



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA**

**Roberta Rodrigues Praxedes**

**Identificação de Biomarcadores Preditivos do Risco para Carcinoma  
Hepatocelular na Hepatite C Avançada**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre(a) em Pesquisa e Desenvolvimento – Biotecnologia Médica.

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Estela de Oliveira Lima  
Coorientador(a): Prof(a). Dr(a). Adriana Camargo Ferrasi

**Botucatu**

**2020**

Roberta Rodrigues Praxedes

Identificação de Biomarcadores Preditivos do Risco para Carcinoma Hepatocelular  
na Hepatite C Avançada

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Medicina, Universidade Estadual Paulista  
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de  
Botucatu, para obtenção do título de  
Mestre(a) em Pesquisa e Desenvolvimento  
– Biotecnologia Médica.

Orientador (a): Prof(a). Dr(a). Estela de Oliveira Lima  
Coorientador(a): Prof(a). Dr(a). Adriana Camargo Ferrasi

Botucatu  
2020

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Praxedes, Roberta Rodrigues.

Identificação de biomarcadores preditivos do risco para carcinoma hepatocelular na hepatite C avançada / Roberta Rodrigues Praxedes. - Botucatu, 2020

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Estela de Oliveira Lima  
Coorientador: Adriana Camargo Ferrasi  
Capes: 10604006

1. Fígado - Cirrose. 2. Estadiamento de neoplasias.  
3. Marcadores bioquímicos. 4. Metabolômica. 5. Hepatite C.

Palavras-chave: Biomarcadores; Estadiamento; Fibrose hepática; Hepatite C crônica; Metabolômica.

## RESUMO EM PORTUGUÊS

A hepatite C, causada pelo vírus da hepatite C (VHC), é uma das principais causas de doenças hepáticas no mundo. Afeta cerca de 71 milhões de pessoas e é a segunda causa de mortes por hepatite viral, sendo responsável por aproximadamente 400.000 óbitos por ano no mundo. Não se observam manifestações de fase aguda e a doença evolui silenciosamente para a fase crônica, na qual o paciente pode desenvolver lesões hepáticas que vão desde fibrose leve até evoluir para cirrose ou carcinoma hepatocelular. O diagnóstico precoce e o monitoramento da evolução da doença são essenciais para o acompanhamento do paciente e delineamento da estratégia terapêutica. Entretanto, nem todos os acometidos pela infecção são diagnosticados e/ou monitorados ao longo da evolução da doença, pois o diagnóstico molecular nem sempre está disponível às populações. Já o acompanhamento da evolução da doença depende, principalmente, de técnicas histológicas, que apresentam variabilidade e imprecisão. Assim, o objetivo do trabalho foi selecionar perfis de biomarcadores para a hepatite C crônica, tanto para diagnóstico quanto para prognóstico de evolução da doença. Para tal, amostras de plasma de indivíduos saudáveis (grupo controle) e de pacientes com Hepatite C crônica foram submetidas a análise em espectrômetro de massas para identificação de marcadores de baixo peso molecular (metabolômica). Os resultados obtidos apresentaram perfis de biomarcadores promissores para diagnóstico, sendo que 6 alvos foram selecionados com grande potencial para uso como futuros marcadores diagnósticos da hepatite C crônica. Ademais, a análise dos biomarcadores dos graus de fibrose proporcionou a identificação de perfis metabólicos diferentes para cada grau, e expôs a alta sensibilidade da técnica quando comparada à análise histológica. Os resultados observados apresentam potencial para aplicação pois trazem à tona novos alvos para desenvolvimento de futuros testes diagnósticos e prognósticos mais assertivos. O método proposto para preparo e análise apresentou maior sensibilidade, maior agilidade e menor custo a longo prazo quando comparado aos métodos tradicionais. Dessa forma, os resultados obtidos abrem um leque de possibilidades de aprimoramento de processos que terão impacto positivo na saúde dos pacientes, no direcionamento terapêutico e na otimização dos serviços de saúde.

Palavras-chave: Biomarcadores; Estadiamento; Fibrose Hepática; Hepatite C Crônica; Metabolômica.

## **ABSTRACT**

Hepatitis C, caused by the hepatitis C virus (HCV), is one of the major causes of liver disease worldwide. It affects around 71 million people and is the second leading cause of deaths caused by viral hepatitis, accounting for approximately 400.000 deaths per year worldwide. The acute phase doesn't present notable manifestations so the infection silently evolves to a chronic phase, in which the patient can develop liver damage ranging from fibrosis to progression into cirrhosis or hepatocellular carcinoma. Early diagnosis and monitoring disease evolution are essential for patient follow-up and to design the best therapeutic strategy. However, not everyone affected by the infection is diagnosed and / or monitored over the course of the disease because molecular diagnosis is not always available to populations, neither. Besides, nowadays monitoring disease evolution depends mainly on histological techniques, which may show variability and imprecision. The aim of the present work was to select profiles of biomarkers for chronic hepatitis, both for diagnosis and prognosis of disease progression. So, plasma samples from healthy subjects (control group) and patients with chronic Hepatitis C (test group) were submitted to a mass spectrometry analysis to identify low molecular weight markers (metabolomics). The results showed promising profiles of biomarkers for diagnosis, and 6 targets were selected with great potential for use as future diagnostic markers of chronic hepatitis C. Moreover, the analysis of fibrosis grades' biomarkers also provided the identification of different metabolic profiles for each grade, and exposed technique's high sensitivity when compared to histological analysis. The observed results have potential for application because they bring up new targets for the development of future diagnostic and prognostic tests more assertive. The proposed method for sample preparation and analysis have also shown greater sensitivity, best agility, and lower cost in long term, compared with traditional methods. In this way, the obtained results open up a range of possibilities to improve processes that may positively impact on patients' health, therapeutic management and optimization of health services.

**Keywords:** Biomarkers; Staging; Liver Fibrosis; Chronic Hepatitis C; Metabolomics.

## SUMÁRIO

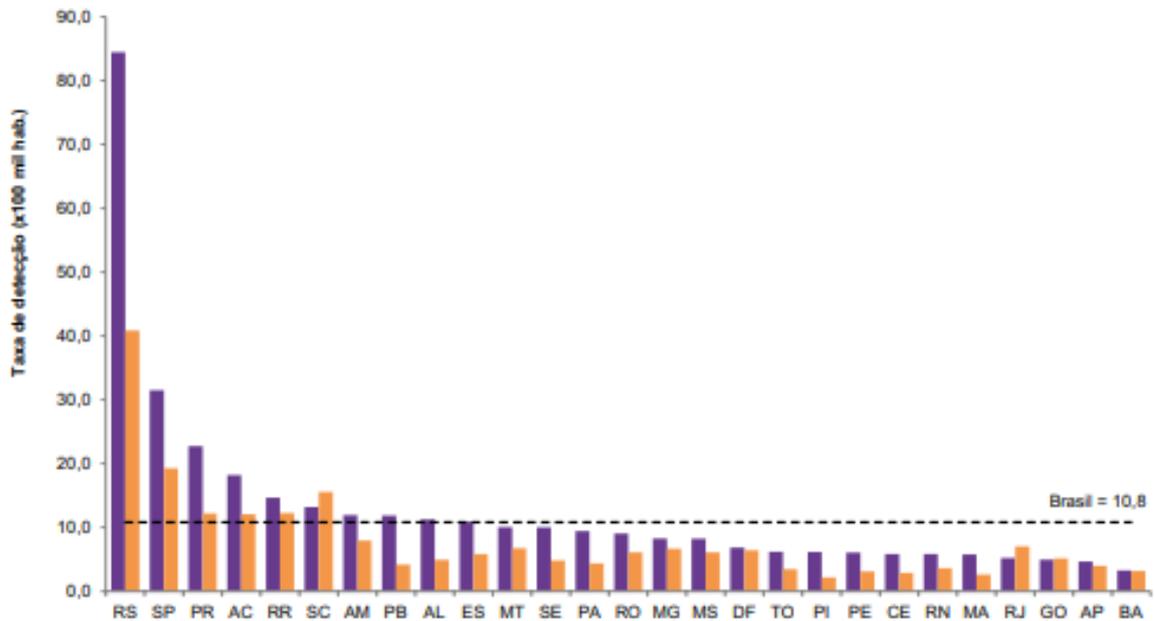
1. INTRODUÇÃO .....	5
1.1. Hepatite C .....	5
1.2. Lesão Hepática .....	10
1.3. Classificação e Evolução da Fibrose.....	11
1.4. Diagnóstico.....	12
1.4.1. Análises sorológica e molecular .....	12
1.4.2. Análises histológicas .....	13
1.4.3. Análises de Imagem.....	14
1.4.4. Marcadores Biológicos.....	15
1.5. Metabolômica .....	16
2. JUSTIFICATIVA .....	19
3. OBJETIVOS .....	20
3.1. Objetivo Geral.....	20
3.2. Objetivos Específicos.....	20
4. CASUÍSTICA E MÉTODOS .....	21
4.1. Casuística .....	21
4.2. Métodos .....	21
4.2.1. Preparo de amostras .....	21
4.2.2. Análise por espectrometria de massas .....	23
4.2.3. Análise estatística .....	23
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	25
5.1. Biomarcadores para hepatite C .....	25
5.2. Biomarcadores para graus de fibrose na hepatite C .....	31
6. CONCLUSÃO .....	38
7. APLICABILIDADE .....	39
8. REFERÊNCIAS .....	40
9. ANEXO I .....	46

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Hepatite C

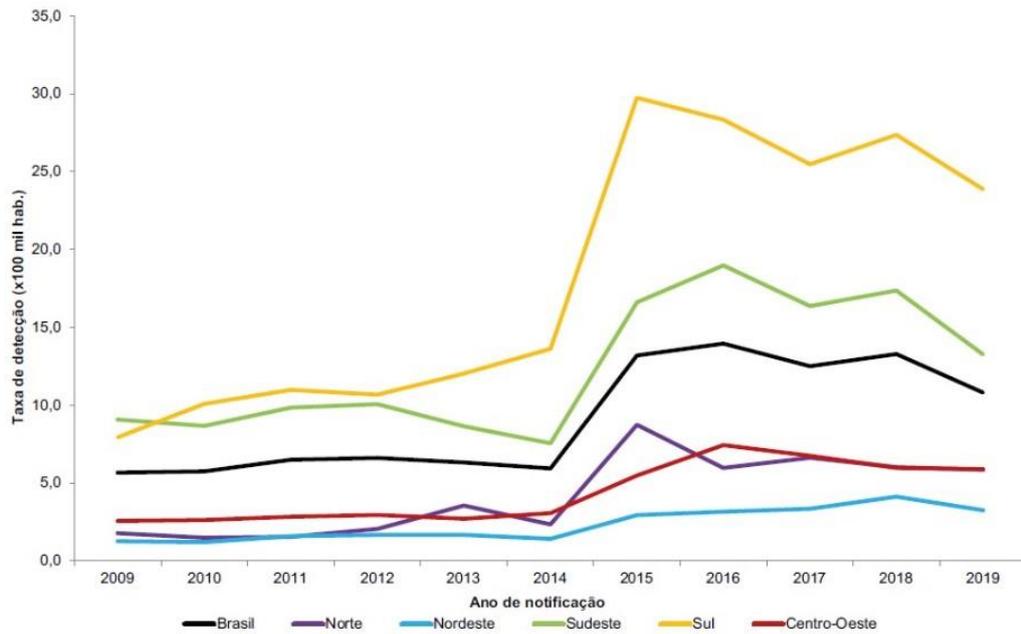
A hepatite C representa uma das principais causas de doença hepática aguda e crônica no mundo, mas apenas em 1989 foi possível identificar o agente causador da doença, um vírus de RNA pertencente à família *Flaviviridae* conhecido atualmente como vírus da hepatite C (VHC) (CHOO *et al.*, 1989). A transmissão ocorre principalmente pela via parenteral, ou seja, por meio do contato com sangue contaminado, seja pelo compartilhamento de agulhas, seringas ou outros objetos (hábitos comuns entre usuários de drogas injetáveis) (MANSBERG *et al.*, 2018; SHIFFMAN, 2018). Foram relatados também casos de transmissão pela via iatrogênica, ou seja, pela reutilização de equipamentos médicos ou odontológicos sem adequação às normas de biossegurança, assim como por falha de esterilização em equipamentos de manicure e em utensílios para colocação de piercing e confecção de tatuagens (WEINSTEIN; TOHME; HOLMBERGt, 2012). Embora menos frequentes, outras formas de transmissão também já foram relatadas, como por contato sexual, transmissão vertical e via transfusões sanguíneas com bolsas de sangue ou derivados contaminados; estas realizadas antes da década de 90, quando a triagem para o VHC ainda não era realizada nos bancos de sangue (CHAN *et al.*, 2016).

O quadro epidemiológico da hepatite C no Brasil, recentemente atualizado pelo Sinan (Sistema de Informação de Agravos de Notificações) e disponibilizado junto ao Ministério da Saúde, trouxe o ranking das capitais com maiores taxas de detecção de hepatite C no Brasil, apresentando dez capitais com taxas superiores à nacional (10,8 casos por 100 mil habitantes) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020). Dentre as capitais com as maiores taxas de detecção, Porto-Alegre-RS se destaca com a maior taxa dentre as capitais (84,4 casos por 100 mil habitantes), seguida de São Paulo – SP (31,5), Curitiba -PR (22,7), Rio Branco – AC (18,2), Maceió – AL (11,3), Vitória – ES (10,9), e também Salvador – BA (3,3 casos por 100 mil habitantes), essa última sendo representada como UF e capital com as menores taxas de detecção, conforme demonstrado na Figura 1.



**Figura 1.** Taxa de detecção de casos de hepatite C segundo UF e capital de residência. Fonte: Adaptada do Boletim Epidemiológico de Hepatites Virais (Ministério da Saúde, 2020).

As taxas de detecção apresentadas no Boletim Epidemiológico representam a melhora no sistema de notificação da infecção no Brasil (Figura 2). Num período de 20 anos, entre 1999 e 2019, o Brasil notificou 384.284 casos de hepatite C. Até o ano de 2014, eram considerados ambos os marcadores reagentes (anti-VHC e VHC-RNA) nos testes para a doença. Mas, o número de casos notificados entre 2015 e 2019 foi de 186.019, período em que as notificações passaram a ser realizadas com apenas um teste reagente. A partir desse dado, observa-se que a capacidade de diagnóstico foi aprimorada em um período de 5 anos, conforme demonstrado na Figura 2 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020). Sendo assim, a nova estratégia de diagnóstico e notificação para enfrentamento da hepatite C trouxe significativo aumento da sensibilidade na detecção dos infectados e contribuiu para maior abrangência do tratamento no Brasil, principalmente em áreas concentradas nas regiões Sul e Sudeste do país, os quais possuem maior urbanização e infraestrutura para adoção de medidas preventivas, facilitando o acesso aos programas de saúde (HANUS *et al.*, 2015)



**Figura 2.** Taxa de detecção de casos de hepatite C segundo região de residência e ano de notificação. Brasil, 2009 a 2019. Fonte: Adaptada do Boletim Epidemiológico de Hepatites Virais (Ministério da Saúde, 2020).

Em se tratando da epidemiologia mundial, a Organização Mundial da Saúde (OMS), estimou que aproximadamente 71 milhões de pessoas estariam infectadas cronicamente pelo VHC no ano de 2015. No mesmo ano, aproximadamente 1,75 milhões de novos casos de infecção pelo VHC foram estimados, representando incidência global de 23,7 infectados por 100.000 habitantes (Quadro 1).

**Quadro 1. Estimativas mundiais sobre a incidência da infecção pelo VHC, definida geograficamente por regiões.**

INCIDÊNCIA DAS INFECÇÕES POR VHC	
REGIÃO	Taxa de Incidência (por 100.000)
	Melhor Estimativa
Região Africana	31.0
Região das Américas	6.4
Região do Mediterrâneo Oriental	62.5
Região Europeia	61.8
Região do Sudeste Asiático	14.8
Região do Pacífico Ocidental	6.0
GLOBAL	23.7

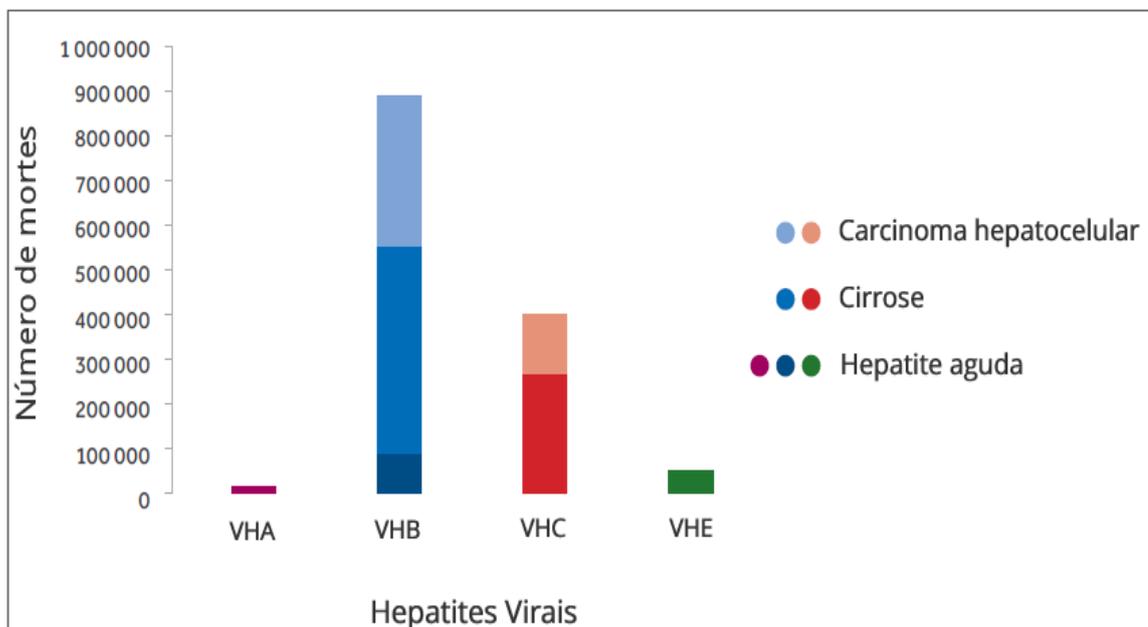
**Fonte:** Adaptada do Relatório Global de Hepatite (“WHO | Global hepatitis report, 2017,” 2018).

Além das altas taxas de incidência, a hepatite C faz parte das doenças infecciosas que mais levam a óbitos, como a tuberculose. Altas taxas de mortalidade foram atribuídas à cronificação das hepatites virais, principalmente pela evolução da doença para quadros de cirrose e carcinoma hepatocelular. O Relatório Global de Hepatites Virais, revela uma ascensão dessas taxas, representando 1,34 milhão de mortes no ano de 2015. Esses dados foram comparáveis aos óbitos causados pela tuberculose (1,37 milhões) e superaram os óbitos atribuíveis ao HIV (1,06 milhão), que por sua vez, tiveram menores proporções de letalidade no ano. Essas informações revelam a necessidade de respostas urgentes para inverter essa preocupante tendência em ascensão, com grandes obstáculos a serem superados, principalmente em relação à evolução da doença (“WHO | Global hepatitis report, 2017,” 2018).

Um dos maiores riscos da Hepatite C está associado à evolução natural do vírus, que silenciosamente permanece em estágio de latência na maioria dos casos, evoluindo por décadas sem quaisquer manifestações clínicas (WESTBROOK; DUSHEIKO, 2014). Quando não tratados, aproximadamente 20% dos indivíduos infectados eliminam o patógeno em semanas ou meses, evento denominado clareamento viral espontâneo. Os demais 80% evoluem gradativamente para a forma

crônica da doença, estágio em que habitualmente se encontra a maior parte dos indivíduos diagnosticados, dada a evolução subclínica e assintomática da infecção (CONITEC, 2015; PETRESCU *et al.*, 2015).

Acompanhando as altas taxas de infecção, a mortalidade devido a complicações da doença, principalmente por cirrose e carcinoma hepatocelular (CHC) representaram aproximadamente 400.000 óbitos, apenas no ano de 2015. Comparada às demais hepatites virais, a hepatite C representa a segunda causa da alta mortalidade de pacientes infectados por vírus da hepatite (Figura 3) (“WHO | Global hepatitis report, 2017,” 2018).



**Figura 3.** Mortes por hepatite viral, de acordo com o tipo de vírus e o tipo de sequela. Vírus da hepatite A (VHA); Vírus da hepatite B (VHB); Vírus da Hepatite C (VHC); Vírus da hepatite E (VHE). Fonte: Adaptada de WHO, 2017.

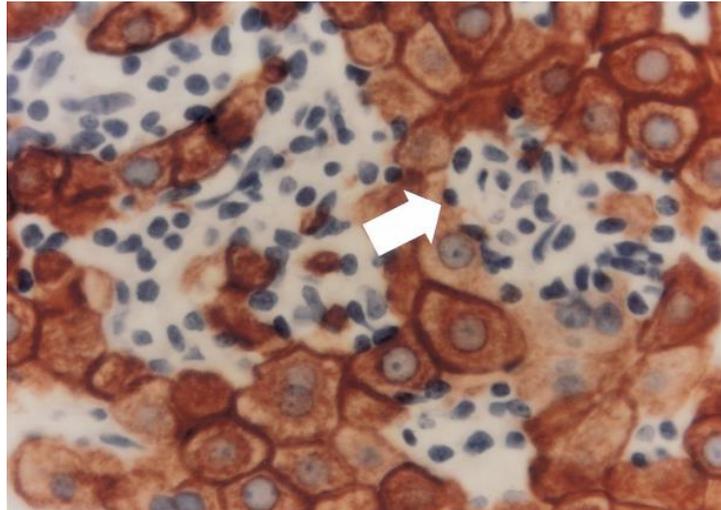
Diante da figura 3, observa-se que as elevadas taxas de mortalidade, em decorrência da infecção pelo vírus da hepatite C, são registradas quando a doença já evoluiu para a fase crônica, caracterizada pela progressão para fibrose hepática. Na ausência de tratamento, 20% destes pacientes poderão evoluir para cirrose, dos quais 1% a 5% poderão progredir para o CHC (WESTBROOK; DUSHEIKO, 2014). Tanto a fibrose quanto a cirrose são consequências de uma resposta sustentada de cicatrização à lesão hepática crônica. Esta ocorre pela destruição dos hepatócitos,

mediada pela ação do sistema imunológico que provoca a fibrose progressiva e alterações na arquitetura hepática (BUTT *et al.*, 2015).

## 1.2. Lesão Hepática

Os indivíduos infectados podem apresentar lesões hepáticas que variam de acordo com a evolução da doença. Esta pode evoluir de diferentes maneiras, sendo que fatores individuais do hospedeiro estão associados à gravidade da lesão, representada de acordo com a progressão da fibrose hepática. Dentre os fatores próprios do hospedeiro, o sexo masculino, a idade avançada, o etilismo e a presença de coinfeções representam fatores de risco para a evolução da fibrose hepática (ABDELAAL; YANNY; EL KABANY, 2019; MOHSEN *et al.*, 2002).

Diante do cenário em que a evolução da infecção pode ser avaliada de acordo com o grau de fibrose, compreender os mecanismos celulares é crucial para estabelecer os parâmetros histológicos avaliados. O critério utilizado para a classificação do grau de evolução histológica da hepatite C, bem como para outras hepatites, é a perda da integridade da placa limitante, uma zona formada pelos hepatócitos localizados na interface entre o lóbulo e o espaço porta (RIBEIRO, 2004; URIZ; BRIZ, 2004). Com o aumento do infiltrado inflamatório portal, observa-se predominância de leucocitose, que varia em graus conforme a classificação dos danos causados pelo aumento desse infiltrado (PEDROSA DE OLIVEIRA *et al.*, 2007). Quando esse infiltrado inflamatório portal passa a agredir os hepatócitos lobulares, conhecido como hepatite de interface (*piecemeal necrosis*), observam-se agravos que resultam em alterações na arquitetura hepática, como degeneração hidrópica e necrose (Figura 4) (PETRESCU *et al.*, 2015; WANG, M. X. *et al.*, 2001). Em resposta à agressão, o fígado passa a se reestruturar progressivamente, substituindo os hepatócitos necrosados por fibrose, dependendo do tempo e da intensidade do acometimento (HALLA *et al.*, 2010; IRSHAD; GUPTA; IRSHAD, 2019).



**Figura 4. Hepatite de interface.** Necrose fragmentada em um caso de hepatite C mostrando linfócitos que modificaram numerosos hepatócitos, onde o citoplasma manchado de marrom e as membranas celulares foram removidos. Hepatócitos mostrando diferentes graus de perda de citoplasma na borda de avanço de citoplasma linfocítico (seta branca). (Fonte: adaptada de Wang et al., 2001).

### 1.3. Classificação e Evolução da Fibrose

Diferentes classificações para o estágio de fibrose foram propostas (KNOPELL *et al.*, 1981; VENKATADRI; LOKANATHA, 2011), e umas das mais utilizadas atualmente é o sistema METAVIR (Tabela 1), que a partir de uma amostra de tecido hepático, classifica a progressão da fibrose em uma escala de 0 a 4, onde: F0 (ausência de fibrose); F1 (fibrose leve), com expansão portal sem septos; F2 (fibrose portal moderada), com emissão de septos finos/incompletos; F3 (fibrose portal avançada), com emissão de septos completos e F4 (fibrose portal severa ou cirrose), com emissão de septos que formam nódulos no parênquima (POYNARD; BEDOSSA; OPOLON, 1997).

**Tabela 1: O sistema METAVIR de classificação e o estágio de fibrose.**

<b>Classificação</b>	<b>Estágio de Fibrose</b>
<b>F0</b>	Fibrose indetectável
<b>F1</b>	Fibrose da zona periportal
<b>F2</b>	Fibrose mais extensa de zonas periportais e septos ocasionais
<b>F3</b>	Fibrose periportal e septal extensa, sem cirrose
<b>F4</b>	Cirrose

**Fonte:** Adaptado de Li e colaboradores (LI; LI; ZHANG, 2018).

O estágio da fibrose é considerado clinicamente relevante por evidenciar a evolução da doença, uma vez que o risco de desenvolvimento de cirrose e carcinoma hepatocelular depende desse estágio junto ao grau da atividade necro-inflamatória. Como consequência da evolução da fibrose, a lesão hepática pode se transformar em carcinoma hepatocelular (CHC), o qual representa o quinto tipo de câncer mais comum em homens e o sétimo em mulheres; mundialmente, estima-se que este represente aproximadamente 5% de todos os casos de cânceres no mundo (GLOBOCAN, 2018).

Quando diagnosticado em estágios iniciais, o CHC é potencialmente curável, porém, quando o diagnóstico é tardio, o transplante hepático e a ressecção cirúrgica se tornam as opções mais efetivas de tratamento. Todavia, poucos casos apresentam-se passíveis à intervenção cirúrgica e, sem tratamento, o tumor cresce progressivamente. Dessa forma, é importante o monitoramento de indivíduos com fatores de risco para o CHC, e estes devem ser submetidos a rastreamento periódico (MARGARIT *et al.*, 2002; TANG *et al.*, 2018).

## **1.4. Diagnóstico**

### **1.4.1. Análises Sorológica e Molecular**

Diferentes métodos podem ser empregados para a triagem de infecção pelo VHC, dentre eles os testes sorológicos. Os testes inicialmente aplicados baseiam-se

em triagem de anticorpos anti-VHC, os quais apresentam alta reprodutibilidade, não são invasivos e demandam menor custo quando comparados a técnicas moleculares. Entretanto, a detecção de anticorpos séricos ainda apresenta limitações quanto a acurácia diagnóstica em níveis de sensibilidade e especificidade dos testes para caracterizar e diferenciar infecções recentes (agudas) de passadas (SAAB *et al.*, 2018). Métodos como o ensaio imunoenzimático (ELISA) podem apresentar resultados falso-negativos em pacientes imunodeprimidos (TASHKANDY *et al.*, 2007) ou falso-positivos em pacientes com cicatriz sorológica e já tratados ou curados espontaneamente, mas que permanecem com Anti-VHC positivo (BERGER *et al.*, 2008). Embora a detecção sorológica de anticorpos anti-VHC auxilie no rastreamento, diagnóstico e monitoramento da infecção pelo vírus, apresenta algumas limitações de acurácia, portanto é suplementada por técnicas de biologia molecular, como testes com ácidos nucléicos (NAT – *nucleic acid tests* – em inglês) do VHC (KAMEDA; CORRÊA; CASSIER, 2018).

O Ministério da Saúde, através da portaria nº 2.265, de 16 de outubro de 2014, incluiu a utilização da metodologia NAT em procedimentos, medicamentos e OPM (Órteses próteses e materiais especiais) do SUS, habilitando os serviços de hemoterapia brasileiros quanto a sua implantação, contribuindo com uma identificação mais rápida do VHC na população (CONITEC, 2015). Dentre os NAT, técnicas como a reação em cadeia da polimerase (PCR) revolucionaram clinicamente o diagnóstico da infecção viral pela detecção do RNA próprio do vírus (SAIKI *et al.*, 1986). O aprimoramento da técnica com base em transcrição reversa associada à amplificação por PCR resultou no qPCR, o que possibilitou avaliar quantitativamente o RNA viral (carga viral), assim como identificar o genótipo do vírus e subtipos, facilitando a criação de estratégias terapêuticas a partir da confirmação da infecção (SCHLABE; ROCKSTROH, 2018; XIANG *et al.*, 2019). Além de excluir os resultados falso-positivos provindos dos testes sorológicos; demonstra com eficácia infecções ativas, confirmando o diagnóstico de infecção (AGUILERA *et al.*, 2010).

#### 1.4.2. Análises Histológicas

Após o diagnóstico da infecção, sua evolução deve ser acompanhada para que o melhor protocolo terapêutico seja proposto para cada fase da doença. Considerando o estadiamento da hepatite C, a biópsia hepática ainda é considerada o método de

referência. Em associação com técnicas de imagem, como a elastografia hepática, método não invasivo para detecção de fibrose e cirrose, observa-se boa correlação, complementando a abordagem diagnóstica (DA SILVA *et al.*, 2020; DHYANI; ANVARI; SAMIR, 2015).

A biópsia hepática fornece informações quanto ao grau da necroinflamação tecidual, doenças coexistentes (esteatose, sobrecarga de ferro), presença de nódulos suspeitos e ainda auxilia na classificação da fibrose estágio a estágio em que se apresentam os indivíduos a partir da lesão decorrente da infecção. Embora seja o método mais assertivo, trata-se de um procedimento muito invasivo, motivo pelo qual a técnica nem sempre é indicada. Além disso, a baixa representatividade da biópsia também é um ponto negativo do método, pois nem sempre o estado do órgão como um todo é refletido no fragmento coletado, o que traz o risco de erros de amostragem e dificuldade de reprodutibilidade dos resultados (ALMPANIS; DEMONAKOU; TINIAKOS, 2016; BEDOSSA; PATEL, 2016).

Devido à invasibilidade do método, algumas complicações e/ou situações indesejáveis podem surgir. Dentre elas pode-se observar o desenvolvimento de quadro de dor pelos indivíduos submetidos às análises histológicas, além de risco de disseminação tumoral e sangramento hepático. Tais complicações indicam que é necessária a reavaliação do método utilizado como referência para o estadiamento de doenças hepáticas, e sua substituição por metodologias menos invasivas (DI TOMMASO *et al.*, 2019).

#### 1.4.3 Análises de Imagem

As doenças hepáticas agudas e crônicas podem ser também acompanhadas por métodos não invasivos, como exames baseados em imagem. A técnica de ultrassom, por exemplo, contribui na avaliação de diversos aspectos como: biometria, forma, contornos, disposição dos vasos intra-hepáticos e ainda possibilitam a identificação de massas hepáticas, sendo imprescindível na triagem de carcinomas. A técnica é menos invasiva, mas possui limitações diagnósticas quanto às alterações da arquitetura hepática, o que dificulta o uso de ultrassom como técnica única para estadiamento da fibrose hepática e acompanhamento da evolução da hepatite C (MATSUOKA *et al.*, 2011).

Dentre as técnicas de imagem disponíveis, a elastografia transitória baseada em ultrassom é o método mais indicado para o acompanhamento da hepatite C avançada. Baseia-se na medição da elasticidade hepática e apresenta bom desempenho na diferenciação dos graus de fibrose, pois o grau de rigidez captado pela técnica é indicativo de graus de fibrose (BEDOSSA; PATEL, 2016; DA SILVA *et al.*, 2020). Apesar de seu bom desempenho, também apresenta algumas limitações, como o quadro do paciente. Por ser uma técnica que depende da velocidade com que as ondas de ultrassom atravessam o tecido hepático, a acurácia do teste é reduzida em alguns casos, como por exemplo em pacientes obesos ou com quadro de ascite (ALMPANIS; DEMONAKOU; TINIAKOS, 2016).

#### 1.4.4 Marcadores Biológicos

Como alternativas às técnicas diagnósticas empregadas atualmente têm surgido os marcadores biológicos. Consistem em moléculas presentes no sangue e outros fluidos biológicos e que demonstram relação com a infecção e sua evolução quando suas concentrações se encontram alteradas. Os marcadores de fibrose hepática podem ser divididos em marcadores indiretos e diretos de fibrogênese. Marcadores indiretos incluem testes bioquímicos capazes de demonstrar com boa acurácia a presença de disfunções hepáticas (ZAMIN *et al.*, 2002).

Dentre os marcadores indiretos, as enzimas hepáticas podem ser indicativas de lesões hepáticas e, quando associadas aos níveis de RNA viral, podem ser correlacionadas ao início da infecção crônica, demonstrando a importância de um correto acompanhamento clínico e terapêutico no seguimento do diagnóstico (KIM, M. H. *et al.*, 2006). Outro marcador interessante é a apolipoproteína A4 em níveis elevados, principalmente no estágio inicial da fibrose hepática, o que pode ser correlacionado ao estadiamento da fibrose hepática. Sugere-se que o uso desse biomarcador, associado aos já existentes, poderia conferir maior sensibilidade e especificidade para detecção precoce da fibrose hepática (WANG, P. W. *et al.*, 2017).

Já os marcadores diretos podem ser aqueles associados a transição epitelial-mesenquimal para síntese de matriz extracelular, e pela sua função podem também contribuir em muito para o diagnóstico da lesão hepática. Alguns desses marcadores foram relacionados a mecanismos patogênicos da atividade fibrogênica, como: a

proteína morfogênica óssea (BMP), o fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF), e o fator de crescimento de transformação beta (TGF-  $\beta$ 1) (M ZOHEIRY *et al.*, 2015). A evolução desses conhecimentos fornece maiores embasamentos sobre como tais mecanismos centrais da fibrogênese se comportam, tornando possível novas estratégias diagnósticas direcionadas.

Entender a biologia da matriz extracelular e da fibrose hepática, bem como as vias sinalizadoras envolvidas permite inovar as abordagens aplicadas na clínica. A partir da descoberta e aplicação de biomarcadores não invasivos de fibrose e fibrogênese, um diagnóstico mais assertivo pode ser alcançado e o tratamento personalizado se torna cada vez mais próximo da realidade.

Considerando que a hepatite C é um fator de risco bem estabelecido para o desenvolvimento do carcinoma hepatocelular, é de suma importância encontrar marcadores que indiquem o estágio de evolução da doença, o que inclui também os graus de fibrose. A partir daí, torna-se possível a criação de planos terapêuticos estratégicos para cada paciente, de acordo com o estágio da doença em que se encontram. Desta forma, algumas ferramentas têm se mostrado muito úteis na triagem de marcadores moleculares para diferentes doenças, dentre elas as ômicas (BLASCO *et al.*, 2018; REDENŠEK; DOLŽAN; KUNEJ, 2018).

### **1.5. Metabolômica**

Recentemente, a busca por compreender as alterações moleculares associadas aos processos patológicos de forma mais abrangente alavancou a análise sistemática dos níveis de expressão de componentes de um sistema biológico, tais como genes, RNAm, proteínas e metabólitos. O catalogamento global destes componentes, tem dado origem a vários “OMAs” (o genoma, o transcriptoma, o proteoma e o metaboloma) (EWING; GREEN, 1998; REDENŠEK; DOLŽAN; KUNEJ, 2018).

Para o estudo sistemático e completo da série de intermediários de baixo peso molecular, não proteicos, sintetizados endogenamente (o metaboloma), e que representam o fenótipo de forma mais direta, temos a metabolômica. Dentre as

moléculas que fazem parte do metaboloma estão os aminoácidos, ácidos nucleicos, açúcares e os lipídeos (KIM, S. J. *et al.*, 2016).

Combinando a genômica, a transcriptômica, a proteômica e a metabolômica é possível fornecer informações importantes que sirvam de base na criação de ferramentas para examinar mudanças fenotípicas (CANUTO *et al.*, 2018). Em busca de análises mais detalhadas e abrangentes de componentes de um sistema biológico, a modernização e o refinamento de processos instrumentais dentro da química analítica vêm permitindo que diferentes analitos, dentre eles metabólitos, sejam identificados, esclarecidos e correlacionados dentro da metabolômica (YANG *et al.*, 2019).

Um dos métodos mais utilizados recentemente pela metabolômica é a Espectrometria de Massas (EM), capaz de detectar e identificar componentes amostrais de interesse (HORNING; HORNING, 1971; NICHOLSON; LINDON; HOLMES, 1999). Em EM os resultados são baseados em análises de íons, de acordo com suas razões massa/carga ( $m/z$ ) e suas abundâncias relativas, as quais são registradas num *plot* de intensidade, medida amplificada e exibida através de um espectro de massas. Para tal, técnicas de ionização, analisadores e detectores são indispensáveis na análise de moléculas em diferentes amostras, dentre elas, espécimes biológicos (BALDWIN, 2005; LEI; HUHMAN; SUMNER, 2011).

Dentro da espectrometria de massas, diferentes técnicas de ionização atuam na formação de íons de acordo com sua razão massa/carga, como ESI (Ionização por *Electrospray*), EI (Impacto de Elétrons), MALDI (Ionização por Dessorção a Laser Assistida por Matriz) e APCI (Ionização Química à Pressão Atmosférica) (ABDELNUR, 2011; HALLOUM *et al.*, 2017). Opções de ionização suave, como ESI, são muito úteis, por exemplo, para identificação de moléculas intactas, de baixo peso molecular, pois a formação dos íons não leva à fragmentação molecular. Para análise de matrizes biológicas é, portanto, a técnica de ionização mais indicada, uma vez que fluidos biológicos apresentam elevada complexidade molecular (KIM, S. J. *et al.*, 2016; PINU *et al.*, 2019).

Em EM existem também diversos analisadores associados a diferentes fontes de ionização que selecionam os íons gerados de acordo com suas massas/cargas,

sejam em amostras biológicas ou não. De acordo com a configuração do equipamento, é possível obter resultados próximos aos reais com a sensibilidade e especificidade elevadas, com bom poder de resolução e boa faixa dinâmica para cada tipo de analisador, como TOF – analisador do tempo de voo (*time of flight*, em inglês), ION TRAP – captura de íons (*ion trap*, em inglês), ressonância ciclotrônica de íons (FT-MS), LTQ-ORBITRAP (analisador quadrupolo híbrido) (GROSS, 2017). Associando técnicas de ionização suave, analisadores e detectores que, em conjunto, forneçam uma análise de alta resolução, a espectrometria de massas constitui uma importante ferramenta analítica, permitindo o estudo de amostras complexas, como por exemplo moléculas orgânicas em fluidos biológicos (AMBERG *et al.*, 2017; ZHANG, A. *et al.*, 2012).

A espectrometria de massas pode ainda gerar uma “impressão digital” química (do inglês *fingerprinting*) de amostras biológicas, quando a análise se dá principalmente por injeção direta, sem separação prévia dos compostos. A vantagem desse *fingerprinting* é a avaliação molecular exploratória, sendo que, até mesmo aquelas moléculas ainda desconhecidas sejam elencadas como marcadores, possibilitando descobertas científicas importantes com potencial aplicação futura no desenvolvimento de medicamentos (GOLIZEH *et al.*, 2018; MEONI *et al.*, 2019; SALGÜERO *et al.*, 2020).

A análise metabolômica não direcionada, baseia-se em uma análise exploratória que permite o reconhecimento de metabólitos extraídos de uma amostra complexa como o sangue, facilitada pela análise de massas por um espectrômetro de massas de alta resolução. Além de fornecer importantes informações no que se diz respeito à caracterização estrutural das moléculas encontradas, metabólitos interconectados assim como vias relacionadas, podem posteriormente ser submetidos a testes de validação (JOHNSON; IVANISEVIC; SIUZDAK, 2016).

Nesse contexto, alguns estudos vêm sendo feitos para identificar biomarcadores e melhor compreender as doenças, como a hepatite C. De acordo com Nomair e colaboradores (2019), o perfil metabolômico plasmático de pacientes com Hepatite C, discriminados pela presença de cirrose ou carcinoma hepatocelular, identificou 34 metabólitos, dos quais 5 obtiveram forte poder de discriminação na separação entre os grupos cirróticos dos com carcinoma hepatocelular. O autor infere

relação de ácidos graxos nos caminhos metabólicos, mas alerta que ainda há necessidade de mais pesquisas de campo a fim de entender tais rotas bioquímicas em consenso com as estratégias de tratamento e prevenção do CHC (NOMAIR *et al.*, 2019).

A fim de entender como os metabólitos sintetizados endogenamente desempenham suas funções, representando o resultado final da expressão gênica, a metabolômica apresenta-se como uma eficiente ferramenta de avaliação do perfil metabólico sem alvos definidos. Essa possibilidade permite uma varredura exploratória de componentes dentro de um sistema biológico, os quais representam o fenótipo celular, produto do metabolismo celular (ZHANG, T. *et al.*, 2016). Sendo assim, a análise metabolômica, pode contribuir para a melhor compreensão do fenótipo adquirido e para a elucidação de processos moleculares por meio da identificação de potenciais biomarcadores.

## **2. JUSTIFICATIVA**

A hepatite C é um fator de risco isolado para o desenvolvimento de cirrose e até mesmo carcinoma hepatocelular. O diagnóstico precoce da infecção e o monitoramento assertivo da sua evolução são essenciais para melhorar a qualidade de vida dos pacientes e reduzir a mortalidade daqueles que progridem para quadros mais graves, como CHC. Portanto, identificar biomarcadores que possam servir de indicadores de diagnóstico e/ou prognóstico para graus de fibrose presentes na Hepatite C representa, a médio prazo, o pontapé inicial para o desenvolvimento de um ensaio laboratorial para detecção precoce de marcadores da infecção, bem como de biomarcadores típicos de evolução da doença, principalmente para o risco de carcinoma hepatocelular, aumentando assim as chances de sobrevivência dos pacientes.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

O objetivo do trabalho foi selecionar biomarcadores de baixo peso molecular com potencial para utilização futura na hepatite C e para prognóstico da evolução da doença, visando identificar marcadores preditivos para o risco de CHC.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- 3.2.1. Selecionar biomarcadores indicativos de hepatite C por meio de análise metabólica;
- 3.2.2. Verificar o potencial dos marcadores para aplicação futura;
- 3.2.3. Selecionar biomarcadores para cada grau de fibrose dos pacientes com hepatite C por meio de análise metabólica;
- 3.2.4. Selecionar marcadores com potencial preditivo para o risco de CHC na fibrose hepática avançada em decorrência da infecção crônica pelo vírus da hepatite C.

## 4. CASUÍSTICA E MÉTODOS

### 4.1. Casuística

O estudo foi realizado com amostras de plasma que já haviam sido previamente coletadas, congeladas e armazenadas de voluntários saudáveis (Grupo Controle – CT) e de pacientes atendidos pelo Ambulatório de Hepatites da Faculdade de Medicina de Botucatu-FMB-UNESP (Grupo Doente - VHC). O presente projeto foi submetido à avaliação pelo Comitê de Ética em Pesquisa em seres humanos de acordo com o CAAE: 16713919.5.0000.5411, e foi aprovado de acordo com o parecer 3.666.609 (Anexo 1).

O grupo CT foi formado por 50 voluntários saudáveis de ambos os sexos, entre 18 e 80 anos, não aparentados, sem histórico de doenças hepáticas. Já o grupo VHC foi formado por 46 indivíduos com hepatite C avançada, de ambos os sexos, entre 18 e 60 anos, não aparentados, diagnosticados com Hepatite C (Quadro 2). As amostras foram selecionadas de acordo com informações obtidas através de prontuários físicos e eletrônicos (Ambulatório). Essa seleção permitiu a realização de uma avaliação clínica padronizada, essencial para o delineamento do estudo, como idade, sexo, genótipo, graus de fibrose, tratamento, cirrose, CHC, presença de diabetes, coinfeções, comorbidades, tabagismo.

	<b>GRUPO CONTROLE</b>		<b>GRUPO VHC</b>	
<b>GÊNERO</b>	<b>Feminino</b>	<b>Masculino</b>	<b>Feminino</b>	<b>Masculino</b>
<b>N</b>	25	25	17	29
<b>IDADE</b>	45	35	54	48

**Quadro 2.** Descrição dos indivíduos participantes do estudo de acordo com o número amostral (N), o gênero e a idade (representada em valores de mediana).

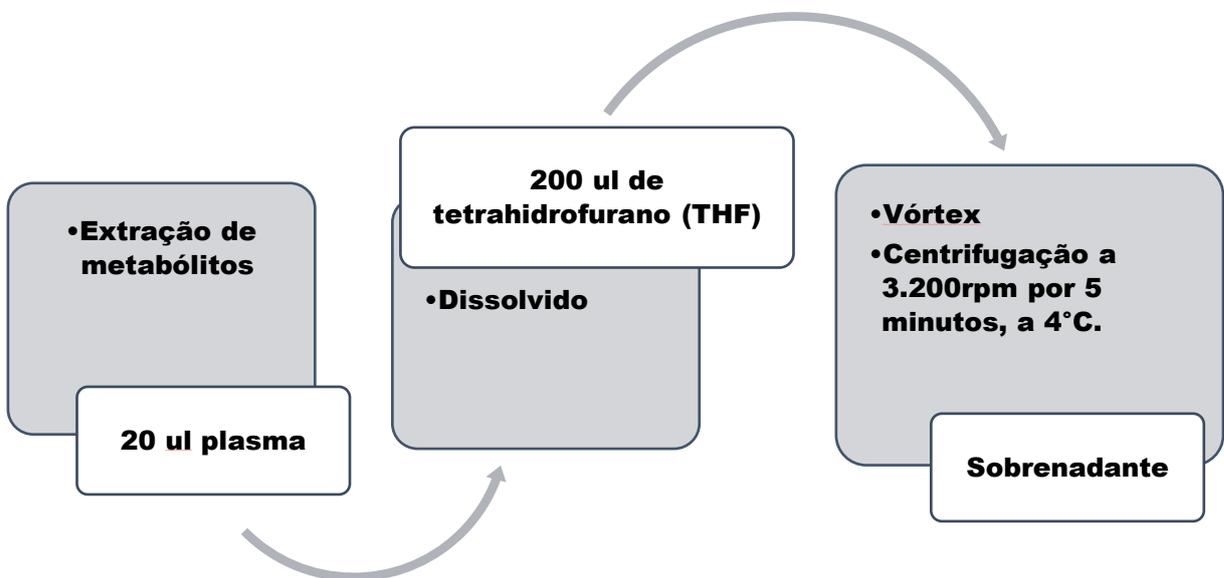
### 4.2. Métodos

#### 4.2.1. Preparo de amostras:

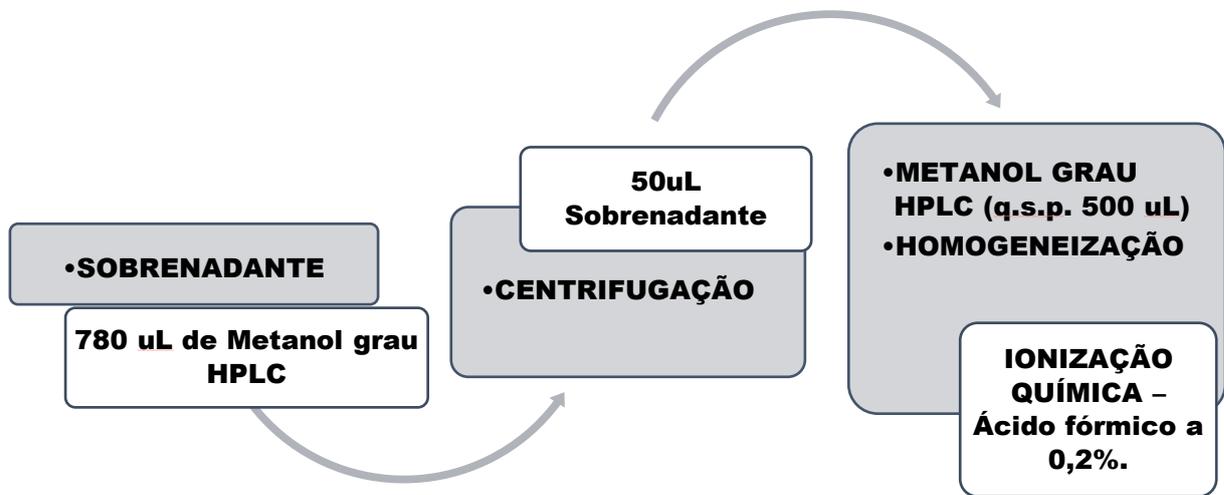
Amostras de plasma derivado de sangue periférico foram submetidas à extração de metabólitos para a análise metabólica em duas etapas. Na primeira

etapa (Figura 5), uma alíquota de 20 µL de plasma sanguíneo foi dissolvido em 200 µL de THF (tetrahidrofurano). A amostra foi então submetida a agitação e, posteriormente, à centrifugação a 3.200 rpm, por 5 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi coletado para etapas posteriores e o restante do material foi descartado.

Já na segunda etapa de extração de metabólitos (Figura 6), adicionou-se 780 µL de metanol grau HPLC ao sobrenadante gerado na primeira etapa. A solução foi novamente submetida a centrifugação nos mesmos parâmetros citados acima. 50 µL deste sobrenadante foram adicionados a metanol grau HPLC (q.s.p. 500 µL), homogeneizado e submetido à ionização química com ácido fórmico a 0,2%. Essa solução ionizada foi então enviada para análise em um Espectrômetro de Massas *Linear Trap Quadrupole* (LTQ), cuja fonte de ionização utilizada foi baseada em *electrospray*. Os íons carregados foram analisados no modo positivo quanto à relação *m/z* e intensidade de sinal, o que gerou um conjunto de íons próprio de cada amostra. Esses dados foram agrupados de acordo com os grupos a serem analisados e foram submetidos a análise estatística.



**Figura 5:** 1° Etapa - Preparo da amostra



**Figura 6:** 2º Etapa - Preparo da amostra.

#### 4.2.2. Análise por Espectrometria de Massas:

As análises em espectrômetro de massas foram realizadas em parceria com o laboratório Innovare de Biomarcadores da UNICAMP, que gentilmente nos cedeu a infraestrutura necessária. Para a análise, todas as amostras foram diretamente injetadas no equipamento ESI-LTQ-XL (Thermo Scientific, Bremen, Alemanha) de acordo com os seguintes parâmetros: fluxo da amostra de 10  $\mu\text{L}.\text{min}$ , temperatura do capilar de 180°C, 7 kV de tensão no spray e gás de arraste em 2 unidades arbitrárias. A análise por MS foi realizada utilizando-se 10 replicatas analíticas para cada replicata biológica. A faixa de massa utilizada para a análise das amostras de soro foi de 100-1400  $m/z$ .

#### 4.2.3. Análise Estatística:

Devido às diferenças nas intensidades relativas de metabólitos entre os grupos, as amostras foram analisadas *in silico* utilizando ferramentas de biologia de sistemas, dentre elas a plataforma *MetaboAnalyst 3.0*. O poder preditivo foi determinado utilizando a ferramenta estatística PLS-DA (análise discriminante por mínimos

quadrados parciais), que auxiliou na identificação de marcadores diferenciais entre os grupos estudados. A análise realizada gera uma lista de marcadores com base em sua importância para cada grupo, o que é representado pelo gráfico de *VIP Score* (*VIP – Variable Importance in Projection*). Outra análise realizada foi a verificação do  $\text{Log}_2(\text{FC})$ , cuja análise nos permitiu identificar os marcadores mais discriminantes quanto à intensidade de sinal para os grupos Controle e VHC. A partir desses marcadores, a curva ROC (*Receiver Operating Characteristic Curve*) foi gerada, para averiguação do potencial diagnóstico dos marcadores.

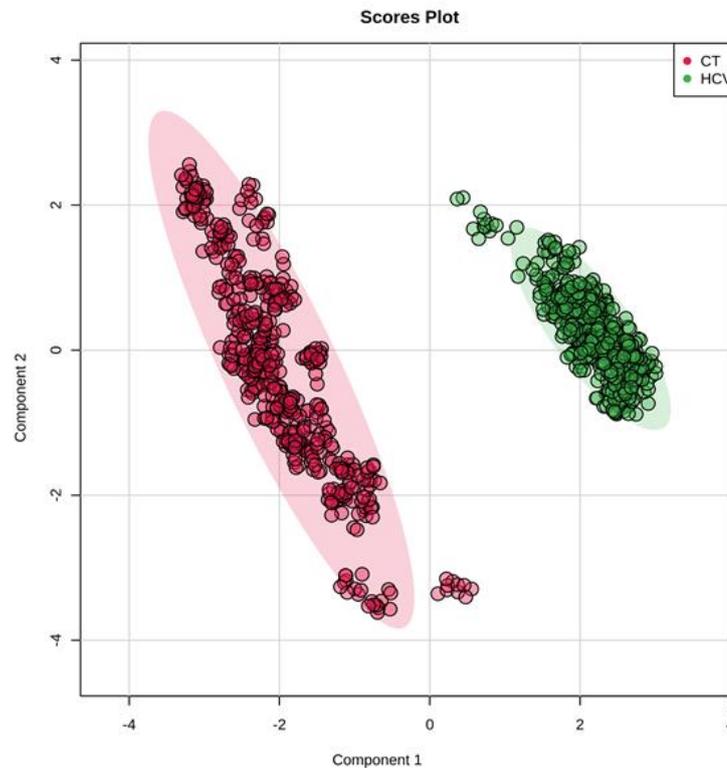
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diante da necessidade de identificar métodos menos invasivos que auxiliem no diagnóstico e acompanhamento da hepatite C, os resultados obtidos no presente trabalho apresentam-se promissores. Foi possível observar diferentes perfis de marcadores para cada análise comparativa, sejam marcadores importantes para diferenciar VHC de indivíduos saudáveis, ou marcadores que apresentaram maior importância de acordo com o grau de fibrose dos pacientes.

### 5.1. Biomarcadores para Hepatite C

Na primeira análise, o método utilizado (injeção direta associada à ionização por *electrospray*) possibilitou a identificação do *fingerprinting* das amostras, o qual representa um perfil de metabólitos próprio para cada condição estudada. Este perfil encontra-se representado abaixo na projeção de importância (*VIP score*), obtida através do método estatístico multivariado de PLS-DA – Figura 7.

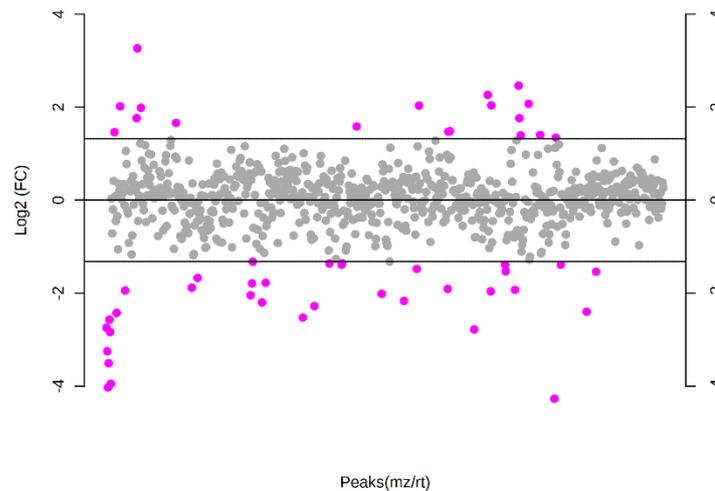




**Figura 8.** *Score plot* gerado a partir da análise pelo PLS-DA no estudo comparativo entre os grupos CT (N = 500 replicatas analíticas) e VHC (N = 460 replicatas analíticas).

Ao se analisar a figura 8, observa-se que os marcadores selecionados no *VIP Score* foram capazes de estabelecer uma nítida separação entre os grupos testados, o que significa que tais metabólitos foram mais importantes no sistema biológico, de saúde ou doença, identificando indivíduos de acordo com seu status.

Para melhor compreender as intensidades de sinal que mais apresentam diferença entre as amostras, realizou-se a análise de *Fold Change*. Nesta análise, definiu-se a relação dos marcadores entre os grupos de maneira que os metabólitos fossem selecionados de acordo com sua intensidade para a relação VHC/CT, com um limite de corte estabelecido para *Fold Change* (FC)  $\geq 2,5$  (Figura 9).



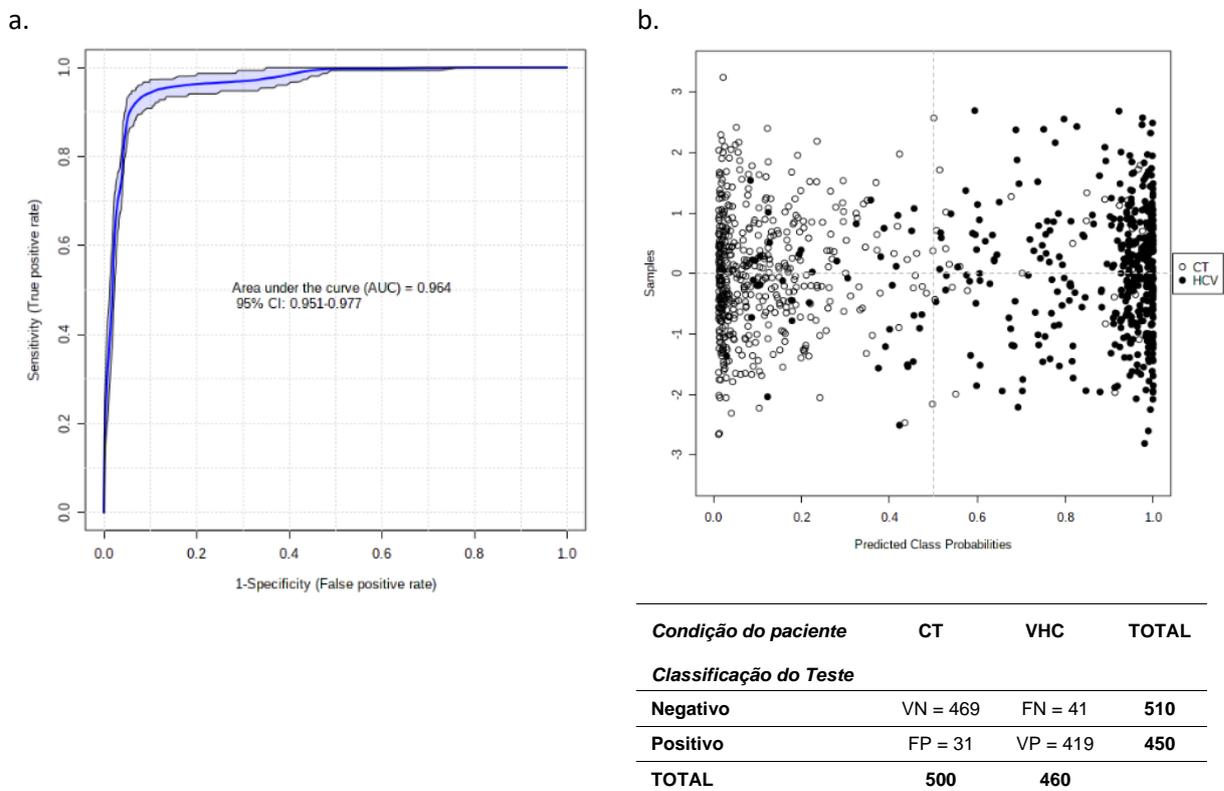
**Figura 9.** Análise de *Fold Change* para a seleção de marcadores diferenciais na relação VHC/CT com base em  $\log_2(\text{FC})$  de intensidades de sinal. ●, marcadores que extrapolam o limite de corte positivo ou negativo.

Nesta análise, é possível observar os biomarcadores cujas intensidades de sinal são pelo menos 2,5 vezes mais discrepantes entre os grupos (marcadores destacados em rosa). O gráfico acima evidenciou aqueles marcadores cujas intensidades foram mais abundantes no grupo VHC em relação ao grupo CT pelo cálculo de  $\text{Log}_2(\text{FC})$ , estratégia estatística para facilitar a visualização dos marcadores de acordo com o limite de corte estabelecido ( $\text{Log}_2(2,5) = 1,32$ ). Sendo assim, os marcadores mais abundantes para a relação VHC/CT a serem selecionados estão apresentados acima do limite de corte de  $\text{Log}_2 = 1,32$ . Aqueles que atenderam ao critério estabelecido estão descritos na tabela 2.

**Tabela 2.** Marcadores selecionados para a relação VHC/CT com  $\text{FC} \geq 2,5$ .

Marcador (m/z)	<i>Fold Change</i>	$\log_2(\text{FC})$
821	12,835	3,682
931	7,6115	2,9282
982	6,9751	2,8022
936	6,2326	2,6398
845	2,7882	1,4793

A partir dos marcadores selecionados de acordo com a tabela 2, propôs-se que aqueles com  $FC \geq 2,5$  fossem avaliados quanto à sensibilidade e especificidade que podem conferir a testes diagnósticos para hepatite C, baseado em sua identificação. Para isso, os marcadores com relações massa/carga de 821, 931, 982, 936 e 845 foram testados para a geração de uma curva ROC (Figura 10), e a eles foi acrescentado o marcador  $m/z = 143$ , mais importante no VIP Score.



**Figura 10.** Análise de sensibilidade e especificidade dos marcadores selecionados para detecção de hepatite C. **a.** Curva ROC gerada a partir de 6 biomarcadores selecionados para hepatite C; **b.** Matriz de confusão (tabela de contingência) gerada para os mesmos marcadores (CT: N = 500 replicatas analíticas; VHC: N = 460 replicatas analíticas; VN: verdadeiro negativo; VP: verdadeiro positivo; FN: falso negativo; FP: falso positivo).

A partir da análise da curva ROC (Figura 10a), observa-se área sob a curva (AUC) de 96,4%, gerada com base na sensibilidade (eixo Y) e na especificidade (eixo X: 1 - especificidade). A classificação do teste, baseada em nosso modelo de marcadores selecionados, demonstra a distribuição dos indivíduos CT e VHC, através

da matriz de confusão (Figura 10b). Essa métrica permitiu o cálculo da quantidade de amostras falso positivas, falso negativas, verdadeiros positivos e verdadeiros negativos. De acordo com os marcadores selecionados, a matriz de confusão demonstrou que o teste proposto apresentou sensibilidade e especificidade de 91,1% e 93,8%, respectivamente, e gerou uma curva ROC de área sob a curva de 96,4% (AUC), o que indica alta acurácia do teste (acima de 95%) para classificar se os indivíduos estão infectados pelo VHC ou não.

Ao considerar a característica interdisciplinar da metabolômica não direcionada, os marcadores selecionados abrangem o metaboloma global de um sistema biológico. Nesse sentido, traz à tona diferentes classes moleculares dentro do grupo de pequenas moléculas (metabólitos intermediários, hormônios, moléculas de sinalização e metabólitos secundários) (COLLINO; MARTIN; REZZI, 2013). Uma das funcionalidades atribuídas à metabolômica é a possibilidade de identificar metabólitos e interpretar suas correlações em vias bioquímicas associadas ao metabolismo. As ferramentas para integrar os metabólitos no conhecimento biológico dependem de alguns recursos para sua identificação, como a espectrometria de massas *in tandem* (MS/MS) e a consulta a bancos de dados de metabólitos (GOODWIN *et al.*, 2014; GOWDA *et al.*, 2014). Sendo assim, os metabólitos selecionados no presente trabalho poderão, a médio prazo, ser identificados; a partir dessa identificação, a compreensão da fisiologia da hepatite C será ampliada, pois a função dos biomarcadores será conhecida e a rede de conexões bioquímicas, esclarecida.

Embora os biomarcadores não tenham sido identificados, a relação massa/carga selecionada já pode contribuir em muito para outra abordagem em relação à doença, ou seja, o diagnóstico. Partindo das tecnologias analíticas disponíveis atualmente, apenas a seleção dos marcadores com potencial diagnóstico pode ser suficiente para se estabelecer um perfil de doença, ou um perfil de saúde. Esse potencial é observado pela curva ROC gerada com um ou mais biomarcadores. É estabelecido que, quando os parâmetros da curva ROC são analisados, a AUC representa a acurácia do teste diagnóstico, em que o valor de 1,0 (100%) indica um teste perfeito; neste caso, a sensibilidade e a especificidade apresentam os valores máximos devido à ausência de sobreposição entre os grupos avaliados. Caso AUC apresente valor de 0,5 (50%), é um indicativo de que o teste não tem valor diagnóstico,

pois se assemelha à chance aleatória de acometimento ou não pela doença (BÜNGER; MALLETT, 2016). No presente trabalho, a análise da curva ROC indica que o conjunto de marcadores avaliado apresenta boa acurácia, considerando o valor obtido para AUC. Assim, pode-se inferir que os marcadores representados pelas *m/z* 821, 931, 982, 936, 845 e 143 têm potencial para utilização em teste diagnóstico para hepatite C, pois apresentam sensibilidade e especificidade acima de 90%, quando analisados em conjunto.

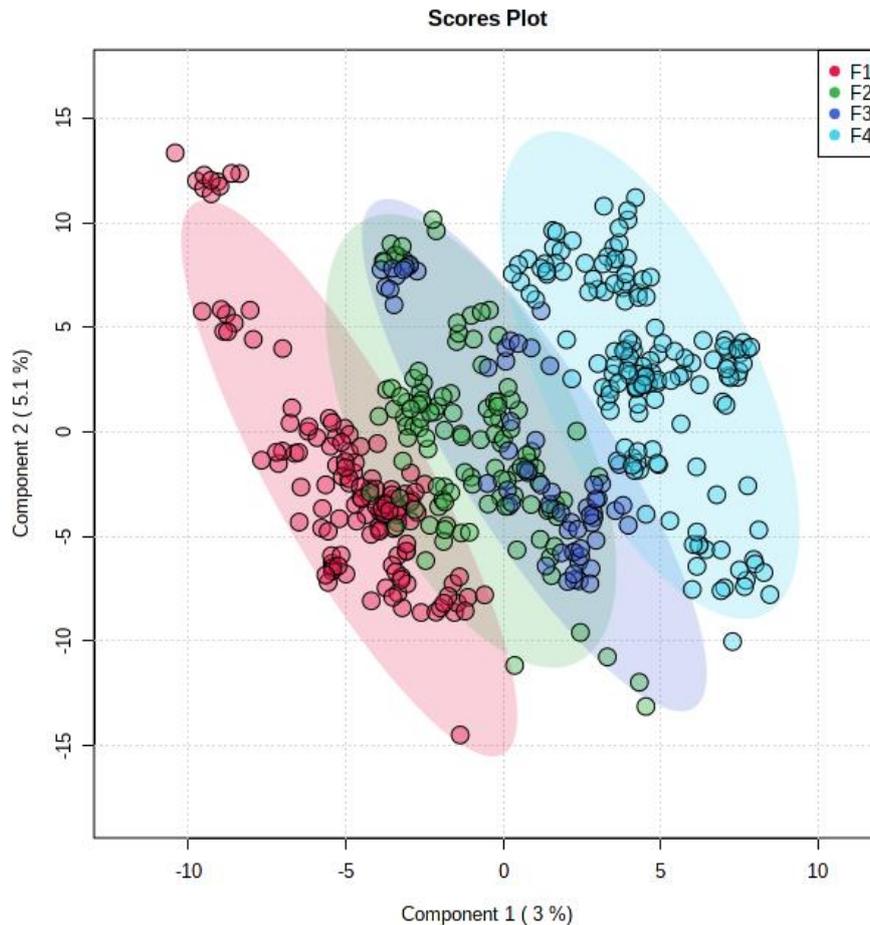
## 5.2. Biomarcadores para Graus de Fibrose na Hepatite C

Com o objetivo de identificar marcadores diferenciais para os graus de fibrose, os indivíduos diagnosticados com hepatite C (grupo VHC) foram separados de acordo com os graus de fibrose definidos pelo método padrão ouro, a biópsia (Quadro 3). Nessa análise, os biomarcadores selecionados para os graus mais avançados, como F3 e F4, podem representar metabólitos do risco de evolução para carcinoma hepatocelular.

	<b>F1</b>	<b>F2</b>	<b>F3</b>	<b>F4</b>
<b>N</b>	13	12	6	15
<b>IDADE</b>	54	49,5	57	59

**Quadro 3.** Pacientes com hepatite C separados de acordo com os graus de fibrose, o número amostral (N) e a idade (representada em valores de mediana).

Nessa segunda análise, apenas os indivíduos infectados foram submetidos à análise estatística multivariada por PLS-DA, também na plataforma *Metaboanalyst 3.0*, porém os dados espectrais foram comparados entre si de acordo com os graus de fibrose de cada replicata analisada. Nessa avaliação, o método estatístico apresentou a separação entre grupos de acordo com o *Score plot* apresentado na figura 11.



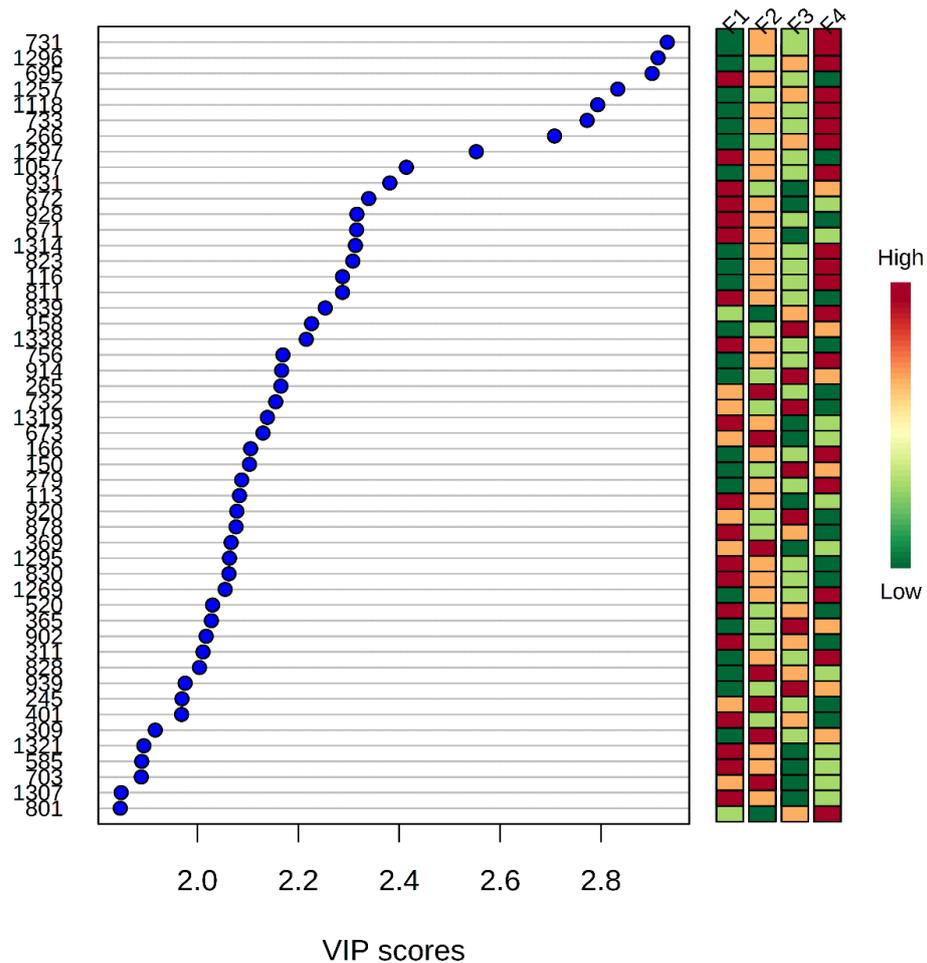
**Figura 11.** *Score plot* gerado a partir da análise pelo PLS-DA no estudo comparativo entre os grupos F1 (N = 13, vermelha), F2 (N = 12, verde), F3 (N = 6, azul escura) e F4 (N=15, azul clara).

Ao se analisar comparativamente os graus de fibrose, o gráfico de *Scores plot* (Figura 11) mostrou que não houve separação nítida entre alguns grupos, principalmente entre os graus de fibrose intermediários, como entre os grupos F1 e F2, F2 e F3, F3 e F4. Já quando se analisam os grupos extremos, F1 e F4, a separação é nítida. Essa observação se deve às diferenças moleculares e morfológicas intensas entre os graus de fibrose 1 e 4. Ou seja, tanto a biópsia quanto a análise molecular foram capazes de identificar padrões muito divergentes entre os

graus 1 e 4. Entretanto, os graus de fibrose intermediários não foram bem diferenciados. Um dos motivos para esse resultado é que os pacientes foram inicialmente diagnosticados com base em análise histológica. Esta, por sua vez, apresenta variabilidade inerente ao observador, o que pode comprometer o desempenho diagnóstico. Para um mesmo fragmento de biópsia hepática, analisado por diferentes patologistas, há concordância de resultados em 77% dos casos. Considerando-se amostras de fibrose hepática em fases intermediárias, a concordância entre os observadores já cai para cerca de 42% (CHINDAMO et al., 2015). Outro ponto importante é a qualidade do fragmento da biópsia em si, o que também interfere na concordância dos resultados entre os observadores. Por exemplo, amostras muito pequenas estão associadas ao sub-estadiamento da fibrose (SCHEUER, 2003). Outro interferente é a quantidade de tratos portais presentes nos fragmentos, sendo recomendado a presença de pelo menos 11 tratos portais completos por fragmento (COLLOREDO et al., 2003). Observa-se, portanto, que a análise histopatológica apresenta algumas variáveis que interferem negativamente no estadiamento da hepatite C.

Com base nas discrepâncias dos resultados da biópsia, é possível afirmar que a metabolômica foi capaz de identificar mudanças sutis em marcadores moleculares. Por exemplo, ao observar a área de intersecção entre os grupos F1 e F2, a técnica detectou marcadores moleculares com divergência sutil entre eles, mas que podem indicar se um paciente está evoluindo para o grau 2. Ou é possível ainda que os pacientes identificados na biópsia como F2, estavam ainda em um estágio mais preliminar, ainda entre F1 e F2. O mesmo pode ser afirmado para os demais estágios intermediários, F2 e F3.

Buscando identificar os marcadores responsáveis pelo gráfico de *Score plot*, buscou-se analisar o gráfico de VIP Score, que apresenta as relações massa/carga dos metabólitos mais importantes para cada estágio de fibrose (Figura 12).



**Figura 12.** Marcadores identificados para os grupos F1, F2, F3 e F4 de acordo com o *VIP score*, a partir da análise PLS-DA. Lateralmente à direita encontra-se a importância de cada marcador para cada grupo analisado, de acordo com a escala de cor.

Quando observamos a figura 12, alguns marcadores apresentam menor importância para o grau F1 e aumentam sua importância gradativamente até alcançar importância máxima no grau F4, o que sugere que o metabolismo associado a estes marcadores muda e se intensifica à medida que a fibrose evolui. Alguns exemplos são os marcadores cuja relação massa/carga correspondem a 1296 e 1257; mas o inverso também é verdadeiro para o marcador de  $m/z = 695$ , em que a maior importância está designada para o grupo F1, e a menor importância cai gradativamente passando pelos graus F2, F3 e chegando ao F4, em que apresenta menor importância para o fenótipo de maior grau de fibrose. Essas alterações observadas nos dão pistas a respeito do comportamento dos metabólitos frente à evolução da doença e instiga a investigação

científica para identificar o marcador e avaliar seu potencial de aplicação em futuros testes prognósticos.

Visando facilitar a observação de cada marcador mais importante para cada grau de fibrose, com potencial prognóstico, os valores de  $m/z$  foram distribuídos na tabela 3 de acordo com o grupo para o qual apresentam maior relevância.

**Tabela 3.** Relação  $m/z$  das moléculas obtidas pela análise metabolômica de acordo com o grau de fibrose.

F1	F2	F3	F4
695	265	158	731
1297	673	914	1296
931	369	732	1257
672	828	150	1118
928	245	920	733

Quanto aos marcadores de prognóstico, o estudo possibilitou a seleção de um perfil de marcadores presentes nos graus de fibrose F3 e F4 que podem ser indicativos do risco para carcinoma hepatocelular. A tabela 3 apresenta os 5 marcadores mais importantes para os graus de fibrose F3 e F4, os quais têm potencial para ser utilizados em avaliações futuras de predição para o risco de CHC. Alguns estudos têm demonstrado que o risco de CHC aumenta de acordo com o grau de fibrose avaliado histologicamente (GERMANI *et al.*, 2011). Uma alternativa já testada é a quantificação do índice de colágeno proporcional por área avaliada, que pode também contribuir para a estimativa de risco de CHC (TSOCHATZIS *et al.*, 2014). Entretanto, a variabilidade dos resultados histológicos dificulta o estabelecimento assertivo de risco, o que tem levado à busca por novas formas de predizer a evolução da doença. Uma das abordagens propostas é correlacionar o risco para CHC com o índice de rigidez hepático, medido pelos testes de elastografia. SEO e colaboradores, por exemplo, mostraram que o risco de desenvolvimento de carcinoma hepatocelular aumenta significativamente em pacientes com valores de rigidez hepática elevados, principalmente nas fases F3 e F4 (SEO *et al.*, 2016). O mesmo tem sido proposto por

outros pesquisadores, o que significa que o risco para CHC é diretamente proporcional ao grau de fibrose (MOTOSUGI *et al.*, 2013; SINGH *et al.*, 2013). Entretanto, as técnicas baseadas em imagem, como a elastografia transitória, apresentam alto custo, dependem de infraestrutura complexa e não estão disponíveis em larga escala, como é o caso do Brasil. Sendo assim, novas propostas que identifiquem preditores para o risco de CHC a partir de análises simplificadas tornam-se essenciais para o acompanhamento dos pacientes. Nesse contexto, o presente trabalho traz uma nova proposta para avaliação do risco de CHC, com base em marcadores plasmáticos, de acordo os graus de fibrose mais avançados, como F3 e F4.

Nos últimos anos, a caracterização molecular tem se tornado crucial em diversas doenças, principalmente para o prognóstico, como é o caso do câncer. Com o advento das ômicas, dentre elas a metabolômica, o potencial dos perfis de marcadores pode fornecer prognósticos mais assertivos (LIU *et al.*, 2006; YU *et al.*, 2018). Diferenças sutis podem auxiliar a guiar as decisões terapêuticas ou preventivas, criando uma medicina de precisão, em que o objetivo é “fornecer o tratamento correto no tempo certo, ao paciente certo” (COLLINS; VARMUS, 2015). Portanto, as análises ômicas têm potencial de revolucionar a medicina diagnóstica, tornando-a cada vez mais precisa e impactando positivamente o sistema de saúde como um todo, desde o paciente até a administração em saúde.

Embora as análises metabolômicas estejam trazendo novas abordagens com resultados animadores, ainda não são aplicadas como testes de rotina, diferentemente dos testes com ácidos nucleicos. Ainda que estes sejam capazes de estabelecer o diagnóstico da hepatite C avançada, estimou-se que apenas 19% dos infectados foram diagnosticados, só no ano de 2017 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020), número muito baixo para o total estimado de indivíduos infectados. Diante desse cenário, a Organização Mundial da Saúde definiu uma estratégia global ambiciosa de eliminar a hepatite viral como problema de saúde pública até 2030 (“WHO | Global hepatitis report, 2017,” 2018). Para isso, alguns desafios devem ser superados e os avanços tecnológicos devem ser explorados para aumentar a abrangência da testagem populacional. Dentre esses desafios, a simplificação dos testes e a redução dos custos são pontos importantes a serem explorados. Atualmente, os métodos baseados em NAT são comumente empregados nos laboratórios clínicos e apresentam acurácia elevada. Entretanto sua realização

depende de estrutura laboratorial mais complexa e pessoal altamente capacitado para realização e interpretação dos dados, além de demandar reagentes de alto custo (PEELING *et al.*, 2017). Visando otimizar os testes diagnósticos, algumas melhorias têm sido recomendadas, como a descentralização de instrumentação, a integração de serviços laboratoriais e conectividade de dados.

No presente estudo, o método de preparo da amostra se apresentou mais simples, o tempo de análise mais curto (cerca de 2 minutos por amostra) e a interpretação do resultado tem potencial para ser facilitada. Embora a análise espectral demande pessoal altamente capacitado, alguns estudos têm associado as técnicas ômicas à análise estatística mais refinada, como os algoritmos de aprendizado de máquina (*machine learning* - ML), desenvolvidos e treinados para o reconhecimento de padrões. Várias abordagens de ML têm sido desenvolvidas para análise dos sinais gerados nos espectros de massas. Esses sinais representam o fenótipo, que sofre alterações significativas dependendo do status do organismo, seja exposição a situações de estresse ou não (BERTINI *et al.*, 2009).

Na hepatite C, assim como em qualquer situação de estresse à célula, diversas alterações moleculares ocorrem e refletem no metabolismo, o qual representa o fenótipo celular. Tais mudanças fenotípicas são representadas pelos metabólitos, pois são os mais representativos das alterações intracelulares uma vez que estão no final da teia ômica, ou seja, após modificações gênicas, transcricionais e pós-transcricionais (DUNN; ELLIS, 2005; ZHAO; LIN, 2014). Os biomarcadores selecionados e utilizados para geração da curva ROC apresentam potencial para uso em diagnóstico, mas a interpretação dos sinais espectrais não é tarefa trivial, por isso técnicas de ML têm sido usadas para modelar, inferir e predizer as relações existentes no conjunto de dados biológicos associado ao contexto da doença (CUPERLOVIC-CULF, 2018). Alguns estudos demonstram a utilização dessa associação para diferentes situações, como doenças infecciosas (LIMA *et al.*, 2020), câncer (ZHANG, J. *et al.*, 2017), obesidade (DIAS-AUDIBERT *et al.*, 2020), dentre outras. Portanto, os biomarcadores identificados nos pacientes acometidos por hepatite C avançada podem ser submetidos a treinamento em algoritmos de ML para que, como realizado por Zhang e colaboradores (2017), a identificação do padrão molecular seja indicativo de presença ou ausência da doença, ou até mesmo seja indicativo de prognóstico para evolução dos quadros de fibrose e risco para CHC.

## 6. CONCLUSÃO

No cenário de saúde brasileiro, em que o sistema público é sensivelmente demandado frente à hepatite C, a busca por redução de custos e de complexidade para diagnóstico e prognóstico são de suma importância. Os resultados do trabalho proposto apresentam novos marcadores com potencial para desenvolvimento de métodos menos invasivos, mais rápidos, mais sensíveis e de menor custo quando comparados aos métodos histológicos e de imagem. Além do potencial diagnóstico, alguns marcadores ainda apresentam o potencial para prognóstico, a partir dos quais o risco para desenvolvimento de carcinoma hepatocelular poderá ser inferido, desde que validados. Sendo assim, os marcadores selecionados abrem novas alternativas para o desenvolvimento de métodos diagnósticos e prognósticos que contribuam para o controle da hepatite C avançada e suas comorbidades. A partir daí tornar-se-á possível direcionar de forma mais assertiva as decisões clínicas para cada paciente e impactar positivamente no sistema de saúde, tanto em eficiência médica quanto eficiência financeira.

## **7. APLICABILIDADE**

Os biomarcadores selecionados neste trabalho representam novas alternativas para inovação diagnóstica e prognóstica direcionadas para a hepatite C avançada e sua evolução. Em uma próxima etapa da pesquisa iniciada por esse projeto, os marcadores selecionados serão identificados, caracterizados e validados em uma casuística mais ampla, convertendo seu potencial numa realidade da medicina diagnóstica. Além da aplicação laboratorial, os metabólitos podem ainda se tornar novos alvos terapêuticos, pois sua identificação traz consigo a possibilidade de elucidar funções e interações moleculares que o metabólito pode estabelecer no curso da doença. Dessa forma, os marcadores apresentam potencial para aplicação e inovação no manejo da hepatite C, seja laboratorialmente ou até mesmo a nível terapêutico.

## 8. REFERÊNCIAS

- ABDELAAL, R.; YANNY, B.; EL KABANY, M. *HBV/HCV Coinfection in the Era of HCV-DAA's*. *Clinics in Liver Disease*. [S.l.]: W.B. Saunders. , 1 ago. 2019
- ABDELNUR, P. V. *Infoteca-e: Imageamento químico por espectrometria de massas utilizando MALDI (MALDI Imaging Mass Spectrometry) aplicado a tecidos vegetais*. . [S.l.: s.n.], 2011.
- AGUILERA, A. *et al.* Evaluación crítica de los nuevos métodos comerciales para la determinación de la carga viral del VIH-1 y del VHC. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, v. 28, n. SUPPL. 1, p. 62–67, 1 jan. 2010.
- ALMPANIS, Z.; DEMONAKOU, M.; TINIAKOS, D. Evaluation of liver fibrosis: “Something old, something new....” *Annals of Gastroenterology*, v. 29, n. 4, p. 445–453, 2016.
- AMBERG, A. *et al.* NMR and MS methods for metabolomics. *Methods in Molecular Biology*. [S.l.]: Humana Press Inc., 2017. v. 1641. p. 229–258.
- BALDWIN, M. A. Mass spectrometers for the analysis of biomolecules. *Methods in Enzymology*, v. 402, p. 3–48, 1 jan. 2005.
- BEDOSSA, P.; PATEL, K. Biopsy and Noninvasive Methods to Assess Progression of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*, v. 150, n. 8, p. 1811-1822.e4, 1 jun. 2016.
- BERGER, A. *et al.* Evaluation of the new ARCHITECT anti-HCV screening test under routine laboratory conditions. *Journal of Clinical Virology*, v. 43, n. 2, p. 158–161, out. 2008.
- BERTINI, I. *et al.* The metabonomic signature of celiac disease. *Journal of Proteome Research*, v. 8, n. 1, p. 170–177, jan. 2009.
- BLASCO, H. *et al.* A pharmaco-metabolomics approach in a clinical trial of ALS: Identification of predictive markers of progression. *PLOS ONE*, v. 13, n. 6, p. e0198116, 5 jun. 2018.
- BÜNGER, R.; MALLETT, R. T. Metabolomics and Receiver Operating Characteristic Analysis: A Promising Approach for Sepsis Diagnosis\*. *Critical Care Medicine*, v. 44, n. 9, p. 1784–1785, 1 set. 2016.
- BUTT, A. A. *et al.* Liver fibrosis progression in hepatitis c virus infection after seroconversion. *JAMA Internal Medicine*, v. 175, n. 2, p. 178–185, 1 fev. 2015.
- CANUTO, G. A. B. *et al.* METABOLÔMICA: DEFINIÇÕES, ESTADO-DA-ARTE E APLICAÇÕES REPRESENTATIVAS. *Química Nova*, v. 41, n. 1, p. 75–91, 1 jan. 2018.
- CHAN, D. P. C. *et al.* Sexually acquired hepatitis C virus infection: A review. *International Journal of Infectious Diseases*. [S.l.]: Elsevier B.V. , 1 ago. 2016

- CHOO, Q. L. *et al.* Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*, v. 244, n. 4902, p. 359–362, 1989.
- COLLINO, S.; MARTIN, F. P. J.; REZZI, S. Clinical metabolomics paves the way towards future healthcare strategies. *British Journal of Clinical Pharmacology*, v. 75, n. 3, p. 619–629, mar. 2013.
- COLLINS, F. S.; VARMUS, H. A new initiative on precision medicine. *New England Journal of Medicine*, v. 372, n. 9, p. 793–795, 26 fev. 2015.
- CONITEC. *Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite C e Coinfecções*. Brasília: [s.n.], 2015.
- CUPERLOVIC-CULF, M. Machine learning methods for analysis of metabolic data and metabolic pathway modeling. *Metabolites*, v. 8, n. 1, 1 mar. 2018.
- DA SILVA, L. DE C. M. *et al.* *Ultrasound elastography in patients with fatty liver disease*. *Radiologia Brasileira*. [S.l.]: Colegio Brasileiro de Radiologia. , 2020
- DHYANI, M.; ANVARI, A.; SAMIR, A. E. Ultrasound elastography: liver. *Abdominal Imaging*, v. 40, n. 4, p. 698–708, 1 abr. 2015.
- DIAS-AUDIBERT, F. L. *et al.* Combining Machine Learning and Metabolomics to Identify Weight Gain Biomarkers. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v. 8, n. 6, p. 6, 24 jan. 2020.
- DUNN, W. B.; ELLIS, D. I. Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, v. 24, n. 4, p. 285–294, 1 abr. 2005.
- EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Research*, v. 8, n. 3, p. 186–194, 1 mar. 1998.
- GERMANI, G. *et al.* Assessment of Fibrosis and Cirrhosis in Liver Biopsies: An Update. *Seminars in Liver Disease*, v. 31, n. 1, p. 82–90, 22 fev. 2011.
- GOLIZEH, M. *et al.* Proteomic fingerprinting in HIV/HCV co-infection reveals serum biomarkers for the diagnosis of fibrosis staging. *PLOS ONE*, v. 13, n. 4, p. e0195148, 2 abr. 2018.
- GOODWIN, C. R. *et al.* Phenotypic mapping of metabolic profiles using self-organizing maps of high-dimensional mass spectrometry data. *Analytical Chemistry*, v. 86, n. 13, p. 6563–6571, 1 jul. 2014.
- GOWDA, H. *et al.* Interactive XCMS online: Simplifying advanced metabolomic data processing and subsequent statistical analyses. *Analytical Chemistry*, v. 86, n. 14, p. 6931–6939, 15 jul. 2014.
- GROSS, J. H. Instrumentation. *Mass Spectrometry*. Cham: Springer International Publishing, 2017. p. 151–292.
- HALLA, M. C. *et al.* Association of hepatitis C virus infection and liver fibrosis severity with the variants alleles of MBL2 gene in a Brazilian population. *Human Immunology*, v. 71, n. 9, p. 883–887, set. 2010.

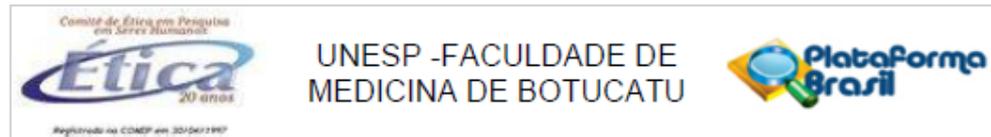
- HALLOUM, W. *et al.* APCI as an innovative ionization mode compared with EI and CI for the analysis of a large range of organophosphate esters using GC-MS/MS. *Journal of Mass Spectrometry*, v. 52, n. 1, p. 54–61, 1 jan. 2017.
- HANUS, J. S. *et al.* Incidence of hepatitis C in Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 48, n. 6, p. 665–673, 1 nov. 2015.
- HORNING, E. C.; HORNING, M. G. Human metabolic profiles obtained by gc and gc/ms. *Journal of Chromatographic Science*, v. 9, n. 3, p. 129–140, 1 mar. 1971.
- IRSHAD, M.; GUPTA, P.; IRSHAD, K. *Immunopathogenesis of Liver Injury during Hepatitis C Virus Infection. Viral Immunology*. [S.l.]: Mary Ann Liebert Inc. , 1 abr. 2019
- JOHNSON, C. H.; IVANISEVIC, J.; SIUZDAK, G. *Metabolomics: Beyond biomarkers and towards mechanisms. Nature Reviews Molecular Cell Biology*. [S.l.]: Nature Publishing Group. , 1 jul. 2016
- KAMEDA, K.; CORRÊA, M. C. D. V.; CASSIER, M. The introduction of nucleic acid tests (NAT) for blood screening in the Brazilian public healthcare system: Technological arrangements for the nationalization of the “Brazilian nat.” *Physis*, v. 28, n. 1, 1 jan. 2018.
- KIM, M. H. *et al.* Usefulness of Anti-HCV ELISA Test and HCV Reverse Transcriptase-PCR for the Diagnosis of Hepatitis C Viral Infection. *The Korean Journal of Laboratory Medicine*, v. 26, n. 6, p. 418, 2006.
- KIM, S. J. *et al.* Understanding metabolomics in biomedical research. *Endocrinology and Metabolism*, v. 31, n. 1, p. 7–16, 2016.
- KNODELL, R. G. *et al.* Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology*, v. 1, n. 5, p. 431–435, 1981.
- LEI, Z.; HUHMANN, D. V.; SUMNER, L. W. Mass spectrometry strategies in metabolomics. *Journal of Biological Chemistry*, v. 286, n. 29, p. 25435–25442, 22 jul. 2011.
- LI, C.; LI, R.; ZHANG, W. Progress in non-invasive detection of liver fibrosis. *Cancer Biology and Medicine*, v. 15, n. 2, p. 124–136, 1 maio 2018.
- LIMA, E. DE O. *et al.* *Metabolomics and Machine learning approaches for more accurate Paracoccidioidomycosis diagnosis*. . [S.l.]: Zenodo. , 27 abr. 2020
- LIU, H. *et al.* Predicting survival within the lung cancer histopathological hierarchy using a multi-scale genomic model of development. *PLoS Medicine*, v. 3, n. 7, p. 1090–1102, 2006.
- M ZOHEIRY, M. *et al.* Serum Markers of Epithelial Mesenchymal Transition as Predictors of HCV-induced Liver Fibrosis, Cirrhosis and Hepatocellular Carcinoma. *Electronic physician*, v. 7, n. 8, p. 1626–1637, 20 dez. 2015.

- MANSBERG, K. *et al.* A population-based surveillance study on the epidemiology of hepatitis C in Estonia. *Medicina (Lithuania)*, v. 54, n. 1, 1 mar. 2018.
- MARGARIT, C. *et al.* Liver transplantation for malignant diseases: Selection and pattern of recurrence. *World Journal of Surgery*, v. 26, n. 2, p. 257–263, fev. 2002.
- MATSUOKA, M. W. *et al.* Contribution of ultrasonography to the diagnosis of chronic hepatitis c histopathological changes, with emphasis on hepatic steatosis - part I. *Radiologia Brasileira*, v. 44, n. 3, p. 141–146, 2011.
- MEONI, G. *et al.* The metabolic fingerprints of HCV and HBV infections studied by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, p. 1–13, 1 dez. 2019.
- MOHSEN, A. H. *et al.* Hepatitis C and HIV-1 coinfection. *Gut*, v. 51, n. 4, p. 601–608, out. 2002.
- MOTOSUGI, U. *et al.* Liver stiffness measured by magnetic resonance elastography as a risk factor for hepatocellular carcinoma: A preliminary case-control study. *European Radiology*, v. 23, n. 1, p. 156–162, jan. 2013.
- NICHOLSON, J. K.; LINDON, J. C.; HOLMES, E. “*Metabonomics*”: *Understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data*. *Xenobiotica*. [S.l.]: Taylor and Francis Ltd. , 1999
- NOMAIR, A. M. *et al.* Profiling of plasma metabolomics in patients with hepatitis C-related liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Clinical and Experimental Hepatology*, v. 5, n. 4, p. 317–326, 2019.
- PEDROSA DE OLIVEIRA, C. *et al.* *Changes in histological criteria lead to different prevalences of nonalcoholic steatohepatitis in severe obesity*. *Annals of Hepatology*. [S.l.: s.n.], 2007.
- PEELING, R. W. *et al.* *The future of viral hepatitis testing: Innovations in testing technologies and approaches*. *BMC Infectious Diseases*. [S.l.]: BioMed Central Ltd. , 1 nov. 2017
- PETRESCU, F. *et al.* Histopathological aspects described in patients with chronic hepatitis C. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*, v. 56, n. 2, p. 439–444, 2015.
- PINU, F. R. *et al.* Systems Biology and Multi-Omics Integration: Viewpoints from the Metabolomics Research Community. *Metabolites*, v. 9, n. 4, p. 76, 18 abr. 2019.
- POYNARD, T.; BEDOSSA, P.; OPOLON, P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. *Lancet*, v. 349, n. 9055, p. 825–832, 22 mar. 1997.
- REDENŠEK, S.; DOLŽAN, V.; KUNEJ, T. *From Genomics to Omics Landscapes of Parkinson’s Disease: Revealing the Molecular Mechanisms*. *OMICS A Journal of Integrative Biology*. [S.l.]: Mary Ann Liebert Inc. , 2018

- RIBEIRO, M. DE F. G. DE S. *Fatores prognósticos na Evolução da Hepatite C*. 2004. 176 f. Universidade de São Paulo, 2004.
- SAAB, S. *et al.* Economic Comparison of Serologic and Molecular Screening Strategies for Hepatitis C Virus. *Gastroenterology & hepatology*, v. 14, n. 8, p. 459–462, 1 ago. 2018.
- SAIKI, R. K. *et al.* Analysis of enzymatically amplified  $\beta$ -globin and HLA-DQ $\alpha$  DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature*, v. 324, n. 6093, p. 163–166, 1986.
- SALGÜERO, S. *et al.* Plasma metabolomic fingerprint of advanced cirrhosis stages among HIV/HCV-coinfected and HCV-monoinfected patients. *Liver International*, v. 40, n. 9, p. 2215–2227, 7 set. 2020.
- SCHLABE, S.; ROCKSTROH, J. K. *Advances in the treatment of HIV/HCV coinfection in adults*. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. [S.l.]: Taylor and Francis Ltd. , 2 jan. 2018
- Secretaria de Vigilância em Saúde | Ministério da Saúde *Boletim Epidemiológico*. . [S.l.: s.n.], 2020.
- SEO, Y. S. *et al.* Risk assessment of hepatocellular carcinoma using transient elastography Vs. liver biopsy in chronic hepatitis b patients receiving antiviral therapy. *Medicine (United States)*, v. 95, n. 12, 2016.
- SHIFFMAN, M. L. *The next wave of hepatitis C virus: The epidemic of intravenous drug use*. *Liver International*. [S.l.]: Blackwell Publishing Ltd. , 1 fev. 2018
- SINGH, S. *et al.* Liver stiffness is associated with risk of decompensation, liver cancer, and death in patients with chronic liver diseases: A systematic review and meta-analysis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, v. 11, n. 12, p. 1573-1584.e2, 2013.
- TANG, A. *et al.* Epidemiology of hepatocellular carcinoma: target population for surveillance and diagnosis. *Abdominal Radiology*, v. 43, n. 1, p. 13–25, 1 jan. 2018.
- TASHKANDY, M. A. A. *et al.* Evaluation of the available anti-HCV antibody detection tests and RT-PCR assay in the diagnosis of hepatitis C virus infection. *Saudi journal of kidney diseases and transplantation : an official publication of the Saudi Center for Organ Transplantation, Saudi Arabia*, v. 18, n. 4, p. 523–531, 2007.
- TSOCHATZIS, E. *et al.* Collagen proportionate area is superior to other histological methods for sub-classifying cirrhosis and determining prognosis. *Journal of Hepatology*, v. 60, n. 5, p. 948–954, 1 maio 2014.
- URIZ, J.; BRIZ, R. Historia natural de la infección por el VHC. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, v. 27, p. 51–58, 2004.
- VENKATADRI, M.; LOKANATHA, C. R. A Review on Data mining from Past to the Future. *International Journal of Computer Applications*, v. 15, n. 7, p. 19–22, 2011.
- WANG, M. X. *et al.* “Piecemeal” necrosis: Renamed troxis necrosis. *Experimental and Molecular Pathology*, v. 71, n. 2, p. 137–146, out. 2001.

- WANG, P. W. *et al.* Proteome-based identification of apolipoprotein A-IV as an early diagnostic biomarker in liver fibrosis. *Oncotarget*, v. 8, n. 51, p. 88951–88964, 2017.
- WEINSTEIN, R. A.; TOHME, R. A.; HOLMBERG, S. D. *Transmission of hepatitis C virus infection through tattooing and piercing: A critical review. Clinical Infectious Diseases*. [S.l.]: Clin Infect Dis. , 15 abr. 2012
- WESTBROOK, R. H.; DUSHEIKO, G. *Natural history of hepatitis C. Journal of Hepatology*. [S.l.]: Elsevier. , 1 nov. 2014
- WHO | Global hepatitis report, 2017. *WHO*, 2018.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Hepatitis C*. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-c>>. Acesso em: 5 out. 2020.
- XIANG, Y. *et al.* The correlation of HCV RNA and HCV core antigen in different genotypes of HCV. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, v. 33, n. 1, 1 jan. 2019.
- YANG, Q. *et al.* Metabolomics biotechnology, applications, and future trends: A systematic review. *RSC Advances*, v. 9, n. 64, p. 37245–37257, 13 nov. 2019.
- YU, K. H. *et al.* Omics AnalySIs System for PRecision Oncology (OASISPRO): A web-based omics analysis tool for clinical phenotype prediction. *Bioinformatics*, v. 34, n. 2, p. 319–320, 15 jan. 2018.
- ZAMIN, I. *et al.* The importance of AST/ALT rate in nonalcoholic steatohepatitis diagnosis. *Arquivos de Gastroenterologia*, v. 39, n. 1, p. 22–26, 2002.
- ZHANG, A. *et al.* Modern analytical techniques in metabolomics analysis. *Analyst*, v. 137, n. 2, p. 293–300, 21 jan. 2012.
- ZHANG, J. *et al.* Nondestructive tissue analysis for ex vivo and in vivo cancer diagnosis using a handheld mass spectrometry system. *Science Translational Medicine*, v. 9, n. 406, 6 set. 2017.
- ZHANG, T. *et al.* Current Trends and Innovations in Bioanalytical Techniques of Metabolomics. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, v. 46, n. 4, p. 342–351, 3 jul. 2016.
- ZHAO, Y. Y.; LIN, R. C. *UPLC-MSE application in disease biomarker discovery: The discoveries in proteomics to metabolomics. Chemico-Biological Interactions*. [S.l.]: Elsevier Ireland Ltd. , 25 maio 2014

## 9. ANEXO I



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** IDENTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES PREDITIVOS DO RISCO PARA CARCINOMA HEPATOCELULAR NA HEPATITE C AVANÇADA

**Pesquisador:** Adriana Camargo Ferrasi

**Área Temática:** Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

**Versão:** 2

**CAAE:** 16713919.5.0000.5411

**Instituição Proponente:** Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 3.666.609

**Apresentação do Projeto:**

O projeto "IDENTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES PREDITIVOS DO RISCO PARA CARCINOMA HEPATOCELULAR NA HEPATITE C AVANÇADA" tem relevância clínica alta e clareza metodológica. A casuística a ser analisada será composta por 50 amostras de tecido hepático e soro já coletadas por ocasião do projeto "RNAs longos não codificadores (lncRNA) na infecção pelo vírus da Hepatite C" aprovado pelo parecer 712.392 de 07/07/2014. Tais amostras são remanescentes do projeto supracitado e foram doadores voluntários pacientes atendidos pelo Ambulatório de Hepatites da Disciplina de Gastroenterologia Clínica do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Botucatu-FMB-UNESP.

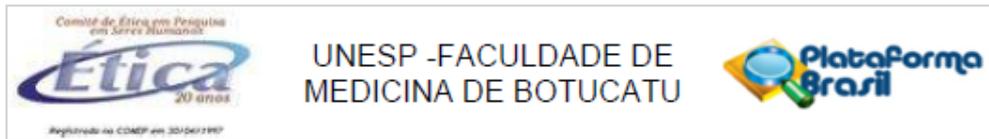
**Objetivo da Pesquisa:**

Tem como objetivo avaliar o perfil metabólico e transcriptômico de pacientes com hepatite C avançada e buscar associações com o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular, a fim de identificar potenciais biomarcadores para o diagnóstico ou prognóstico da doença.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Os riscos serão mínimos uma vez que o material já fora previamente coletado para outros estudos. Os benefícios serão o de melhor entendimento da genética dos hepatocarcinomas.

Endereço: Chácara Butignolli, s/n  
 Bairro: Rubião Junior CEP: 18.618-970  
 UF: SP Município: BOTUCATU  
 Telefone: (14)3880-1609 E-mail: cep@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 3.666.609

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Pesquisa de alto impacto no campo da genética e carcinomas hepáticos. Clareza de método, exequível e factível.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Todos os termos obrigatórios estão corretamente postados, com exceção do TCLE, porém foi justificada a dispensa deste termo nessa pesquisa por motivo de que os participantes não estão mais em acompanhamento no serviço. Todos os esclarecimentos foram prestados em relação aos questionamentos prévios deste comitê de pesquisa.

**Recomendações:**

-

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Após análise em reunião extraordinária, o colegiado deliberou APROVADO.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Conforme deliberação do colegiado, em reunião extraordinária do CEP-FMB, realizada em 22/10/2019, o projeto de pesquisa encontra-se APROVADO.

Apresentar relatório final de atividades após conclusão da pesquisa.

Att.

CEP-FMB

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

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1366523.pdf	09/09/2019 10:05:49		Aceito
Outros	Carta_Resposta_Pendencias.pdf	09/09/2019 10:03:48	Adriana Camargo Ferrasi	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_ALTERADO.pdf	09/09/2019 10:02:22	Adriana Camargo Ferrasi	Aceito
Outros	AnuenciaHcfmb.pdf	03/07/2019 10:12:54	Adriana Camargo Ferrasi	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico /	biorrepositorio_2019.pdf	11/06/2019 09:07:54	Adriana Camargo Ferrasi	Aceito

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

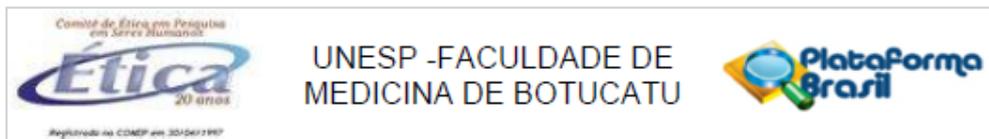
CEP: 18.618-970

UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1809

E-mail: cep@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 3.666.609

Biorepositório / Biobanco	biorepositorio_2019.pdf	11/06/2019 09:07:54	Adriana Camargo Ferrasi	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	TermoDeAnuencialInstitucional.pdf	11/06/2019 09:06:39	Adriana Camargo Ferrasi	Aceito
Folha de Rosto	FolhaDeRostoAssinad.pdf	11/06/2019 09:06:07	Adriana Camargo Ferrasi	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

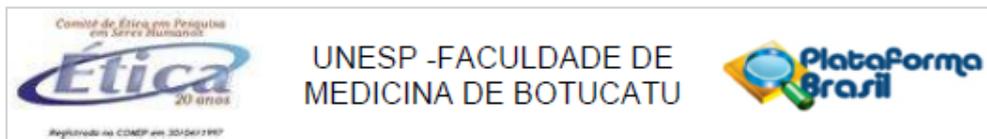
Não

BOTUCATU, 28 de Outubro de 2019

---

Assinado por:  
SILVANA ANDREA MOLINA LIMA  
(Coordenador(a))

Endereço: Chácara Butignolli, s/n  
Bairro: Rubião Junior CEP: 18.618-970  
UF: SP Município: BOTUCATU  
Telefone: (14)3880-1809 E-mail: cep@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 3.666.609

Biorepositório / Biobanco	biorrepositorio_2019.pdf	11/06/2019 09:07:54	Adriana Camargo Ferrasi	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	TermoDeAnuencialInstitucional.pdf	11/06/2019 09:06:39	Adriana Camargo Ferrasi	Aceito
Folha de Rosto	FolhaDeRostoAssinad.pdf	11/06/2019 09:06:07	Adriana Camargo Ferrasi	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

BOTUCATU, 28 de Outubro de 2019

---

Assinado por:  
SILVANA ANDREA MOLINA LIMA  
(Coordenador(a))

Endereço: Chácara Butignolli, s/n  
Bairro: Rubião Junior CEP: 18.618-970  
UF: SP Município: BOTUCATU  
Telefone: (14)3880-1809 E-mail: cep@fmb.unesp.br