

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- UNESP

Instituto de Biociências de Botucatu-IBB

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

**Teste respiratório com isótopos estáveis do carbono para avaliação da
função hepática nas fases da cirrose causada pela hepatite viral C**

Geraldo Gabriel Perez

Botucatu-SP

Fevereiro, 2017

Teste respiratório com isótopos estáveis do carbono para avaliação da função hepática nas fases da cirrose causada pela hepatite viral C

Geraldo Gabriel Perez

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Instituto de Biociências de Botucatu da Universidade Estadual Paulista – IBB UNESP, como requisito da obtenção do título de mestre.

Orientador

Prof. Dr. Vladimir Eliodoro Costa

Centro de Isótopos Estáveis – IBB/UNESP

Botucatu-SP

Fevereiro, 2017

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Vladimir Eliodoro Costa
Centro de Isótopos Estáveis – IBB – UNESP
Membro Titular

Prof. Dr. Rodrigo Strehl Machado
Departamento de Pediatria – UNIFESP
Membro Titular

Prof. Dr. Joel Mesa Hormaza
Departamento de Física e Biofísica – IBB – UNESP
Membro Titular

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

Perez, Geraldo Gabriel.

Teste respiratório com isótopos estáveis do carbono para avaliação da função hepática nas fases da cirrose causada pela hepatite viral C / Geraldo Gabriel Perez. - Botucatu, 2017

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Vladimir Eliodoro Costa

Capes: 90000005

1. Fígado - Cirrose. 2. Isótopos estáveis. 3. Hepatite por vírus. 4. Espectrometria de massa. 5. Respiração - Testes. 6. Hepatite C. 7. Carbono 13.

Palavras-chave: Aminopirina; Carbono-13; Disfunção hepática; Espectrometria de massa.

*Dedico esse trabalho aos meus pais, Geraldo Antônio
Perez Lara e Maria Juraci Carloni Perez, que me
ensinaram a nunca desistir dos meus sonhos, por mais
impossíveis que possam ser.*

“Construímos muros demais e pontes de menos”

Isaac Newton

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que me deu forças para não desistir. Ao meu orientador, Prof. Dr. Vladimir Eliodoro Costa, por compartilhar sua sabedoria, por sua paciência e sua grande amizade. Em memória ao Prof. Carlos Ducatti, pelo incentivo e por compartilhar seu vasto conhecimento. Aos meus pais, e familiares pelo apoio emocional. A minha namorada Lígia Mayumi Abe, pela paciência e compreensão nos momentos de estresse. Aos meus amigos da república RT, os quais considero irmãos, pelos 6 melhores anos da minha vida, em especial ao Kayque Fracarolli de Camargo que me ajudou nessa pesquisa. Ao Centro de Isótopos Estáveis Ambientais em Ciências da Vida (CIE) e a todos os funcionários e estudantes que o compõem, em especial a Beatriz de Oliveira Garcia, a Raphaella Navarro, e ao Evandro Tadeu da Silva, pela grande amizade e por me ajudarem nesse trabalho. Ao Prof. Dr. Giovanni Faria Silva e seu grupo de enfermeiras, os quais foram peças fundamentais para realização desse trabalho, sendo que sem eles essa pesquisa não seria possível. Um agradecimento especial a todos os pacientes voluntários e aos funcionários da diretoria do IBB, que colaboraram com esse estudo em vista ao avanço da ciência. A Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), ao Instituto de Biociências de Botucatu (IBB), e ao hospital das clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (HC-FMB) pela infraestrutura fundamental ao presente estudo. A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento do projeto. A todos serei eternamente grato.

Resumo:

Atualmente cerca de 3% da população mundial está infectado pelo vírus da hepatite C (VHC), onde sua maior consequência é a cirrose hepática. Para o diagnóstico da cirrose hepática utiliza-se a biopsia hepática percutânea, um método invasivo de grande complexidade considerado padrão ouro. Para avaliação do estágio da cirrose utiliza-se a classificação Child-Pugh. Um outro exame experimental para classificação funcional hepática é o *¹³C-Aminopyrine Breath Test* (¹³C-ABT), o qual é não invasivo. Os protocolos atuais de ¹³C-ABT utilizam duas horas de coleta de sopro, e não diferem o gênero dos pacientes. O objetivo do estudo foi otimizar os protocolos de aplicação do ¹³C-ABT para avaliação dos estágios da cirrose hepática causada pelo VHC, verificando diferença entre gênero. Foram estudados os *turnovers* ¹³C nos dos sopros dos 68 pacientes durante o ¹³C-ABT, divididos em 8 grupos conforme o comprometimento da função hepática e gênero. Os resultados mostraram que o ¹³C-ABT pode ser aplicado com apenas uma coleta do sopro em uma hora e que existe diferença entre os gêneros.

Palavras chaves: *Aminopirina, Carbono-13, Disfunção Hepática, Espectrometria de Massa, Razão Isotópica*

Sumário

1. Introdução	13
2. Revisão da Literatura	15
2.1 Hepatite viral C	15
2.2 Isótopos Estáveis do carbono e suas aplicações	16
3. Materiais e Métodos	22
3.1 Delineamento experimental	22
3.2 Aspectos Éticos	22
3.3 Pacientes	22
3.4 Aplicação do ^{13}C -ABT	23
3.5 Análise Isotópica das amostras de sopro	24
3.5 Cálculo do DOB, PDR, CDOB e CPDR	25
3.6 Análise Estatística	26
4. Resultados	27
5. Discussão	36
6. Conclusões	40
7. Referências Bibliográficas	41

Índice de tabelas

Tabela 1. Parâmetros e suas determinadas pontuações para a classificação Child-Pugh.	16
Tabela 2. Características físicas dos diferentes grupos de pacientes submetidos ao teste respiratório com ^{13}C -aminopirina para avaliação da função hepática e suas respectivas doses de ^{13}C -aminopirina.	27
Tabela 3. Valores médios com erro padrão do sopro coletado em uma hora após ingestão da ^{13}C -aminopirina no teste respiratório com para avaliação da função hepática em diferentes grupos de pacientes.	35

Índice de figuras

Figura 1. Esquema do processo de metabolização da ^{13}C -aminopirina durante o teste respiratório para avaliação da função hepática.	19
Figura 2. Procedimento de aplicação e coleta do sopro no teste respiratório com ^{13}C -aminopirina para avaliação da função hepática.	24
Figura 3. Turnover do ^{13}C pelo DOB do sopro de pacientes submetidos ao teste respiratório com ^{13}C -aminopirina para avaliação da função hepática em diferentes grupos. Grupos: C – controle; H – hepatite C sem cirrose; A e B pacientes com cirrose causada por HVC com classificação Child-Pugh A e B respectivamente, M representa o gênero masculino e F feminino. (A) Grupos do gênero masculino (n): CM (10); HM (10); AM (8); BM (5). (B) Grupos do gênero feminino (n): CF (10); HF (10); AF (10); BF (5). As barras verticais indicam o erro padrão. As letras minúsculas (a, b, c, d, e, f) indicam a análise estatística; letras iguais não houve diferença significativa e letras diferentes houve diferença estatística. Foi utilizado o método Tukey com 95% de confiança. DOB indica a diferença entre o enriquecimento relativo isotópico do sopro basal pelo sopro.	28
Figura 4. Acumulado do DOB ao longo do tempo em pacientes submetidos ao teste respiratório com ^{13}C -aminopirina para avaliação da função hepática em diferentes grupos. Grupos: C – controle; H – hepatite C sem cirrose; A e B pacientes com cirrose causada por HVC com classificação Child-Pugh A e B respectivamente, M representa o gênero masculino e F feminino. (A) Grupos do gênero masculino (n): CM (10); HM (10); AM (8); BM (5). (B) Grupos do gênero feminino (n): CF (10); HF (10); AF (10); BF (5). As barras verticais indicam o erro padrão. CDOB indica o acumulado da diferença entre o enriquecimento relativo isotópico do sopro basal pelo sopro.	30
Figura 5. Turnover do ^{13}C pelo PDR do sopro de pacientes submetidos ao teste respiratório com ^{13}C -aminopirina para avaliação da função hepática em diferentes grupos. Grupos: C – controle; H – hepatite C sem cirrose; A e B pacientes com cirrose causada por HVC com classificação Child-Pugh A e B respectivamente, M representa o gênero masculino e F feminino. (A) Grupos do gênero masculino (n): CM (10); HM (10); AM (8); BM (5). (B) Grupos do gênero feminino (n): CF (10); HF (10); AF (10); BF (5). As barras verticais indicam o erro padrão. As letras minúsculas (a, b, c, d) indicam a análise estatística; letras iguais não houve diferença significativa e letras diferentes houve diferença estatística. Foi utilizado o método Tukey com 95% de confiança. PDR indica o percentual de recuperação de dose.	31

Figura 6. Acumulado do PDR ao longo do tempo e seu respectivo erro padrão para cada grupo e gênero de pacientes submetidos ao teste respiratório com ^{13}C -aminopirina para avaliação da função hepática em diferentes grupos. Grupos: C – controle; H – hepatite C sem cirrose; A e B pacientes com cirrose causada por HVC com classificação Child-Pugh A e B respectivamente, M representa o gênero masculino e F feminino. (A) Grupos do gênero masculino (n): CM (10); HM (10); AM (8); BM (5). (B) Grupos do gênero feminino (n): CF (10); HF (10); AF (10); BF (5). As barras verticais indicam o erro padrão. CPDR indica o acumulado do percentual de recuperação de dose. 32

Figura 7. Dispersão dos pontos de DOB em uma hora após a ingestão de ^{13}C -aminopirina em relação a dose administrada. (A) grupo controle, (B) pacientes com HVC sem cirrose, e (C) e (D) pacientes portadores de cirrose infectados com HVC classificados em Child-Pugh A e B respectivamente. Círculos preenchidos representam o gênero masculino, e círculos vazios representam o gênero feminino. Retas contínuas representam as regressões lineares para os pontos do gênero masculino, e retas pontilhadas para o gênero feminino. 33

Figura 8. Dispersão dos pontos de PDR em uma hora após a ingestão de ^{13}C -aminopirina em relação a dose administrada. (A) grupo controle, (B) pacientes com HVC sem cirrose, e (C) e (D) pacientes portadores de cirrose infectados com HVC classificados em Child-Pugh A e B respectivamente. Círculos preenchidos representam o gênero masculino, e círculos vazios representam o gênero feminino. Retas contínuas representam as regressões lineares para os pontos do gênero masculino, e retas pontilhadas para o gênero feminino. 34

Lista de abreviaturas e símbolos:

^{13}C -ABT	^{13}C -Aminopyrine Breath Test - Teste respiratório com ^{13}C -aminopirina.
^{13}C -LFBT	^{13}C -Liver Function Breath Test - Teste respiratório com ^{13}C para avaliação da função hepática.
^{13}C -OBT	^{13}C -Octanoic acid Breath Test - Teste respiratório com ácido octanóico marcada com ^{13}C .
^{13}C -UBT	^{13}C -Urea Breath Test - Teste respiratório com ^{13}C -ureia.
ABCA-IRMS	Automated Breath CO_2 Analyser - Isotope Ratio Mass Spectrometry -Espectrometria de massa de razão isotópica com analisador automático para análise de sopro de carbono.
BSA	Body Surface Area - Área superficial corpórea.
CDOB	Cumulative Delta Over Baseline-value – Acumulado da variação do enriquecimento isotópico basal com o da amostra ao longo do tempo.
CH	Cirrose Hepática.
CHC	Carcinoma Hepatocelular.
CPDR	Cumulative Percentage Dose Recovery – Percentual de dose cumulativa.
DOB	Delta Over Baseline-value – variação do enriquecimento isotópico basal com o da amostra.
E	Enriquecimento isotópico de ^{13}C .
H	Altura do paciente.
HIV	Human Immunodeficiency Virus - Vírus da Imunodeficiência Humana.
HVB	Hepatite Viral B.
HVC	Hepatite Viral C.
k	Taxa de turnover.
m	Massa de substrato marcado com ^{13}C administrada.
MW	Massa molecular do substrato marcado com ^{13}C .
PDR	Percentage Dose Recovery – percentual de recuperação de dose.
R_{PDB}	Razão isotópica do padrão internacional de carbono.
$t_{1/2}$	Tempo de meia vida.
VHC	Vírus da Hepatite C.
V	Produção de CO_2 .
W	Massa corpórea do paciente.
$\delta(t)$	Enriquecimento isotópico relativo.

1. Introdução

Atualmente 185 milhões de pessoas, cerca de 3% da população mundial, está contaminada pelo vírus da hepatite C (VHC) na sua forma crônica. A hepatite C crônica possui distribuição pandêmica, tendo prevalência associada de acordo com a região geográfica. No Brasil, estima-se que existam 1,4 a 1,7 milhões de portadores do vírus C. A hepatite Viral C (HVC) possui duas formas de manifestação, a aguda e a crônica, sendo que a maioria dos casos o diagnóstico irá ocorrer na fase crônica. A morbidade e mortalidade associadas à doença estão relacionadas com a evolução para a cronicidade. (BURATTINI, 2014; FRANK et al., 2000; MESSINA et al., 2015).

A evolução da hepatite Viral C é discreta, progressiva e assintomática, na maior parte dos casos. A evolução para cirrose hepática (CH) é a maior consequência da infecção crônica pela hepatite C. Em média 20% dos infectados podem evoluir para a cirrose em 20 anos de infecção e, adquirida a cirrose, de 1 a 5% dos infectados poderão desenvolver carcinoma hepatocelular (CHC), ao ano (CHEN e MORGAN, 2006; SERFATY et al., 2001).

O único exame para o diagnóstico da cirrose hepática é a Biopsia Hepática Percutânea, um método invasivo, e somente realizado em regime hospitalar, gerando dor e desconforto ao paciente e complicações graves (risco inerente). A classificação funcional para doenças hepáticas crônicas e cirrose é realizado pela classificação de Child-Pugh. Um outro método para avaliação da função hepática é o ^{13}C -Liver Function Breath Test (^{13}C -LFBT) (FORMAN; LUCEY, 2001; AFOLABI et al., 2013).

O ^{13}C -LFBT pode ser avaliado em três diferentes regiões do hepatócito, sendo elas as regiões microssomal, mitocondrial e citosólica. Cada região utiliza um substrato específico marcado com ^{13}C para o ^{13}C -LFBT, podendo ter mais de um substrato para cada região do hepatócito. A região microssomal é a mais estudada, por avaliar a função hepatocelular em fibroses e cirroses; e o prognóstico de hepatite alcoólica e hepatite crônica. O teste de função

mitocondrial é utilizado para detecção de substâncias tóxicas em pacientes com hepatite B e em pacientes alcoólatras. A região citosólica é estudada para avaliar pacientes em estágios iniciais e finais de doenças hepáticas, sendo assim um teste com pouca sensibilidade (ARMUZZI et al., 2002; BECKER, 1998).

Um dos substratos mais utilizados para a região microssomal é a aminopirina, ^{13}C -*Aminopyrine Breath Test* (^{13}C -ABT), que correlaciona a disfunção histológica da região microssomal do fígado com o sopro exalado do paciente, permitindo a avaliação quantitativa da massa hepática funcional, como por exemplo, a presença ou não de cirrose hepática. A vantagem do ^{13}C -ABT é que este teste não possui influência no fluxo sanguíneo hepático, não apresenta diferença em fumantes e não fumantes, e pode ser utilizado para diagnóstico de hepatite alcoólica e hepatite crônica, o que o diferencia dos outros ^{13}C -LFBT (AFOLABI et al., 2013; PIJLS et al., 2014).

Alguns trabalhos com aminopirina marcada com ^{13}C para função hepática já foram realizados e os protocolos iniciais para aplicação do ^{13}C -ABT são: jejum de 12 horas; 2 mg do fármaco por massa corpórea; coleta de sopro até 120 minutos; e não possuir insuficiência renal (GIANNINI; SAVARINO, 2013; GIANNINI et al., 2002). Entretanto o resultado do ^{13}C -ABT corresponde a uma curva com 5 pontos coletados de 30 em 30 minutos até duas horas, onde a amplitude demonstra o quão eficaz é a metabolização hepática ao longo do tempo. Estes poucos pontos diminuem a sensibilidade do teste devido ao fato deste estar perdendo algum sinal importante e não saber o tempo ideal para a finalização do teste, ou seja, dificulta o estudo do comportamento da curva. Outro fator que compromete a eficácia do teste é a não diferenciação do teste em relação ao gênero.

Sabendo das limitações do protocolo de aplicação, o estudo em questão tem o objetivo de otimizar, temporalmente, os protocolos de aplicação do ^{13}C -ABT para avaliação dos estágios da cirrose hepática causada pelo VHC.

2. Revisão da Literatura

2.1 Hepatite viral C

O contágio com o VHC está principalmente relacionado a indivíduos que realizaram transfusão sanguínea, antes da década de 90, e usuários de drogas injetáveis. Outros meios de contágio com o vírus são: materno-fetal, relações sexuais sem proteção, e parenteral (tatuagens, acupuntura, e instrumentos de manicure contaminados pelo vírus) (ALTER et al., 1999; OHTO et al., 1994; THOMAS et al., 1998; WYLD et al., 1997).

A hepatite Viral C (HVC) possui as formas de manifestação aguda e crônica, sendo que na maioria dos casos o diagnóstico irá ocorrer na fase crônica. A morbidade e mortalidade associadas à doença estão relacionadas com a evolução para a cronicidade. A evolução da forma aguda para a crônica pode ser demonstrada pelo aumento das aminotransferases e permanência do vírus no sangue por períodos maiores que 6 meses (SEEFF, 1997).

A classificação Metavir, exclusiva de pacientes infectados com HVC, determina o grau de fibrose conforme a evolução da mesma, sendo elas F0 (ausente), F1 (fibrose portal sem septos), F2 (fibrose portal com raros septos), F3 (numerosos septos sem cirrose) e F4 (cirrose). Essa classificação também avalia a atividade necroinflamatória do fígado, sendo elas A0 (ausente), A1 (atividade leve), A2 (atividade moderada) e A3 (atividade intensa) (Bedossa e Poynard, 1996).

A classificação funcional da cirrose é realizada através da classificação Child-Pugh. Esta classificação está baseada em cinco parâmetros, sendo eles: encefalopatia, ascite, bilirrubina sérica, albumina sérica, e tempo de protrombina (TP) normalizado através do INR (razão normalizada internacional). Os parâmetros e suas determinadas pontuações podem ser observados na *tabela 1* (FORMAN; LUCEY, 2001).

Tabela 1: Parâmetros e suas determinadas pontuações para a classificação Child-Pugh.

Parâmetros	1 ponto	2 pontos	3 Pontos
Encefalopatia	Ausente	Grau I, II	Grau III
Ascite	Ausente	Facilmente controlada	Refratária
Bilirrubina sérica (mg/dl)	<2	2 a 3	>3
Albumina sérica (g/dl)	>3.5	3.5 a 2.8	<2.8
TP(s)/INR	1 a 3 / <1,7	4 a 6 / 1,7 a 2,3	>6 / >2,3

Cada parâmetro é quantificado dependendo do estágio em que se encontra, e a soma da pontuação dos parâmetros gera a classificação Child-Pugh, possuindo três diferentes estágios, sendo eles: A (de 5 a 6 pontos), em estágio inicial; B (de 7 a 9 pontos) em estágio intermediário; C (10 a 15 pontos) em estágio grave. Também é utilizada para detectar a necessidade de transplante hepático (ANGERMAIR et al., 2003; CHRISTENSEN, 1997; GIANNINI et al., 2002).

Outra classificação é o score de MELD (modelo para doença hepática terminal), o qual mostrou-se um excelente sistema para determinar se o paciente é susceptível ao transplante, e também prevê a mortalidade após o transplante de fígado (MERION, 2004; REUBEN, 2002).

2.2 Isótopos Estáveis do carbono e suas aplicações

Isótopo é um termo grego onde ISO significa mesmo e TOPOS lugar, representando elementos químicos que ocupam a mesma posição na tabela periódica. Estes são átomos do mesmo elemento químico que possuem o mesmo número de prótons e elétrons, mas diferente número de massa atômica, ou seja, possuem número diferentes de nêutrons. Como possuem carga elétrica iguais, mesmo número de elétrons, os isótopos possuem mesmas propriedades químicas, entretanto o mesmo não ocorre com as propriedades físicas. O fato do elemento químico ser estável corresponde ao não decaimento do mesmo, ou seja, o elemento em questão

não perde massa, nem emite radiação ionizante. (EISBERG; RESNICK, 1979; DUCATTI 2007; DUCATTI et al., 2011).

A análise de isótopos estáveis é uma ferramenta utilizada desde as grandes áreas exatas, como geoquímica e geofísica, até as áreas biológicas para determinação do nível trófico de teias e cadeias alimentares, mapeamento geográficos de alimentos e drogas, adulteração de alimentos e bebidas, e nas áreas médicas e nutricionais com o diagnóstico de doenças com a utilização de isótopos enriquecidos no ^{13}C (BOECKLEN et al., 2011; MODAK, 2007)

Nos últimos 25 anos o uso da razão isotópica tornou-se uma ferramenta essencial para estudos de ecologia, onde as informações ecológicas estão situadas nos tecidos animais, e com a utilização dos isótopos é possível determinar a dieta do animal a partir das concentrações de nitrogênio e carbono. A análise é realizada a partir da razão isotópica do isótopo estável menos abundante pelo mais abundante. A modo de exemplo, o carbono possui apenas 2 isótopos estáveis o ^{12}C , mais abundante, ^{13}C menos abundante (O'BRIEN, 2015).

Para diagnóstico clínico são utilizados isótopos enriquecidos, com o intuito de alterar, no metabolismo humano, as concentrações do mesmo, fazendo com que o isótopo menos abundante torne o mais abundante. Com isso a razão isotópica será maior podendo assim correlacionar-se a uma doença ou alteração no metabolismo. Para a avaliação específica de um órgão é necessário que o fármaco, marcado com isótopo estável, seja metabolizado pelo órgão, onde o fármaco liberará o isótopo marcado no organismo, para depois ser coletado através da urina, sangue ou o próprio sopro do paciente. Uma das aplicações de isótopos estáveis do carbono são os testes respiratórios (BRADEN, 2007; MODAK, 2007).

Os testes respiratórios com ^{13}C em humanos consistem em avaliar a razão isotópica do carbono no sopro da respiração ($^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$) do paciente antes e após a ingestão de um substrato marcado com ^{13}C . Este substrato marcado com ^{13}C é metabolizado no organismo e o ^{13}C é absorvido em formas orgânicas e expelido em forma de $^{13}\text{CO}_2$. Alguns testes respiratórios

são qualitativos e verificam apenas se o substrato foi metabolizado, estes são chamados de estáticos. Outros testes são quantitativos e verificam quanto de substrato foi metabolizado em um intervalo de tempo, estes são chamados de dinâmicos. O teste dinâmico coleta uma amostra antes (basal) e várias amostras após ingestão do substrato marcado, em intervalos de tempos iguais, a fim de obter uma curva, ou *turnover*, da razão isotópica do sopro em relação ao basal, dando como resultado o comportamento desta curva (PIZZOFERRATO et al., 2013).

Nas últimas décadas, diversos diagnósticos com os testes respiratórios foram propostos e continuam em estudos para várias patologias gastrointestinais, dentre os de maior importância clínica temos: “¹³C-Urea Breath Test” (¹³C-UBT) utilizado para detecção da infecção pelo *Helicobacter pylori* no estômago do paciente; o “¹³C-Octanoic acid Breath Test” (¹³C-OBT) utilizado para a avaliação do tempo de esvaziamento gástrico; e o “¹³C-Liver Function Breath Test” (¹³C-LFBT) que é utilizado para avaliação das funções hepáticas e outros.

O teste mais utilizado para avaliação da função hepática é o ¹³C-Aminopyrine Breath Test. A aminopirina consiste em uma pirazolona com propriedades analgésicas, anti-inflamatórias e antipiréticas. A metabolização da ¹³C-aminopirina ocorre no fígado através de duas reações metabólicas de N-desmetilação, catalisadas pelas enzimas do citocromo P450. A primeira reação metabólica que ocorre é a N-desmetilação da aminopirina em metil-aminoantipirina e formaldeído, posteriormente a metil-aminoantipirina sofrerá outra N-desmetilação formando aminoantipirina e formaldeído. Os formaldeídos gerados por essa N-desmetilação são oxidados em ácido fórmico e bicarbonato, no qual o bicarbonato pode ser armazenado no organismo, ou eliminado na forma de dióxido de carbono através da expiração. Dessa forma, a saída de CO₂ marcado com ¹³C representa a atividade enzimática do citocromo P450 na função hepática microssomal, conforme a figura 1 (AFOLABI et al., 2013; PIJLS et al., 2014).

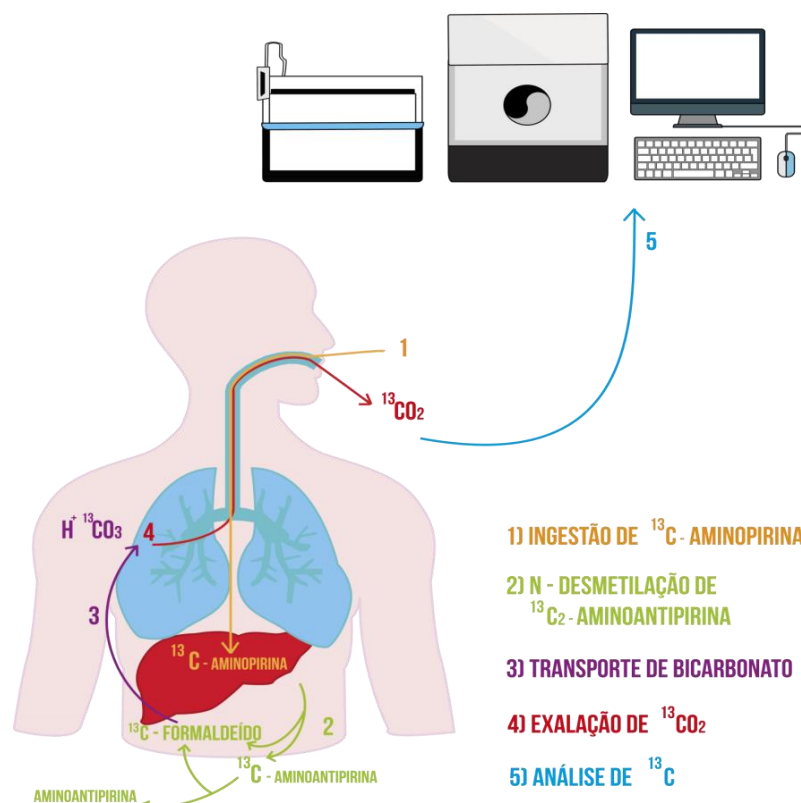


Figura 1. Esquema do processo de metabolização da ^{13}C -aminopirina durante o teste respiratório para avaliação da função hepática.

No Brasil, os testes respiratórios com isótopos estáveis ainda são realizados em universidades, na sua maioria, a fim de pesquisa. Os testes mais utilizados são: detecção de *Helicobacter pylori* com ureia marcada (^{13}C -UBT), e esvaziamento gástrico através do ácido octanóico (^{13}C -OBT). Recentemente, a demanda de ^{13}C -UBT, levou pesquisadores brasileiros a produzir ^{13}C -ureia com o intuito de diminuir o custo de importação do ^{13}C -UBT, possibilitando o avanço de pesquisas na área para o acesso a rotina clínica (COELHO et al., 2013; KAWAKAMI et al., 2002; MACHADO et al., 2010; SANTANA FILHO et al., 2013).

Para normalizar e comparar os valores da razão isotópica no teste, os resultados são apresentados pela variação sobre valor inicial “*delta over baseline-value*”- DOB que é aceito universalmente para estes testes e é expresso pela subtração do $\delta^{13}\text{C}_{\text{amostra}}$ (enriquecimento relativo da amostra em ‰) pelo $\delta^{13}\text{C}_{\text{basal}}$ (enriquecimento relativo do valor basal antes do paciente ingerir o substrato, em ‰) (BRADEN et al., 2007).

O resultado do teste respiratório é fornecido por meio do percentual de recuperação de dose (PDR) e pelo percentual de dose cumulativa (CPDR), que consiste em corrigir o teste para cada paciente, levando em consideração o peso, a altura e a produção de CO₂. O PDR descreve a taxa de substrato marcado com ¹³C exalado em forma de ¹³CO₂, já o CPDR representa a quantidade total de substrato marcado metabolizado em determinado tempo. (SOM et al., 2014; WU et al., 2010).

Turnover isotópico é definido como a troca de isótopos, entre duas fontes, ao longo do tempo até que eles entrem em equilíbrio isotópico. Criss (1999) utilizando cinética química demonstrou a equação de *turnover* para duas fases com fonte de alimentação nas condições de reservatório infinito, como demonstrado na equação 1 (CRISS, 1999; DUCATTI, 2007).

$$\delta(t) = \delta_f + (\delta_i - \delta_f) \cdot e^{-kt} \quad (1)$$

Onde $\delta(t)$ referem-se ao enriquecimento isotópico relativo em qualquer tempo, δ_i no tempo inicial e δ_f no equilíbrio, os quais são adimensionais. A taxa de *turnover* k é dada em tempo⁻¹, e o tempo de troca t em unidades de tempo.

Na equação de *turnover* são empregadas duas fases, uma no início, onde não há troca isotópica, e a outra no equilíbrio isotópico, permitindo assim um novo parâmetro de ordem prática, como observado na equação 2 e 3 (DUCATTI et al., 2015).

$$f \cdot \delta_i + F \cdot \delta_f = \delta \cdot P \quad (2)$$

$$f + F = 1 \quad (3)$$

Onde, f e F referem-se ao peso das fases e P refere-se ao produto gerado. Correlacionando este novo parâmetro com a equação demonstrada por Criss é obtida a equação 3 (DUCATTI et al., 2015).

$$(1 - F) = e^{-kt} \quad (4)$$

Aplicando logaritmo neperiano na equação 4 obtém-se a equação 5, que determina o tempo decorrido (t), para qualquer valor de F , dada a constante de *turnover* k . Para 50% de átomos trocados encontra-se o tempo de meia-vida da cinética de troca de carbono ($t_{1/2}$) (DUCATTI et al., 2015).

$$t = \left(\frac{1}{k} \right) \cdot \ln(1 - F) \quad (5)$$

Por meio dessas equações observou-se que a constante de *turnover* k é um parâmetro da “cinética” de troca isotópica de diferentes sistemas, onde recebe influência do meio, como por exemplo, o metabolismo em tecidos animais e vegetais. Atualmente, essa constante é utilizada em algumas áreas da ciência, como a geofísica, geoquímica e zootecnia, entretanto ainda não é utilizada na medicina (CRISS, 1999; DUCATTI et al., 2015).

3. Materiais e Métodos

3.1 Delineamento experimental

Para alcançar os objetivos deste trabalho foram selecionados 68 pacientes divididos em 8 grupos sendo: 10 controles masculino (CM); 10 controles feminino (CF); 10 com HVC sem cirrose masculino (HM); 10 com HVC sem cirrose feminino (HF); 8 com HVC e CH Child-Pugh A masculino (AM); 8 com HVC e CH Child-Pugh A feminino (AF); 5 com HVC e CH Child-Pugh B masculino (BM); e 5 com HVC e CH Child-Pugh B feminino (BF). Os pacientes foram submetidos ao ^{13}C -ABT com coleta de sopro até 2 h após ingestão da ^{13}C -aminopirina. Com os resultados, obteve-se os *turnovers* do ^{13}C pelo DOB e PDR para cada grupo de paciente e também seus acumulados, CDOB e CPDR.

3.2 Aspectos Éticos

Todo o procedimento utilizando substrato marcado com isótopos estáveis e administrado pelos pacientes e voluntários no projeto foi realizado de acordo com os princípios éticos na experimentação humana estabelecida pelo Comitê de Ética em Pesquisa local da Faculdade de Medicina de Botucatu, o qual foi aprovado e recebe o seguinte número do parecer 1.068.249.

3.3 Pacientes

Os 48 pacientes, não controle, foram selecionados no Ambulatório de Hepatites Virais de Botucatu, do Hospital das Clínicas de Botucatu. Os critérios de seleção foram: ser voluntário e concordar em participar; possuir entre 45 e 65 anos de idade; estar em jejum mínimo de 12 horas; RNA do VHC detectável; não possuir coinfeção por HIV e/ou HVB; não estar realizando tratamento com antiviral; não estar diagnosticado com carcinoma hepático; não estar diagnosticado com insuficiência renal crônica.

O grupo controle foi composto por 20 voluntários, sendo 10 homens e 10 mulheres, e os critérios de seleção foram os mesmo dos demais grupos, entretanto os pacientes não possuíam infecção por VHC nem cirrose hepática.

Os pacientes do Ambulatório foram entrevistados antes da consulta de rotina previamente agendada. Os pacientes aptos foram convidados a participar da pesquisa realizando o ^{13}C -ABT dinâmico em sua próxima consulta, comparecendo em jejum de 12 horas, e em seguida, foram encaminhados à consulta conforme procedimento do ambulatório. Durante o teste os pacientes ingeriram o substrato marcado, permaneceram em repouso e sopraram, a cada tempo de coleta, dois tubos. A classificação Child-Pugh foi realizada no momento da aplicação do ^{13}C -ABT com base nos exames de rotina do Ambulatório.

3.4 Aplicação do ^{13}C -ABT

A aminopirina marcada com ^{13}C (^{13}C -aminopirina) para o ^{13}C -ABT foi adquirida em pó e administrada via oral pelo paciente, com quantidade de 2 mg/kg de massa corporal, diluída em 200 ml de água conforme (GIANNINI; SAVARINO, 2013). Foi utilizada a balança de alta precisão marca Mettler Toledo, modelo XP6X para a pesagem da aminopirina para cada paciente do estudo. O substrato pesado foi armazenado em eppendorf e envolto em folha de alumínio para preservação das características físico-químicas até o momento da diluição em água para a ingestão do paciente.

O procedimento para aplicação do ^{13}C -ABT consiste em: coletar, em duplicata, o sopro basal do paciente em um tubo de 12 ml por meio do canudo; ingerir a ^{13}C -aminopirina diluída e iniciar a contagem de tempo; após a ingestão, coletar novamente, em duplicata, o sopro do paciente no tubo a cada 2,5 minutos até o tempo de 30 minutos, depois a cada 5 minutos até uma hora, e por fim, de 10 em 10 minutos até duas horas, conforme a figura 2.



Figura 2. Procedimento de aplicação e coleta do sopro no teste respiratório com ^{13}C -aminopirina para avaliação da função hepática.

3.5 Análise Isotópica das amostras de sopro

Para cada paciente foram coletados 50 tubos com amostra do sopro, totalizando 3400 amostras. Para a análise da razão isotópica das amostras foi utilizado um ABCA-IRMS (*Automated Breath CO_2 Analyser - Isotope Ratio Mass Spectrometry* - Espectrometria de massa de razão isotópica com analisador automático para análise de sopro de carbono) da marca SerCon e modelo ABCA-2, instalado no Centro de Isótopos Estáveis Ambientais em Ciências da Vida (CIE) do IBB/UNESP.

No ABCA-IRMS as amostras de sopro, devidamente armazenadas nos tubos, foram colocadas no amostrador e um sistema automatizado retirando a amostra do tubo, eliminando a água e outros gases presentes e conduzindo o dióxido de carbono até o espectrômetro de massa por meio do gás de arraste (gás hélio). Depois as amostras foram ionizadas por meio de um filamento que provoca a mudança de fase das amostras passando de gasosa para plasma, essas amostras ionizadas em forma de plasma são atraídas por fotossensores atravessando um campo magnético que resulta em trajetórias curvas e diferentes para cada massa molecular. No final da trajetória estão dispostos geometricamente os fotossensores para detectar as moléculas de dióxido de carbono ionizado com massas 45 ($^{13}\text{C}(^{16}\text{O})_2$) e 44 ($^{12}\text{C}(^{16}\text{O})_2$). Desta forma, a massa atômica das moléculas da amostra será quantificada e fornecida em razão isotópica. Os

resultados da razão isotópica, R , ($^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$) foram convertidos em enriquecimento relativo isotópico, $\delta^{13}\text{C}$ (‰), já calibrados com o padrão internacional para carbono ($R_{PDB}=0,0112372$), conforme equação 6 (MODAK, 2007; MUCCIO; JACKSON, 2009).

$$\delta^{13}\text{C} = \left(\frac{R_{amostra}}{R_{PDB}} - 1 \right) \cdot 1000 \quad (6)$$

3.6 Cálculo do DOB, CDOB, PDR e CPDR

O DOB e o PDR foram calculados conforme as equações 7 e 10 (SOM et al., 2014; WU et al., 2010).

$$DOB = \delta^{13}\text{C}_{amostra} - \delta^{13}\text{C}_{basal} \quad (7)$$

$$BSA = 0,024265 \cdot W^{0,5378} \cdot H^{0,3964} \quad (8)$$

$$V_{CO_2} = \frac{300\text{mmol}}{(BSA)} \quad (9)$$

$$PDR = \left(\frac{DOB \cdot R_{PDB} \cdot V_{CO_2} \cdot 10^{-3}}{\left(\frac{m}{MW} \right) \cdot \left(\frac{E}{100} \right) \cdot n} \right) \cdot 10^2 \quad (10)$$

Onde BSA representa a área superficial corpórea, W o peso e H a altura do paciente conforme equação 8, V_{CO_2} é a produção de CO_2 dada pela equação 9, m é quantidade de substrato administrado em mg, MW o peso molecular do substrato, n o número de átomos de ^{13}C na molécula do substrato, E o enriquecimento isotópico de ^{13}C (WU et al., 2010).

O CDOB e o CPDR foram calculados conforme as equações 11 e 12.

$$CDOB = \int_{t=0}^{T=t} (DOB) dT \quad (11)$$

$$CDOB = \int_{t=0}^{T=t} (PDR) dT \quad (12)$$

3.7 Análise Estatística

Com os resultados das análises de razão isotópica, foi obtida a curva do DOB, acumulado de DOB ao longo do tempo (CDOB), percentual de recuperação de dose (PDR), e a curva de percentual de dose cumulativa (CPDR) para cada paciente. Os resultados dos pacientes do grupo controle foram utilizados para montar a curva padrão e o intervalo de confiança de 95%. Para cada grupo (C, H, A e B) foi construído também a curva média com os respectivos intervalos de confiança para cada ponto de coleta. Para análise estatística, utilizou-se a análise de variância (ANOVA) de modelos lineares multivariados para estudar a possível relação das variáveis DOB, CDOB, PDR e CPDR com o tempo de coleta, gênero, e as variáveis contínuas IMC, idade e dose administrada. Para comparações das médias das variáveis foram realizadas as análises de comparação de médias utilizando o teste de Tukey. Todos os testes que apresentam valor p do teste estatístico menor que 5%, ($p < 0,05$) são considerados estatisticamente significativos. As análises estatísticas foram realizadas no software estatístico Minitab versão 16.

4. Resultados

Foram realizados 68 ^{13}C -ABT, em diferentes pacientes divididos em 8 grupos conforme o comprometimento da função hepática, e gênero. As características de cada grupo estão apresentadas na tabela 2. Foi observado que homens apresentaram maior massa, e consequentemente maior dose administrada de ^{13}C -aminopirina quando comparado com as mulheres. Notou-se também que com aumento da idade o comprometimento da função hepática se agrava.

Tabela 2: Características físicas dos diferentes grupos de pacientes submetidos ao teste respiratório com ^{13}C -aminopirina para avaliação da função hepática e suas respectivas doses de ^{13}C -aminopirina.

Grupos	N	Massa (Kg)	IMC (Kg/m ²)	Idade (Anos)	Dose (mg)
CM	10	92,60±14,60	29,3±3,83	49±3,9	185,2±29,20
CF	10	69,05±15,21	26,2±5,55	49±2,1	138,1±30,49
HM	10	83,80±12,71	27,9±3,12	53±4,3	167,6±25,53
HF	10	66,80±08,53	27,3±4,03	53±5,4	133,7±17,08
AM	8	81,55±18,02	27,0±4,33	53±5,7	163,1±35,97
AF	10	76,57±12,71	29,8±5,26	56±6,1	153,1±25,47
BM	5	77,00±16,04	26,1±3,85	57±9,0	154,0±35,72
BF	5	60,80±08,55	24,3±3,19	61±3,9	121,6±17,05

Nota. C representa o grupo controle, H pacientes com hepatite C sem cirrose, A e B pacientes com cirrose causada por HVC com classificação Child-Pugh A e B respectivamente, M representa o gênero masculino e F feminino. Os dados estão apresentados em médias ± desvio padrão.

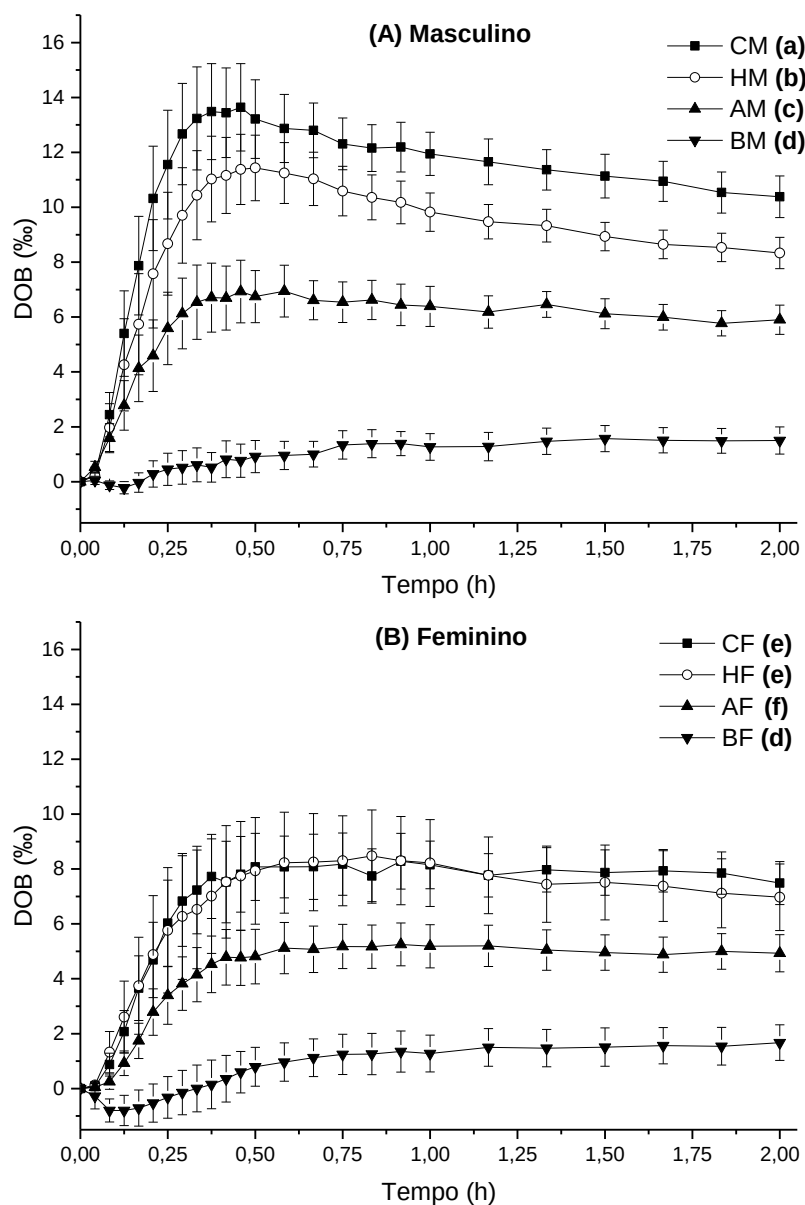


Figura 3. Turnover do ^{13}C pelo DOB do sopro de pacientes submetidos ao teste respiratório com ^{13}C -aminopirina para avaliação da função hepática em diferentes grupos. Grupos: C – controle; H – hepatite C sem cirrose; A e B pacientes com cirrose causada por HVC com classificação Child-Pugh A e B respectivamente, M representa o gênero masculino e F feminino. **(A)** Grupos do gênero masculino (n): CM (10); HM (10); AM (8); BM (5). **(B)** Grupos do gênero feminino (n): CF (10); HF (10); AF (10); BF (5). As barras verticais indicam o erro padrão. As letras minúsculas (**a, b, c, d, e, f**) indicam a análise estatística; letras iguais não houve diferença significativa e letras diferentes houve diferença estatística. Foi utilizado o método Tukey com 95% de confiança. DOB indica a diferença entre o enriquecimento relativo isotópico do sopro basal pelo sopro.

Na figura 3 notou-se que homens apresentam um pico característico antes do tempo 0,5 hora, o que não ocorreu em mulheres, com isso os grupos CM, HM e AM apresentaram-se com valor de DOB maior que CF, HF e AF respectivamente. Para homens foi possível observar a diferença ($p < 0,05$) entre cada grupo, já para mulheres não foi observado diferença entre os grupos CF e HF. Entretanto os grupos BM e BF não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$). Também foi observado, para todos os grupos que a partir do tempo uma hora o valor de DOB tende a se tornar constante, ou seja, não houve diferença de DOB nos tempos de coleta de uma a duas horas ($p > 0,05$). Notou-se também que os valores dos grupos BM e BF antes de 0,5 hora são negativos.

A figura 4 também apresenta as mesmas características dos grupos observados no *turnover* da figura 1. Inclusive os valores numéricos de CDOB (figura 4) e DOB (figura 3) no tempo de uma hora após a ingestão ^{13}C -aminopirina são iguais, possuindo a mesma diferença entre os grupos.

Diferentemente da figura 3, foi observado na figura 5 que não houve diferença entre os grupos CM e HM ($p > 0,05$), notou-se também na figura 5 que os valores de PDR para os grupos CF e HF são maiores que CM e HM, respectivamente. Entretanto observou-se que o valor de PDR tende a se tornar constante entre os tempos de coleta de uma e duas horas. Os grupos BM e BF também apresenta valores negativos de PDR no início do teste, conforme observado na figura 3.

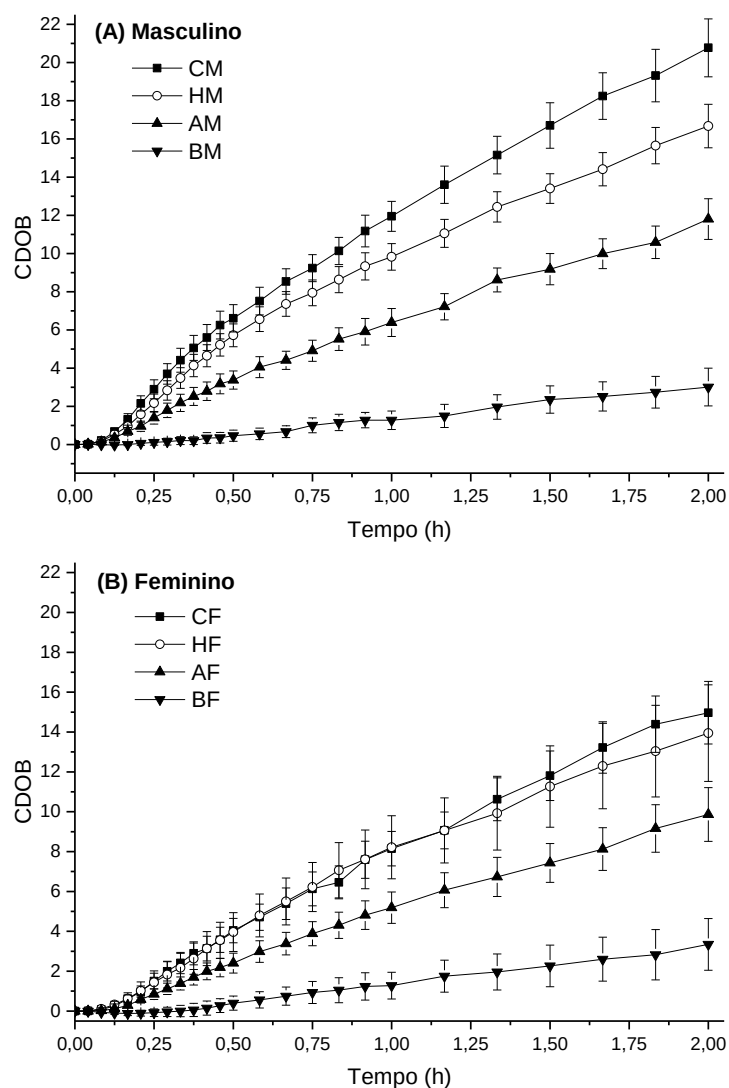


Figura 4. Acumulado do DOB ao longo do tempo em pacientes submetidos ao teste respiratório com ^{13}C -aminopirina para avaliação da função hepática em diferentes grupos. Grupos: C – controle; H – hepatite C sem cirrose; A e B pacientes com cirrose causada por HVC com classificação Child-Pugh A e B respectivamente, M representa o gênero masculino e F feminino. **(A)** Grupos do gênero masculino (n): CM (10); HM (10); AM (8); BM (5). **(B)** Grupos do gênero feminino (n): CF (10); HF (10); AF (10); BF (5). As barras verticais indicam o erro padrão. CDOB indica o acumulado da diferença entre o enriquecimento relativo isotópico do sopro basal pelo sopro.

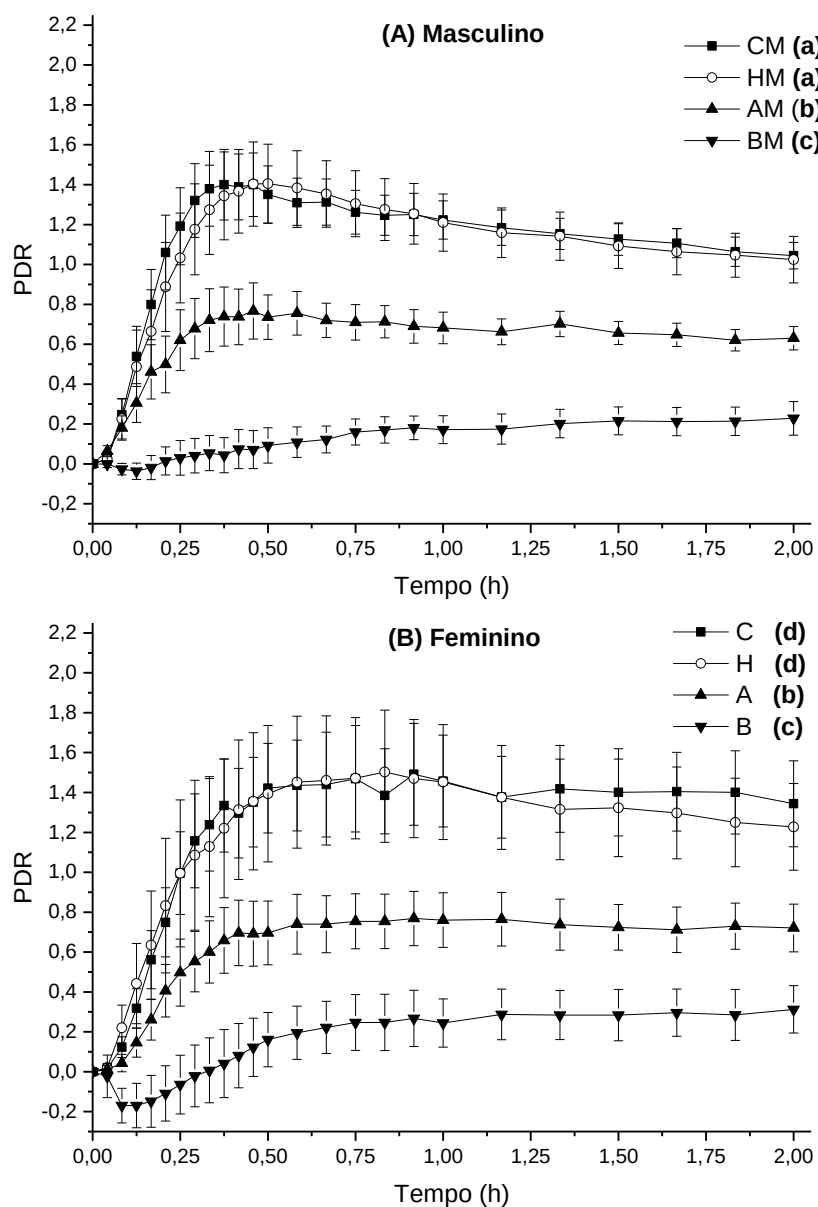


Figura 5. Turnover do ^{13}C pelo PDR do sopro de pacientes submetidos ao teste respiratório com ^{13}C -aminopirina para avaliação da função hepática em diferentes grupos. Grupos: C – controle; H – hepatite C sem cirrose; A e B pacientes com cirrose causada por HVC com classificação Child-Pugh A e B respectivamente, M representa o gênero masculino e F feminino. **(A)** Grupos do gênero masculino (n): CM (10); HM (10); AM (8); BM (5). **(B)** Grupos do gênero feminino (n): CF (10); HF (10); AF (10); BF (5). As barras verticais indicam o erro padrão. As letras minúsculas (**a, b, c, d**) indicam a análise estatística; letras iguais não houve diferença significativa e letras diferentes houve diferença estatística. Foi utilizado o método Tukey com 95% de confiança. PDR indica o percentual de recuperação de dose.

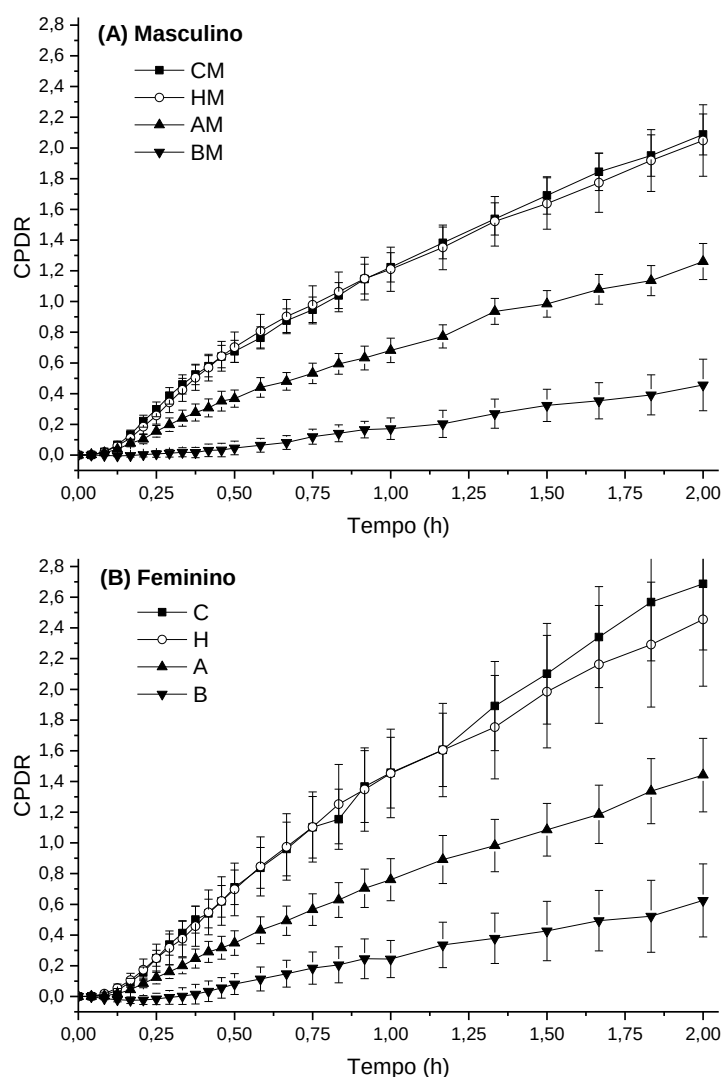


Figura 6. Acumulado do PDR ao longo do tempo e seu respectivo erro padrão para cada grupo e gênero de pacientes submetidos ao teste respiratório com ^{13}C -aminopirina para avaliação da função hepática em diferentes grupos. Grupos: C – controle; H – hepatite C sem cirrose; A e B pacientes com cirrose causada por HVC com classificação Child-Pugh A e B respectivamente, M representa o gênero masculino e F feminino. **(A)** Grupos do gênero masculino (n): CM (10); HM (10); AM (8); BM (5). **(B)** Grupos do gênero feminino (n): CF (10); HF (10); AF (10); BF (5). As barras verticais indicam o erro padrão. CPDR indica o acumulado do percentual de recuperação de dose.

A figura 6 não apresenta novas informações quando comparada com a figura 5. Inclusive os valores numéricos de CPDR (figura 4) e PDR (figura 3) no tempo de uma hora após a ingestão de ^{13}C -aminopirina são iguais, possuindo a mesma diferença entre os grupos.

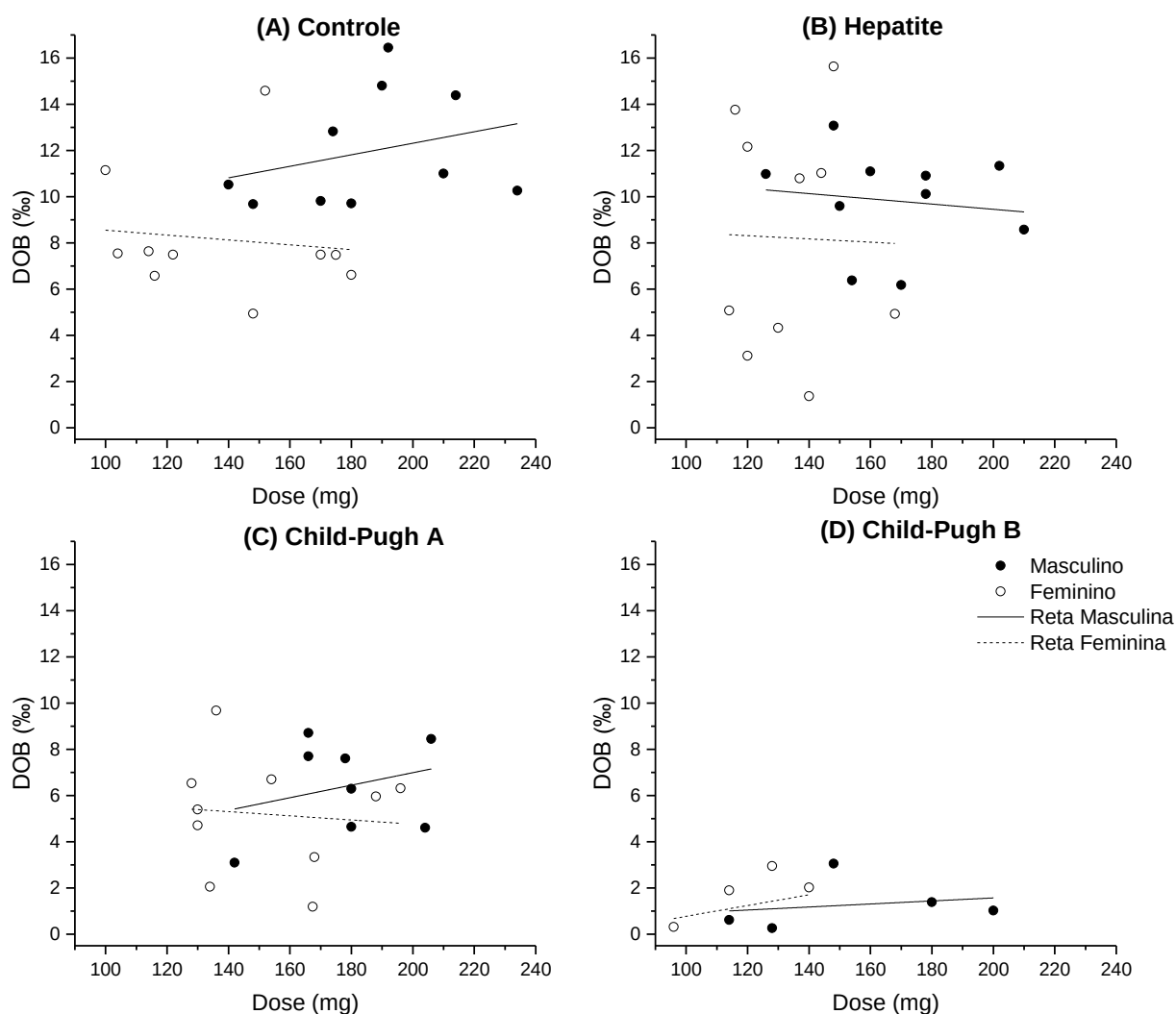


Figura 7. Dispersão dos pontos de DOB em uma hora após a ingestão de ^{13}C -aminopirina em relação a dose administrada. **(A)** grupo controle, **(B)** pacientes com HVC sem cirrose, e **(C)** e **(D)** pacientes portadores de cirrose infectados com HVC classificados em Child-Pugh A e B respectivamente. Círculos preenchidos representam o gênero masculino, e círculos vazios representam o gênero feminino. Retas contínuas representam as regressões lineares para os pontos do gênero masculino, e retas pontilhadas para o gênero feminino.

A figura 7 demonstra a dispersão dos pontos de DOB em relação a dose de ^{13}C -aminopirina administrada, após uma hora de teste. Observa-se na figura 7 que o valor da dose não apresenta tendência a mudança nos valores do DOB em uma hora para todos os grupos.

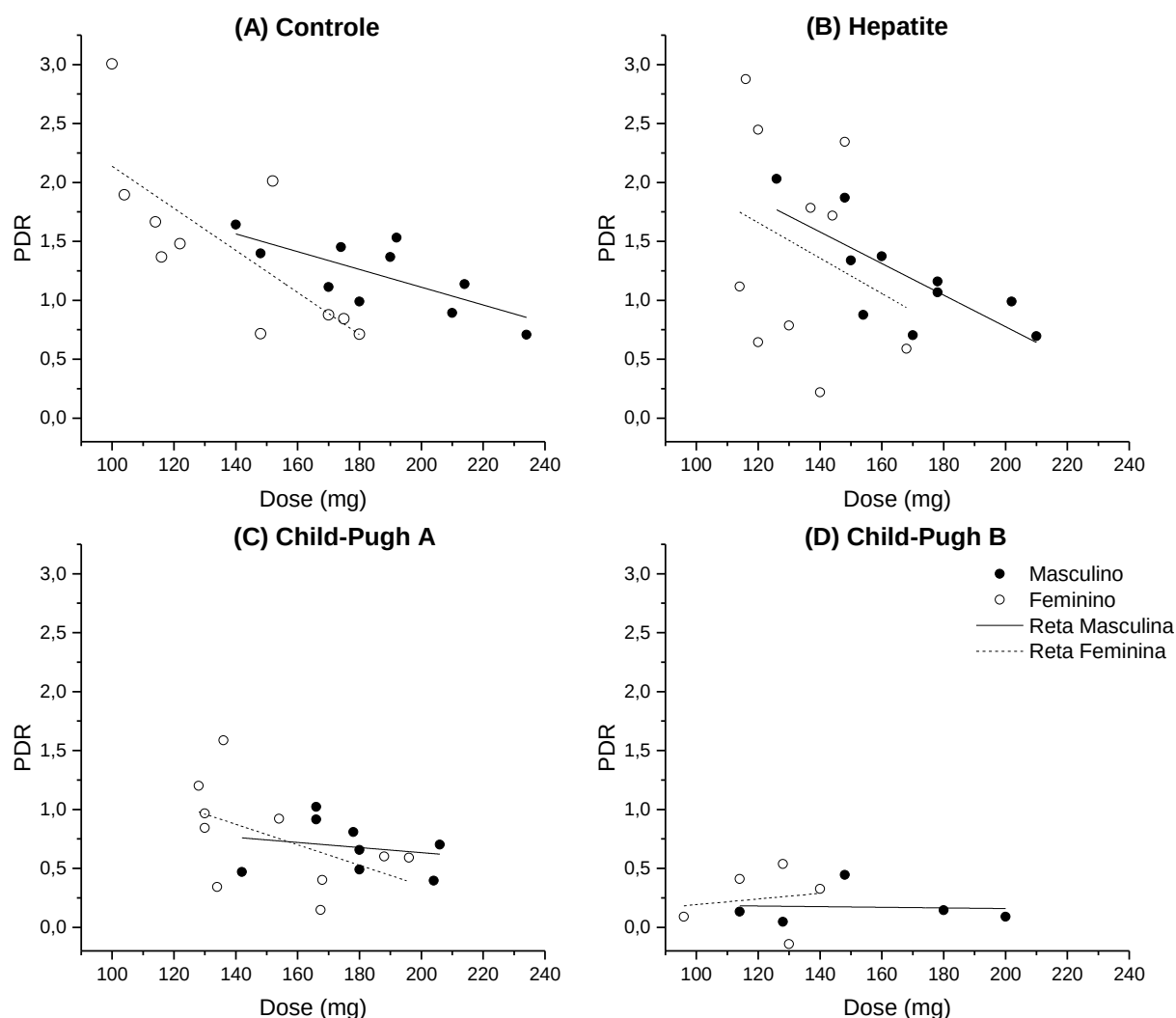


Figura 8. Dispersão dos pontos de PDR em uma hora após a ingestão de ^{13}C -aminopirina em relação a dose administrada. **(A)** grupo controle, **(B)** pacientes com HVC sem cirrose, e **(C)** e **(D)** pacientes portadores de cirrose infectados com HVC classificados em Child-Pugh A e B respectivamente. Círculos preenchidos representam o gênero masculino, e círculos vazios representam o gênero feminino. Retas contínuas representam as regressões lineares para os pontos do gênero masculino, e retas pontilhadas para o gênero feminino.

Na figura 8 observou-se que os valores do PDR para os grupos controle e hepatite sem cirrose foram influenciados pela dose administrada de ^{13}C -aminopirina.

A tabela 3 mostra os valores médios para cada grupo na verificação do comprometimento da função hepática a partir da aplicação do ^{13}C -ABT, tanto para DOB, quanto para PDR.

Tabela 3: Valores médios com erro padrão do sopro coletado em uma hora após ingestão da ^{13}C -aminopirina no teste respiratório com para avaliação da função hepática em diferentes grupos de pacientes.

Grupos	N	DOB (%)	PDR
CM	10	11,94±0,79	1,22±0,10
HM	10	9,82±0,70	1,21±0,14
AM	8	6,39±0,73	0,68±0,08
BM	5	1,27±0,48	0,17±0,07
CF	10	8,15±0,87	1,46±0,23
HF	10	8,22±1,58	1,45±0,29
AF	10	5,18±0,79	0,76±0,14
BF	5	1,27±0,67	0,24±0,12

Nota. C representa o grupo controle, H pacientes com hepatite C sem cirrose, A e B pacientes com cirrose causada por HVC com classificação Child-Pugh A e B respectivamente, M representa o gênero masculino e F feminino. Os dados estão apresentados em médias $\pm$ desvio padrão.

5. Discussão

Buscou-se otimizar os protocolos de aplicação do ^{13}C -ABT para avaliação dos estágios da cirrose hepática causada pelo VHC, verificando diferença entre gênero. Por meio da análise do *turnover* do ^{13}C do sopro dos pacientes mostramos que é possível obter resultados confiáveis do ^{13}C -ABT para avaliar, não somente os estágios da cirrose hepática, mas também identificar pacientes homens com HVC sem cirrose utilizando um teste estático, ou seja, coletando apenas em uma hora e sem a necessidade do cálculo do PDR ou CPDR.

Para a aplicação do ^{13}C -ABT foi escolhido pacientes com HVC pelo fato da cidade de Botucatu ser referência no tratamento da patologia, e por existir estudos realizados com o substrato ^{13}C -aminopirina para avaliação da função hepática de pacientes com HVC correlacionados com a classificação Child-Pugh (GIANNINI; SAVARINO, 2013; GIANNINI et al., 2002). Inicialmente buscou-se 10 pacientes por grupo, entretanto devido ao avançado comprometimento hepático dos pacientes classificados como Child-Pugh B e consequentemente possuírem outras enfermidades levou a dificuldade de encontrar pacientes dos grupos BM e BF. Dois pacientes do grupo AM foram excluídos da pesquisa por não estarem em jejum de 12 horas durante a realização do ^{13}C -ABT.

O presente estudo avaliou o ^{13}C -ABT em 25 tempos de coleta, a cada 2,5 minutos até meia hora, de 5 em 5 minutos até uma hora, e de 10 em 10 minutos até duas horas. A coleta em pequeno intervalo até meia hora teve a intenção de estudar os detalhes iniciais da curva devido à grande velocidade de metabolização da ^{13}C -aminopirina no fígado (AFOLABI et al., 2013). Depois de meia hora o *turnover* de ^{13}C tende a estabilizar possibilitando tempos de coleta mais espaçados, e após uma hora se torna mais estável ainda. Com o aumento do número de coletas do sopro do paciente houve maior precisão no estudo do comportamento da curva possibilitando encontrar o momento ideal para realização de um teste estático quando comparado com o protocolo atual do ^{13}C -ABT (GIANNINI; SAVARINO, 2013; GIANNINI et al., 2002) utiliza

apenas 5 pontos para obter a curva de PDR, dificultando o entendimento do comportamento da curva.

Na figura 3 o pico característico nos grupos CM e HM, antes de meia hora, podem ser explicados pela maior velocidade de metabolização da ^{13}C -aminopirina no fígado masculino, demonstrando saturação do substrato, e conseqüentemente leve decaimento do valor de DOB. Mesmo com o leve decaimento dos valores de DOB, em homens, não foi observada diferença significativa no intervalo de uma a duas horas do início do ^{13}C -ABT. Já nos grupos CF e HF onde não há saturação (pico), os valores de DOB se tornam constantes. A explicação para ausência de pico no *turnover* de ^{13}C para mulheres pode estar relacionado a presença de hormônios femininos que podem competir com o fármaco no fígado, uma vez que este foi metabolizado na região microssomal, retículo endoplasmático liso, onde é sintetizado os fosfolipídios que participam na formação dos hormônios (PIJLS et al., 2014). Entre as idades de 45 e 50 anos as mulheres podem estar em menopausa, esse fator pode influenciar na resposta do DOB. O fato do substrato não saturar em mulheres, pode também ser uma explicação, para o baixo valor do DOB nos grupos CF, HF e AF; uma outra explicação seria a equação de produção de CO_2 , pois esta não há diferença entre os gêneros na equação 9.

O comportamento das curvas dos grupos BM e BF, mostram valores negativos, estes resultados podem ser explicados pelo comprometimento da função hepática, que implica em uma metabolização mais lenta, portanto um sinal menor, como há vários erros desde os de procedimento até os de mensuração e calculados, como média, DOB, BSA, PDR, temos que a propagação da incerteza de erros resulta em valores negativos, portanto podem ser observados como zero. Outro meio de explicar os valores negativos seria o espaço morto de ar no organismo de cada paciente, o que pode resultar em valores mais baixos que o basal, portanto o paciente deveria soprar o tubo posteriormente de ter expelido o ar morto que se encontra no pulmão para melhor acurácia dos resultados.

A figura 4 não apresenta nenhuma informação diferente da figura 3. A única informação que poderia ser útil seria o coeficiente angular da de uma regressão linear de cada grupo, entretanto para essa informação seriam necessários mais tempos de coleta que o protocolo atualmente aceito, tornando-se assim inviável. A informação mais relevante para essa figura corresponde aos valores no tempo de uma hora (figura 4), que numericamente são iguais aos valores do DOB, também no tempo de uma hora (figura 3).

Na figura 5 o comportamento dos grupos CM e HM demonstraram-se menor que o grupo CF e HF na curva de PDR, essa mudança no comportamento da curva se deu pelo cálculo do PDR (equação 10), onde utiliza-se o valor da massa do paciente duas vezes no cálculo, uma na equação 8 para calcular BSA e depois V_{CO_2} , e outra na dose administrada de ^{13}C -aminopirina que pondera pela massa. Portanto a equação do PDR é dividida duas vezes pela massa do paciente, logo pacientes com massa diminuta possuem maior valor de PDR, o que explica os pacientes do sexo masculino, que possuem maior massa, ter sinal diminuto. Assim como a figura 4, a figura 6 não apresentou grande contribuição para os resultados.

As figuras 7 e 8 comprovam o erro dos valores de cálculo do PDR, pois mostra a dispersão dos valores de DOB e PDR após uma hora de ^{13}C -ABT em relação a dose administrada. Através das regressões lineares observou-se que os grupos CM, HM, CF e HF não possuíram influência da dose administrada de ^{13}C -ABT na figura 7, diferentemente do que ocorre na figura 8, pois o valor da dose (2mg por massa corpórea do paciente) é utilizado na equação de PDR, comprovando que não é viável utilizar essa equação dessa forma para normalização, neste caso o correto seria utilizar uma dose única.

A diferença dos valores de PDR com os trabalhos já realizados com a ^{13}C -aminopirina se dá pelo erro do cálculo do PDR, uma vez que os outros autores não se atentaram as unidades de medida, fazendo com que os resultados estejam multiplicados por múltiplo de 10.

Como os valores de DOB e PDR tornam-se constante após uma hora de ^{13}C -ABC, foi possível encontrar intervalos para cada grupo, conforme a tabela 3. Os valores de DOB, os quais não são influenciados pela massa, demonstraram maior eficiência uma vez que para homens é possível diferenciar todos os grupos. Com esse intervalo para DOB foi possível demonstrar que o ^{13}C -ABT pode ser otimizado temporalmente, tornando-se um teste estático, com diferentes valores médios para cada gênero. A otimização temporal e padronização em relação ao gênero poderá contribuir com a aceitação do teste na rotina clínica, possibilitando o acompanhamento do estadiamento da HVC e auxiliando no momento exato para o transplante hepático.

Os resultados vão mais além do que encontrar um tempo de coleta e diferença entre gênero para o ^{13}C -ABT, esses resultados sugerem que todos os ^{13}C -LFBT podem apresentar diferença entre gênero e também se tornarem estáticos. Estudos futuros poderão determinar tempo de coleta exclusivo para o teste e gênero; correlacionar o score MELD com o ^{13}C -ABT, uma vez que foi possível realizar o teste com a classificação Child-Pugh; um outro trabalho seria realizar o teste com uma dose única e verificar se os valores de PDR e DOB se mostram eficientes para a diferenciação dos grupos conforme o comprometimento da função hepática.

6. Conclusões

Concluiu-se neste trabalho que o ^{13}C -ABT pode ser otimizado utilizando apenas o valor do DOB em 1h após a ingestão da ^{13}C -aminopirina, sem a necessidade de calcular o PDR, ou mesmo, o CPDR. Também foi concluído que o ^{13}C -ABT consegue diferenciar a HVC sem cirrose apenas em homens. Por fim, concluiu-se que o ^{13}C -ABT possui protocolos diferentes para homens e mulheres.

7. Referências Bibliográficas

- AFOLABI, P. et al. Clinical utility of ¹³C-liver-function breath tests for assessment of hepatic function. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 58, p. 33–41, 2013.
- ALTER, M. J. et al. The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1988 through 1994. **N Engl J Med**, v. 341, n. 8, p. 556-62, Aug 19 1999.
- ANGERMAIR, B. et al. Child-Pugh versus MELD score in predicting survival in patients undergoing transjugular intrahepatic portosystemic shunt. **Gut**, v. 52, p. 879–885, 2003.
- ARMUZZI, A. et al. Review article: breath testing for human liver function assessment. **Alimentary pharmacology & therapeutics**, v. 16, p. 1977–96, 2002.
- BECKER, M. ¹³C breath test for measurement of liver function. **Gut**, v. 43 Suppl 3, n. suppl 3, p. S25–S27, 1998.
- BEDOSSA, P.; POYNARD, T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. **Hepatology**, v. 24, n. 2, p. 289-93, 1996.
- BOECKLEN, W.J. et al. On the use of stable isotopes in trophic ecology. **Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.** v. 42, p. 411-440, 2011.
- BRADEN, B. et al. ¹³C-breath tests: current state of the art and future directions. **Digestive and liver disease: official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver**, v. 39, n. 9, p. 795–805, set. 2007.
- BURATTINI, M. N. Apresentação do Modelo Matemático de Hepatites. **Reunião de Vigilância Epidemiológica de HIV/AIDS**. Brasília, DF, Brasil 2014.
- CHEN, S. L.; MORGAN, T. R. The natural history of hepatitis C virus (HCV) infection. **Int J Med Sci**, v. 3, n. 2, p. 47-52, 2006.
- CHRISTENSEN, E. Prognostic models in chronic liver disease: validity, usefulness and future role. **Journal of hepatology**, v. 26, n. 6, p. 1414–1424, jun. 1997.
- COELHO, L. G. et al. 3rd BRAZILIAN CONSENSUS ON Helicobacter pylori. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 50, n. 2, p. 1–17, 2013.
- CRISS, R. E. Nonequilibrium fractionation and isotopic transport. In: R. E. Criss (ed), **Principles of Stable Isotope Distribution**. Oxford University Press, New York, p. 139–142, 1999.
- DUCATTI, C. Aplicação dos isótopos estáveis em aquicultura. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, p. 1–10, 2007.
- DUCATTI, C. et al. Utilização de isótopos estáveis em ruminantes. **R. Bras. Zootec.**, v.40, p.68-75, 2011.
- EISBERG, R; R. RESNICK, **Física Quântica**, Editora Campus, 1979, 17ª tiragem.

- FORMAN, L. M.; LUCEY, M. R. Predicting the prognosis of chronic liver disease: an evolution from child to MELD. Mayo End-stage Liver Disease. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 33, n. 2, p. 473–475, 2001.
- FRANK, C. et al. The role of parenteral antischistosomal therapy in the spread of hepatitis C virus in Egypt. **Lancet**, v. 355, n. 9207, p. 887–91, Mar 11 2000.
- GIANNINI, E. et al. 13C-aminopyrine breath test to evaluate severity of disease in patients with chronic hepatitis C virus infection. **Alimentary pharmacology & therapeutics**, v. 16, n. 6, p. 717–725, 2002.
- GIANNINI, E.; SAVARINO, V. Relationship Between 13C-Aminopyrine Breath Test and the MELD Score and Its Long-Term Prognostic Use in Patients with Cirrhosis. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 58, n. 10, p. 3024–3028, 2013.
- KAWAKAMI, E. et al. 13 C-urea breath test with infrared spectroscopy for diagnosing helicobacter pylori infection in children and adolescents. **Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition**, v. 35, n. 1, p. 39–43, 2002.
- Machado, R.S. et al. Gastric emptying evaluation in children with erosive gastroesophageal reflux disease. **Pediatr. Surg.** v. 26, p. 473– 478, 2010.
- MERION, R. M. When is a patient too well and when is a patient too sick for a liver transplant. **Liver Transplantation**, v. 10, n. 10 SUPPL. 2, p. 69–73, 2004.
- MESSINA, J. P. et al. Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. **Hepatology**, v. 61, n. 1, p. 77–87, Jan 2015.
- MODAK, A. S. Stable isotope breath tests in clinical medicine: a review. **Journal of breath research**, v. 1, n. 1, p. 014003, set. 2007.
- MUCCIO, Z.; JACKSON, G. P. Isotope Ratio Mass Spectrometry. **The Analyst**, v. 134, n. 2, p. 213–22, fev. 2009.
- O'BRIEN D. M. Stable Isotope Ratios as Biomarkers of Diet for Health Research. **Annual review of nutrition**. 2015.
- OHTO, H. et al. Transmission of hepatitis C virus from mothers to infants. The Vertical Transmission of Hepatitis C Virus Collaborative Study Group. **N Engl J Med**, v. 330, n. 11, p. 744–50, Mar 17 1994.
- PIJLS, K. E. et al. Critical appraisal of 13C breath tests for microsomal liver function: Aminopyrine revisited. **Liver International**, v. 34, n. 5, p. 487–494, 2014.
- PIZZOFERRATO, M. et al. Specific 13C functional pathways as diagnostic targets in gastroenterology breath-tests: tricks for a correct interpretation. **European review for medical and pharmacological sciences**, v. 17 Suppl 2, n. Suppl 2, p. 45–50, 2013.
- REUBEN, A. Child comes of age. **Hepatology**, v. 35, n. 1, p. 244–245, jan. 2002.

SANTANA FILHO, C. R.; TAVARES, C. R. O.; PRESTES, C. V.; BENDASSOLLI, J. A.. Síntese e controle de qualidade da uréia enriquecida em ^{13}C para diagnóstico da *helicobacter pylori* (HP). **Química Nova**, v. 36, p. 107-113, 2013.

SEEFF, L. B. The natural history of chronic hepatitis C virus infection. **Clin Liver Dis**, v. 1, n. 3, p. 587-602, Nov 1997.

SERFATY, L. et al. Impact of early-untreated HIV infection on chronic hepatitis C in intravenous drug users: a case-control study. **AIDS**, v. 15, n. 15, p. 2011-6, Oct 19 2001.

SOM, S. et al. Excretion kinetics of ^{13}C -urea breath test: influences of endogenous CO_2 production and dose recovery on the diagnostic accuracy of *Helicobacter pylori* infection. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, p. 5405–5412, 2014.

THOMAS, D. L. et al. Perinatal transmission of hepatitis C virus from human immunodeficiency virus type 1-infected mothers. Women and Infants Transmission Study. **J Infect Dis**, v. 177, n. 6, p. 1480-8, Jun 1998.

WU, I. C. et al. Metabolic analysis of ^{13}C -labeled pyruvate for noninvasive assessment of mitochondrial function. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1201, p. 111–120, 2010.

WYLD, R. et al. Absence of hepatitis C virus transmission but frequent transmission of HIV-1 from sexual contact with doubly-infected individuals. **J Infect**, v. 35, n. 2, p. 163-6, Sep 1997.