituição.

Você receberá uma cópia deste termo onde consta o telefone e endereço do pesquisador principal, podendo tirar dúvidas do projeto e de sua participação.

NOME DA PESQUISA: EMPREGO DA ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) EM AMOSTRAS DE URINA PARA DIAGNÓSTICO DE HEPATITE PELO VÍRUS C.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Michele Godoy

ENDEREÇO: Av Prof. Moraes Rego S/N Cid. Universitária Recife

TELEFONE: 21263510

PESQUISADORES PARTICIPANTES:

Prof. Dr. Edmundo Lopes

Prof. Dr. Fernando Hallwass

Dra. Izolda Fernandes Moura

Msc. Ricardo Oliveira da Silva

Profa. Dra. Simone M. C. Gonçalves

OBJETIVOS: Esta pesquisa tem o objetivo de desenvolver uma metodologia para identificar e classificar amostras de urina de portadores de hepatite.

PROCEDIMENTOS DO ESTUDO: Se concordar em participar da pesquisa, você terá de responder a um questionário sobre se você é portador de alguma doença ou faz uso regular de algum medicamento e, em caso afirmativo, qual a periodicidade do uso. Deverá submeter-se a uma consulta médica e fornecer uma amostra de urina para análises laboratoriais de rotina e para análise através da espectroscopia de ressonância magnética nuclear, sendo essa amostra descartada logo após a análise. O resultado da análise servirá para construir um banco de dados que será utilizado na construção do modelo estatístico para classificar as amostras de urina de portadores e não-portadores de hepatite.

RISCOS: Você não será exposto a nenhuma situação de risco; sua rotina não será alterada e nenhuma substância será administrada. Portanto, nenhum risco advém de sua participação na pesquisa.

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

CONFIDENCIALIDADE DA PESQUISA: Todas as informações fornecidas durante a pesquisa são sigilosas e a identidade e dados dos voluntários não serão divulgados em nenhuma hipótese.

Assinatura do Pesquisador Responsável: _____



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

DMC

DQF

CONSENTIMENTO DE PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO

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

LOCAL E DATA:

NOME E ASSINATURA DO VOLUNTÁRIO:

(Nome por extensor)

(Assinatura)

Testemunhas: 1. _____

2. _____

ANEXO C – Questionário

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

DMC**DQF**

Nº de Identificação: _____

Data: / /

Nome. _____ RG-HC _____

1. Sexo: _____ 2. Idade: _____ 3. Ocupação: _____

4. End. _____ 5. Fone: _____

6. Uso regular de alguma das substâncias abaixo? Informe a periodicidade de uso (2 vezes ao dia ou 1 vez por semana, por exemplo) e a última vez que fez uso.

- ☐ Bebida alcoólica. _____
- ☐ Tabaco (cigarro, charuto, cachimbo). _____
- ☐ Drogas de abuso. Qual? _____
- ☐ Medicamento. Qual? _____
- ☐ Diabético
- ☐ Hipertenso

7. Doença hepática ☐sim ☐não • Anti HCV ☐sim ☐não • HCV RNA ☐sim ☐não•Anti HBs ☐sim ☐não

8. Doença renal? _____

9. Peso: _____ Altura: _____ P.A. _____ F.C. _____

10. Alteração exame físico? _____

11. OBS: _____

Anexo D - Instruções para publicação na *CLINICS*



INSTRUCTIONS TO AUTHORS

- [Scope and editorial policy](#)
- [Manuscript preparation](#)

ISSN 1807-5932 *printed version*

Scope and editorial policy

CLINICS publishes peer-reviewed articles of interest to clinicians and researchers in the medical sciences. Authors are invited to submit manuscripts in the following categories: **1. Original research**, featuring original experimental or clinical studies; Research in the basic sciences with medical implications is also welcome. **CLINICS** supports the position of the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) on trial registration. All trials initiated after 1 January 2007 must be registered prospectively in a publicly accessible registry (i.e., before patient recruitment has begun), or they will not be considered for publication. Trials initiated before 1 January 2007 must be registered before submission to our journals. See the ICMJE faq on trial registration on trial registration for further details. The WHO's list of approved registries is found at http://www.who.int/ictrp/network/list_registers/en/index.html. **2. Review Articles**, on themes relevant to medical practice and mammalian function. **3. Letters to the Editor**, a category which includes Rapid Communications, Case Reports, Technical Notes, and letters expressing comments or dissenting opinions concerning papers recently published in **CLINICS**.

All manuscripts involving human subjects or the use of laboratory animals must clearly state adherence to appropriate guidelines and approval of protocols by their institutional review boards. At the Editor's discretion, any photographs that may identify patients or other human participants of studies shall be acceptable only when a legally valid permission is signed by the said patient or other human participant or by his/her legally constituted representative. An appropriate form will be provided when deemed necessary.

All submitted manuscripts will be critically refereed by at least two members of the editorial board or expert consultants in a double-blind mode. All authors must have contributed to the study and/or manuscript because all are responsible for the contents. Articles should be limited to 6 authors. Whenever such number is exceeded, we expect the role of each author in the project and production of the article to be explained. The Editor reserves the right to edit accepted manuscripts prior to publication to comply with the Journal's format, to remove redundancies, and to improve clarity and understanding without altering meaning. Manuscripts edited at this stage will be presented to the authors for approval. All manuscripts should be submitted online at <http://mc.manuscriptcentral.com/clinics> in word.doc format.

Manuscript preparation

PRIOR TO SUBMISSION, ALL TEXT SHOULD BE SUBMITTED TO A SPELL CHECK FOR ENGLISH (USA). Manuscripts containing excessive spelling mistakes may be returned to the author for correction.

ORIGINAL ARTICLE manuscripts must be submitted in English, digitalized in a word.doc-compatible software program, double-spaced, with at least one-inch margins on 8.5 × 11-inch, letter-configured pages. Number all pages in sequence beginning with the title page. The complete text should be uploaded into the system as a **Main Document**. The sections should be arranged in the following order:

PAGE 1 Title Page. This should contain (a) the full title, (b) a running head of not more than 45 characters, (c) full names of all authors in the order in which they should appear, (d) full academic address of all participants, and (e) email address of corresponding author. Items (c), (d) and (e) shall be removed from the copy sent to reviewers. Please carefully inspect your entire manuscript and highlight all identification of authorship and institution using a red colored font. This shall also be removed from the text sent to reviewers.

PAGE 2 Abstract and Key Words. An informative **abstract** of approximately 250 words should begin on a new page. It should contain no identification of authorship or address and should be structured into Objectives, Introduction, Methods, Results, Discussion, and Conclusions. This abstract should be suitable, without rewording, for use by abstracting journals and indexing services. The abstract should not refer to published literature, nor should it contain abbreviations. Submit five **key words** appropriate for indexing purposes. Do not repeat words or terms used in the title.

PAGE 3 onwards Text. This should be organized into the following sections: Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Conclusions Acknowledgements, References, Tables, Legends for Figures. The use of subheadings and paragraph titles within these headings is encouraged for sake of clarity. For standard abbreviations, authors should follow the guidelines in the Council of Biology Editors Style Manual, 6th edition. All other abbreviations should be defined when first used and listed in a footnote. Authors are strongly encouraged to use as few abbreviations as possible and to avoid ambiguity. Nothing in this world is less readable than a pack of abbreviations that can only be understood with cross-referencing to a dozen different previous pages.

Manuscripts should be succinct. The **Introduction** should update the reader about previous knowledge on the subject; however, do not describe well-known and previously published material, but rather, quote them as references. **Methods and Materials** should describe all procedures and materials in sufficient detail to allow reproduction of the work by an expert reader. Always refer to a previously published methodological procedure, but summarize it if this is essential to the prompt understanding of the work. Use generic names of drugs instead of commercial names. Describe statistical procedures in an expert manner, with the assistance of a statistician if necessary. **Results** should be described in the body of the text and appropriately illustrated with figures or tables. However, the basic point made by each Figure or Table must be described in the text. Focus the **Discussion** on the work at hand, including only those references that directly relate to the subject. **Conclusions**, if any should be extremely brief; **Acknowledgments**, if any; **References**, according to

instructions below, **Tables and Legends to Figures.**

References _Cite references in text with superscripted Arabic numerals, without brackets, in order of appearance, in the following format: "Diabetes,¹ Hypertension^{2,3} and alcoholism⁴⁻⁹ are complex medical problems.¹⁰" CLINICS adopts the Vancouver format. References must be restricted to directly relevant published works, papers, or abstracts that have been accepted for publication. Usually the total number of references should not exceed 35. For up to six authors, list all authors; for more than 6 authors, list first six, followed by "et al". Write the title of the article in the original language whenever possible. For book chapters, quote both the author of the chapter and the editor of the book, as exemplified below.

Books:

Turner WW, Valentine RJ, Wright CB. Acute vascular insufficiency due to drug injection. In: Rutherford RB, editor. Vascular Surgery. 4th ed. Philadelphia: Saunders; 1995. p. 680.

Journal articles:

Wolosker N, Nakano L, D'Hippolito G, Rosoky RA, Borri ML, Wolosker AM.

Gadolinium magnetic angioresonance in the study of aortoiliac disease. *Angiology*. 2003;54:163-8.

Lee JT, Ling D, Heiken JP, Glazer HS, Sicard GA, Totty WG, et al. Magnetic resonance imaging of abdominal aortic aneurysms. *Am J Roentgenol*. 1984;143:1197-202.

Citation of unpublished material or personal communication. should be noted parenthetically in the text and not added to the reference list.

Tables should be incorporated into the Main Document. Tables should be constructed using the Table feature in your word processor or using a spreadsheet program such as Excel. Tables should be numbered in order of appearance in the text with Arabic numerals. Each table should have a title and, if necessary, an explanatory legend. All tables must be referred to and succinctly described in the text. Under no circumstances should a table repeat data that are presented in an illustration. Statistical measures of variation (i.e., standard deviation, standard error) should be identified, and decimal places in tabular data should be restricted to those with mathematical and statistical significance.

Figures. Upload each Figure individually into the system. Legend(s) should be incorporated into the **Main Document**. **Do not incorporate Figures into the Main Document.** Figures include all illustrations, such as photographs, drawings, charts, graphs, etc, and should be numbered consecutively in Arabic numerals. Graph should be prepared as Excel[®] files in black and white. Upload the graph itself as an individual figure. For each submitted graph, upload the corresponding Excel[®] data matrix as a supplementary file. Photographic illustrations should be prepared as *.jpeg or *.tif (300 dpi) files. Color illustrations may be charged to the authors at the discretion of the

Editor. All illustrations should be of professional quality and must be clear even after reduction in size for publication. Typewritten or hand lettering is unacceptable, as are figures generated by dot matrix printers. Figures will be reduced to fit one column of text. Actual magnification of all photomicrographs should be provided, preferably by placing a length scale on the print.

REVIEW ARTICLES will be preferentially by invitation of the Editor, but recommendations for topics and authors are welcomed. Spontaneously submitted reviews are also welcome but shall be submitted to standard peer reviewing. Potential authors of such spontaneously submitted reviews should bear in mind that authors are expected to have expertise in the reviewed field. The sections should be arranged in the following order:

PAGE 1 (Title) and 2 (Abstract and Key Words) as in Original Articles.

PAGE 3 onwards _ Text should be arranged as best suited to cover the subject being reviewed. If appropriate, the manner of reference collection should be described. The use of headings, subheadings, and paragraph titles is encouraged for sake of clarity. Abbreviations, Acknowledgements, References, Tables and Figures follow the format described for Original Articles.

LETTERS TO THE EDITORS include Rapid Communications, Case Reports, Technical Notes, and letters expressing comments or dissenting opinions concerning papers recently published in CLINICS.

Case reports will be published only if justified by the extreme rarity of the case and/or novelty of adopted procedures. Case reports should be arranged as follows:

PAGE 1 (Title) as in Original Articles.

PAGE 2 onwards _ Text (limited to 600 words) should be divided into a very brief Introduction, Case Description, and Discussion. No abstract or key words are required, but please make sure to copy your very brief **Introduction** into the abstract box on Page 1 of the submission procedure. Abbreviations, References, Tables and Figures follow the format described for Original Articles.

Rapid communications and Technical notes (limited to 600 words) _ Authors should format such contributions as best suited to the subject at hand. No abstract or key words are required. Please copy an introductory sentence into the abstract box on Page 1 of the submission procedure.

Letters expressing comments or dissenting opinions concerning papers recently published in CLINICS are not submitted to peer review and are published at the discretion of the Editor.

SUBMISSION - A copyright transfer form, signed by all authors, must be submitted by fax (55-11-3069-7524) or by mail. Any financial or other relationships that could lead to a conflict of interest must be disclosed in the copyright transfer form. If the Editor considers this conflict of interest relevant to the paper, a footnote will be added

to show the equity interest in or affiliation with the identified commercial firm(s).

As soon as authors are satisfied that the manuscript complies with the Journal format, our site at <http://mc.manuscriptcentral.com/clinics> should be accessed. The system will guide authors through the manuscript submission process and prompt authors to input information into specific fields as they are submitting their manuscript. The Editorial Office will be automatically notified of the submission and will send an email confirming it as soon as the submission letter reaches the office. Progress of the article through the Editorial Office procedures will be available to authors at all times.

Upon publication, CLINICS deposits all articles in SciELO, the Scientific Electronic Library Online (www.scielo.br/clinics), a publicly available free open access database. This complies with the policies of funding agencies, such as, the Wellcome Trust and the Research Councils (United Kingdom), the National Institutes of Health (United States), and the Deutsche Forschungsgemeinschaft (Germany) which request or require deposition of the published articles that they fund into such publicly available databases.

Anexo E - Instruções para publicação no *JOURNAL OF VIRAL HEPATITIS*

Journal of Viral Hepatitis

Edited by:

Editor-In-Chief: Howard Thomas

US Editor: Anna Lok

European Editors: Graham Foster and Peter Karayiannis

Print ISSN: 1352-0504

Online ISSN: 1365-2893

Frequency: Monthly

Current Volume: 16 / 2009

ISI Journal Citation Reports® Ranking: 2007: 14/50 (Gastroenterology & Hepatology); 16/50 (Infectious Diseases); 8/23 (Virology)

Impact Factor: 2.971

Top Author Guidelines

PUBLICATION POLICY

Submission is considered on the condition that papers are previously unpublished, are not offered simultaneously elsewhere, that all authors (defined below) have read and approved the content, that authors have declared all competing interests and the work has been conducted under internationally accepted ethical standards after relevant ethical review.

Licensing

Manuscripts will be considered for publication in the form of original articles, reviews, short rapid communications and letters. Letters to the Editor are possible and encouraged. Papers accepted must be licensed for publication in the *Journal of Viral Hepatitis* and a completed [Copyright Transfer Agreement](#) must accompany every accepted paper (see below). Authors will be required to transfer copyright in their paper to Wiley-Blackwell. Copyright transfer is a condition of publication and papers will not be passed to the publisher for production unless copyright has been transferred.

Online Open

OnlineOpen is a pay-to-publish service from Blackwell that offers authors whose papers are accepted for publication the opportunity to pay up-front for their manuscript to become open access (i.e. free for all to view and download) via the Blackwell Synergy website. Each OnlineOpen article will be subject to a one-off fee of \$3000 to be met by or on behalf of the Author in advance of publication. Upon online publication, the article (both full-text and PDF versions) will be available to all for viewing and download free of charge. The print version of the article will also be branded as OnlineOpen and will draw attention to the fact that the paper can be downloaded for free via the Blackwell Synergy service. If you wish your paper to be OnlineOpen you are required to complete the combined payment and copyright licence form: [Online Open Form](#).

Ethics

Manuscripts concerned with human studies must contain statements indicating that informed, written consent has been obtained, that studies have been performed according to the World Medical Association Declaration of Helsinki <http://www.wma.net/e/policy/b3.htm> and that the procedures have been approved by a local ethics committee. If individuals might be identified from a publication (e.g. from images) authors must obtain explicit consent from the individual.

Disclosures

Authors are required to disclose financial interests (e.g. employment, significant share ownership, patent rights, consultancy, research funding, etc.) in any company or institution that might benefit from their publication. All authors must provide details of any other potential competing interests of a personal nature that readers or editors might consider relevant to their publication. A completed [CoI](#) form must accompany every accepted paper (see below)

Authorship

Authors must fulfil the following three criteria

- substantial contributions to research design, or the acquisition, analysis or interpretation of data

- drafting the paper or revising it critically
- approval of the submitted and final versions

Clinical trials

Clinical trials should be registered and publications must include the registration number and name of the trial register. If not available, please provide an explanation.

All articles are subject to review by experienced referees. The editors judge manuscripts suitable for publication. All decisions made by the editors are final.

Material accepted for publication is copy-edited and typeset. Proofs are then sent to contributors for a final check, but extensive changes to the proofs may be charged to the contributors.

SUBMISSION

Over the past few years, *The Journal of Viral Hepatitis* has become one of the leading journals in the field of virology and infectious disease. This is reflected by the steadily increasing number of high-quality manuscripts submitted to the Journal. With the exception of invited reviews, the Editors have decided to restrict the length of a manuscript to **4000 words**, excluding acknowledgements and disclosures, references, tables, figure and table legends and figures, and to limit the number of figures and tables to a maximum of **six** items in the print edition of the Journal (e.g. four figures and two tables) in normal circumstances, with any additional material published online as supplementary material. Manuscripts that do not meet these formal criteria will be returned for reformatting, which will delay submission. Exceptions to these guidelines may be made in certain circumstances, at the discretion of the Editors. If you require an exemption, please indicate this in your cover letter. The length of invited review articles remains at 5000 words and 50 references.

Article types

Reviews

The reviews are focused topical accounts that highlight new and/or controversial areas. The length of the review article is typically limited to 5000 words and 50 references. All reviews are subject to review by experienced referees. The Journal welcomes un-solicited reviews, but reserves the right to reject these without formal review.

Original articles

Original articles describe the results of basic or clinical studies, clinical trials or significant case reports.

Rapid communications

Manuscripts submitted for the "short communications" section should be no more than 1,500 words in total, include only one figure and a maximum of 8 references. They will be reviewed and accepted by the Editors on the basis of their outstanding scientific value and the presentation of novel insights into health or disease. "short communication" articles will be only accepted with minor changes. Publication will be in the next available issue with the aim to publish the manuscript about two months after submission. The Editors reserve the right to reject the manuscript without formal review. Rejection for inclusion in the "short communications" section does not disqualify for resubmission as an original article.

Letters to the Editors

Letters to the Editors offer opinions on papers published in *the Journal of Viral Hepatitis*. Text should not exceed 400 words, and include no more than 5 references. Letters commenting on papers are sent to the authors of those papers for a response. Letters are selected for their importance, relevance, and originality; not all letters submitted can be published.

Book reviews

The *Journal of Viral Hepatitis* **does not** publish Book Reviews.

Help for authors

Pre-submission English-language editing

Authors for whom English is a second language may choose to have their manuscript professionally edited before submission to improve the English. A list of independent suppliers of editing services can be found at www.blackwellpublishing.com/bauthor/english_language.asp. All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

Digital artwork preparation

Guidance on the preparation and submission of figures, links to useful websites and access to both the Wiley-Blackwell house and journal-specific style guides can be found at <http://www.blackwellpublishing.com/bauthor/journal.asp>

Acceptable file formats

Text: Manuscript should be submitted as one text file in either Word document (.doc), or RTF (.rtf). Do not submit your file as a PDF.

Tables: Should form an integral part of the text file. Tables submitted as photographs or graphics will be rejected and delay the submission process.

Figures: You are required to upload high resolution graphics files. Micrographs (tone) should be supplied as TIFF (.tif); labelled micrographs (combination) or charts/ graphs/ diagrams (line) can be supplied as a TIFF or EPS (.eps) format. Details of how to prepare figures can be found at

<http://www.blackwellpublishing.com/bauthor/illustration.asp>

Figures for review must be uploaded separately and conform to the same standards as the Figures for publication. They should not be embedded into the text of your initial submission.

Manuscripts

The Journal of Viral Hepatitis only accepts submission at <http://mc.manuscriptcentral.com/jvh>. This enables rapid and effective peer review. Contributions will be acknowledged automatically by the editors and assigned a unique manuscript number that must be quoted on correspondence. Papers and reviews are refereed by experts in the field; the Editors reserve the right to reject an article without review.

Full upload instructions and support are available online from the submission site via the "Get help Now" button. Please submit your covering letter or comments to the editor as well as the names of potential referees when prompted online.

Revisions

The editors have designated three types of revision for manuscripts in the Journal:

Minor revisions: these in general require only changes to the manuscript or easily conducted experiments. Revised manuscripts must be submitted in their final form no later than four weeks of receipt of a revision letter from the Editor.

Major revisions: these require changes to the manuscript and significant additional experiments. Revised manuscripts must be submitted in their final form within three months of receipt of a revision letter from the editor.

Resubmission: these require extensive revision, with new experiments and major re-writing. Revised manuscripts must be submitted in their final form within four months of receipt of a revision letter from the Editor.

In all cases, resubmissions after the allotted time will be considered as new submissions.

Presentation

Text

Manuscripts should be typed in a standard, easy to read font, either 11 or 12 point in size. Manuscripts should be double-spaced, with 2.5cm (1 inch) margins on all sides and run in one single column. Please ensure that you have turned "track changes off" and removed any reviewing notes from your manuscripts else these will be visible throughout the review process. Place the page number and first authors last name in the upper right-hand corner of each page.

Reviews should be divided onto the following sections and appear in the following order: (1) title page (with short running page heading, title, authors names and affiliations), (2) abstract and keywords, (3) body of the article, (4) acknowledgments and disclosures; (5) references, (6) tables, (7) figure legends, and (8) figures.

Original articles should be divided into the following sections and appear in the following order: (1) title page (with short running page heading, title, authors names and affiliations) (2) abstract and keywords, (3) Introduction, (4) materials and methods, (5) results, (6) discussion, (7) acknowledgements and disclosures, (8) references, (9) appendices, (10) supplementary material, (11) tables, (12) figure legends, and (13) figures.

Title Page

On the title page provide the complete title and a running title (not to exceed 45 characters and spaces). List each contributor's name and institutional affiliation. Provide the name, postal and e-mail address, fax and telephone number of the contributor responsible for the manuscript and proofs. This is the person to whom all correspondence and reprints will be sent. The corresponding author is responsible for keeping the Editorial office updated with any change in details until the paper is published.

Abstract and Key Words

The abstract must not exceed 250 words. It should summarize the aim of the study and describe the work undertaken, results and conclusions. In addition, you should list up to six key words in alphabetical order. For ideas on optimising your abstract, see [here](#).

Introduction

This section should not exceed more than 500 words and should not have a separate heading. The Introduction should briefly discuss the objectives of the study and provide the background information to explain why the study was undertaken, and what hypotheses were tested.

Materials and methods

Animal preparation and experimentation should cite the approving governing body. Equipment and apparatus should cite the make and model number and the company name and address (town, county, country) at first

mention.

Give all measurements in metric units and use negative indexing (mg mL⁻¹, not mg/mL). Use generic names of drugs. Symbols, units and abbreviations should be expressed as Système International (SI) units. In exceptional circumstances, others may be used, provided they are consistent. Apply to the editorial office for advice.

Results

Tables and text should not duplicate each other.

Discussion

This section should not exceed more than 1,500 words and should be concise. The Discussion should include a brief statement of the principal findings, a discussion of the validity of the observations, a discussion of the findings in light of other published work dealing with the same or closely related subjects, and a statement of the possible significance of the work. Authors are encouraged to conclude with a brief paragraph that highlights the main findings of the study.

Acknowledgements and disclosures

It is the duty of authors to acknowledge funding sources, technical assistance, provision of materials or reagents and other matters that might pertain to the paper. Authors must acknowledge individuals who do not qualify as authors but who contributed to the research. If the work was sponsored by an organization or industry, it is essential this be declared and the authors need to indicate that they had complete access to the data that supports the publication. If the paper was written by a professional medical writer, this must be declared.

Please read the following statements, adding those sections which are relevant at the end of your submitted manuscript under a heading "Statement of Interests".

1. Authors' declaration of personal interests:

- (i) [Name of individual] has served as a speaker, a consultant and an advisory board member for [names of organizations], and has received research funding from [names of organization].
- (ii) [Name of individual] is an employee of [name of organization].
- (iii) [Name of individual] owns stocks and shares in [name of organization].
- (iv) [Name of individual] owns patent [patent identification and brief description].

2. Declaration of funding interests:

- (i) This study was funded [in part or in full] by [insert name of funding organization and provide funding identification numbers], grant number [insert grant or other identification number].
- (ii) The [writing or preparation] of this paper was funded in part by [insert name of funding organization].
- (iii) Initial data analyses were undertaken by [name of individuals if not listed as authors] who are employees of [name company] and received funding from [insert name of funding organization].
- (iv) Writing support was provided by [insert name of individual(s)] of [name company] and funded by [insert name of funding organization]. Manuscript Style

References

The reference style is Vancouver (numbered). References must be numbered consecutively and cited in the text using arabic numerals within parentheses. The reference list should conform to the style used by the National Library of Medicine and Index Medicus. Work that has not been accepted for publication should not appear in the reference list. It may be cited in the text as unpublished data.

We recommend the use of a tool such as EndNote or Reference Manager for reference management and formatting.

EndNote reference styles can be searched for here:

<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>

Reference Manager reference styles can be searched for here:

<http://www.refman.com/support/rmstyles.asp>

Journals

List all authors when six or fewer; when seven or more, list only the first three and add *et al.* Journal titles should be cited in full:

Caniano DA, Kanoti GA. Newborns with massive intestinal loss: difficult choices. *N Engl Med* 1988; **318**: 70-87.

Books and Monographs

Personal author

Bateson M, Bouchier I. *Clinical Investigation and Function*, 2nd edn. Oxford: Blackwell Scientific Publications Ltd, 1981.

Corporate author

The Geological Society. List of serial publications held in the library of the Geological Society, London. Oxford:

Blackwell Scientific Publications Ltd, 1987.

Editor, Compiler, Chairman as author

Booth CC, Neal AB, eds. *Disorders of the Small Intestine*. Oxford: Blackwell Scientific Publications Ltd, 1985.

Chapter in book

Morson BC, Dawson IMP. Mechanical disorders In: Morson BC, Dawson IMP, eds. *Gastrointestinal Pathology*, 2nd edn. Oxford: Blackwell Scientific Publications Ltd, 1979: 267-71.

Abbreviations

Include in the manuscript a list of new or special abbreviations along with the spelled out form or definition. For commonly accepted abbreviations, word usage, symbols, etc., authors are referred to the CBE Style Manual published by the American Institute of Biological Sciences or Units, Symbols and Abbreviations published by the Royal Society of Medicine.

Tables

Tables should be numbered consecutively within the text. Tables and text should not duplicate each other. If possible, hold tables to one standard manuscript page; if the table continues past one page, repeat all column headings and the stub (left-hand column). Explain all abbreviations in a footnote. Provide a number and title for each table. Regardless of authorship or publisher, permission must be received in writing for its use if a table has been previously published. Include an acknowledgement of the original source in a footnote. Tables should not be submitted as photographs or graphics files.

Figures

Labelling should be in 8pt Helvetica or Arial. Figure sections should be designated with upper case letters. Magnification (scale) bars should be given on electron and light micrographs. Details of the magnification bar should be noted in the figure legends. Authors may be asked to contribute to printing costs if the space requested for illustrations is considered too large or if colour photographs are requested.

Figure and table legends

Cite all tables and figures in the text, numbering them sequentially as they are cited.

Each figure must have a corresponding legend. The legend must be numbered with an arabic number that corresponds to the illustration as it appears in the text. Each should begin with a short title for the figure. Legends to tables (where necessary) and figures should contain sufficient information to be understood without reference to the text. Explain all symbols, arrows, numbers, or letters used in the figure and provide information on scale and/or magnification. For photomicrographs, include information on the method of staining or preparation.

Supplementary material

Quantitative or qualitative data too extensive for inclusion in the print edition of the Journal may be presented in the online edition, as supplementary material. It must be included as part of the original submission and will be reviewed as an integral part of the paper. The availability of supplementary material should be indicated in the main manuscript, to appear after the references at the end of the paper, providing titles of figures, tables, etc. formatted as if the material was to appear in the print edition. We welcome audio and video material, if relevant to your paper. Full details on how to submit supplementary material, including videos, can be found at <http://www.blackwellpublishing.com/bauthor/suppmat.asp>.

Word 2007

Please note that Word 2007 is not yet compatible with journal production systems. Unfortunately, the journal cannot accept Microsoft Word 2007 documents until such time as a stable production version is released. Please use Word's 'Save As' option therefore to save your document as an older (.doc) file type

Supporting Documents

These forms must accompany your accepted manuscript and are a condition of publication.

All forms are available to download from the *The Journal of Viral Hepatitis* submission site at <http://mc.manuscriptcentral.com/jvh> They can either be uploaded as supporting documents to your manuscript (preferred) or where this is not possible, faxed to the editorial office (Fax): +44 (0) 208 220 7791.

Copyright Transfer Agreement

Once a paper is accepted for publication, authors are required to sign an [Copyright Transfer Agreement](#) (CTA) granting the publisher exclusive publishing rights. Signature of the CTA is a condition of publication and papers will not be passed to the publisher unless a signed form has been received. (US Federal Government employees need to complete the Author Warranty sections, although copyright in such cases does not need to be assigned). After submission authors will retain the right to publish their paper in various media/circumstances (please see the form for further details). To assist authors an appropriate form will be supplied by the editorial office. Alternatively, authors may like to [download](#) a copy of the form. Upon acceptance, please return your completed form via email or fax to:

Roy See
Senior Production Editor
Journal Content Management
Wiley-Blackwell

Tel: +65-6511-8231
Fax: +65-6511-8288
Email: rsee@wiley.com

Conflict of Interest statement

The Journal insists on **full disclosure of competing financial and other interests** from all authors. **This is mandatory and a condition of publication.** A completed Col form must accompany every accepted paper.

Colour Work Agreement

It is Journal policy to charge authors for colour reproduction. If you wish your figures to be reproduced in colour, you must complete and return a [Colour Work Agreement form \(CWAf\)](#) before your paper can be published.

POST ACCEPTANCE

Article Tracking

Author Services enables authors to track their article - once it has been accepted - through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production. The author will receive an e-mail with a unique link that enables them to register and have their article automatically added to the system. Please ensure that a complete e-mail address is provided when submitting the manuscript. Visit <http://www.blackwellpublishing.com/bauthor> for more details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.

Proofs

Proofs will be available as a PDF to download from our e-proofing website. Full instructions will be sent via email notification when the proof is ready for collection. Adobe Acrobat Reader is required in order to read this file, which can be downloaded (free of charge) from <http://www.adobe.com/products/acrobat/readmain.html>. In your absence, please arrange for a named colleague to correct on your behalf. Major alterations will be charged to the author and can delay publication.

Proofs must be returned by **fax or email** only to the [production editor](#) within three days of receipt of notification. We cannot accept proofs by post - and any late return of proofs will lead to delayed publication of your paper to avoid any delay in publication of an issue. **Authors will receive one set of proofs only.**

Offprints

A PDF is provided upon publication to the corresponding author. Paper offprints can be purchased prior to print publication from http://offprint.cosprinters.com/cos/bw/main.jsp?SITE_ID=bw&FID=USER_HOME_PG.

Archiving Policy

Unless specifically requested at submission, the publisher will dispose of all material submitted 2 months post publication.