

República Federativa do Brasil  
Ministério do Desenvolvimento, Indústria  
e do Comércio Exterior  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0606840-5 A2**



\* B R P I 0 6 0 6 8 4 0 A 2 \*

(22) Data de Depósito: 03/02/2006  
(43) Data da Publicação: 09/03/2010  
(RPI 2044)

(51) *Int.Cl.:*  
G01N 33/576 (2010.01)

(54) Título: **MÉTODO PARA O DIAGNÓSTICO IN VITRO DE ESTEATOSE HEPÁTICA OU DE UM SORO OU AMOSTRA DE SORO DE UM PACIENTE, E, KIT PARA O DIAGNÓSTICO DE ESTEATOSE HEPÁTICA EM UM PACIENTE**

(30) Prioridade Unionista: 03/02/2005 US 11/050,396

(73) Titular(es): Assistance Publique - Hopitaux De Paris

(72) Inventor(es): Thierry Poynard

(74) Procurador(es): Momsen, Leonardos & CIA.

(86) Pedido Internacional: PCT IB2006000333 de 03/02/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2006/082522de 10/08/2006

(57) Resumo: MÉTODO PARA O DIAGNÓSTICO IN VITRO DE ESTEATOSE HEPÁTICA OU DE UM SORO OU AMOSTRA DE SORO DE UM PACIENTE, E, KIT PARA O DIAGNÓSTICO DE ESTEATOSE HEPÁTICA EM UM PACIENTE. A presente invenção é dirigida a um novo método de diagnóstico para detectar a extensão de esteatose hepática em um paciente, que sofre de uma doença que envolve esteatose hepática, ou que já possui um teste de diagnóstico positivo de fibrose do fígado e/ ou presença de lesões necroinflamatórias no fígado, através do uso de uma concentração no soro de marcadores biológicos facilmente detectáveis. A invenção é também dirigida a kits de diagnóstico para a implementação do método.

“MÉTODO PARA O DIAGNÓSTICO *IN VITRO* DE ESTEATOSE HEPÁTICA OU DE UM SORO OU AMOSTRA DE SORO DE UM PACIENTE, E, KIT PARA O DIAGNÓSTICO DE ESTEATOSE HEPÁTICA EM UM PACIENTE”

## 5 CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção é dirigida a um novo método de diagnóstico para detectar a extensão de esteatose hepática em um paciente, em particular em um paciente, que sofre de uma doença que envolve esteatose hepática, ou que já possui um teste de diagnóstico positivo de fibrose do fígado e/ ou a presença de lesões necroinflamatórias no fígado, através do uso de uma concentração de soro de marcadores biológicos facilmente detectável. A invenção é também dirigida a kits de diagnóstico para a implementação do método.

## FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

15 O fígado graxo, também denominado esteatose, é definido como um acúmulo excessivo de gordura em hepatócitos (Bravo AA, et al. N. Engl. J. Med. 2001: 495- 500; Angulo P. N. Engl. J. Med. 2002, Apr. 18; 346 (16): 1221- 31). A doença do fígado graxo envolve o acúmulo de triglicerídeos em hepatócitos, a necrose de hepatócitos, a inflamação (Day CP. Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol. 2002; 16: 663- 78; Browning JD, Horton JD, J. Clin. Invest. 2004; 114: 147- 52), a obliteração de pequenas veias hepáticas e, de modo freqüente, a fibrose com algumas vezes progressão para cirrose, câncer hepatocelular e morte relacionada ao fígado (El- Serag HB, et al., Gastroenterology, 2004; 126: 460- 468, Dam - Larsen S. et al. Gut 2004; 53 : 750-5).

Em todo o mundo, a prevalência da esteatose hepática é muito alta, associada com vários fatores, tais que o álcool, diabetes, excesso de peso, hiperlipidemia, resistência à insulina, Hepatite C genótipo 3, abetalipoproteinemia e algumas drogas (Bellentani S., et al. Ann. Intern. Med.

2000; 132 : 112- 7; Levitsky J. Mailliard ME Semin. Liver Dis., 2004; 24: 233 -47).

A doença do fígado graxo não- alcoólica (NAFLD), é uma resposta de adaptação do fígado à resistência à insulina, que pode provocar a esteatoepatite não- alcoólica (NASH), que pode, em si mesma, induzir a resposta fibrogênica, o que pode resultar em cirrose (Day CP, Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol. 2002; 16: 663 -78).

Em pacientes com a doença do fígado alcoólica (Sorensen TI, et al., Lancet, 1984; 2: 241-4, hepatite crônica C (Fabris P., et al. J. Hepatol. 2004, 41: 644-51) e talvez em hepatite B (Phillips MJ, et al. Am. J. Pathol., 1992; 140 : 1295- 308), a presença de esteatose hepática está também associada com a progressão da fibrose, com ou sem lesões necroinflamatórias associadas (hepatite alcoólica ou viral).

Não existe recomendação padrão para o diagnóstico de esteatose hepática. A recomendação usual é a de medir GGT e ALT e de executar a biópsia do fígado para a classificação e a graduação em estágios (Bellentani S., et al. Ann. Intern. Med. 2000; 132 : 112- 7; Levitsky J., Mailliard ME, Semin. Liver Dis. 2004; 24 : 233 -47; Bravo AA, et al. N. Engl. J. Med. 2001: 344; 495- 500). Como a biópsia do fígado é ainda um procedimento invasivo e muito caro, com um potencial de erro de amostragem, seria vantajoso que houvesse um teste de execução rápida e fácil, que fornecesse um bom valor de prognóstico do nível de esteatose hepática no paciente.

Para o diagnóstico da fibrose, o FibroTest (FT(não- invasivo (Biopredictive, Paris France, Número de Patente US 6. 631. 33) tem sido validado como um marcador substituto em hepatite C crônica (Poynard T., et al. Comp. Hepatol. 2004; 3: 8) e B (Myers RP, et al. J. Hepatol. 3003; 39: 222- 30) e recentemente em doença do fígado alcoólica (Callewaert N, et al. Nature Med. 2004; 10; 1-6; Naveau S., et al. Clin. Gastroenterol. Hepatol., em

prensa).

Até o momento, no entanto, nenhum estudo demonstrou que um único ou um conjunto de biomarcadores podem ser usados como uma alternativa para a biópsia do fígado, para o diagnóstico de esteatose hepática nas causas mais comuns: álcool, hepatite viral e NAFLD.

Existe portanto uma necessidade de que seja desenvolvido um método de diagnóstico, que iria fornecer um bom valor previsível quanto à extensão de esteatose hepática em um paciente, e que fosse suficientemente confiável, de modo a reduzir a necessidade quanto à biópsia do fígado. Este método seria, de modo particular, vantajoso para um paciente, que sofresse de uma doença que envolvesse esteatose hepática, ou que já tivesse um teste de diagnóstico positivo de fibrose ou de lesões necroinflamatórias do fígado, de modo a adaptar o tratamento a esta doença específica.

### **SUMÁRIO DA INVENÇÃO**

A presente invenção provê um método de diagnóstico, que avalia, de modo prospectivo, o valor previsível de uma combinação de marcadores bioquímicos do soro simples para o diagnóstico de esteatose hepática, em particular no fígado de um paciente, que sofra de uma doença que envolve a esteatose hepática, ou que já recebeu um teste de diagnóstico positivo de fibrose do fígado e/ ou a presença de lesões necroinflamatórias. Com o alcance de valores previsíveis altamente positivos (a previsão de esteatose hepática significativa) de valores previsíveis negativos, o número de indicações de biópsias poderia ser reduzido. Isto poderia ser útil para pacientes e para a sociedade, de modo a reduzir o custo e o risco de biópsias do fígado.

### **DESCRIÇÃO DAS FIGURAS**

A figura 1 é um fluxograma de pacientes analisados e incluídos em grupos de treinamento e validação.

A figura 2 é a relação entre o SteatoTest, GGT (IU/ L) e ALT

(IU/L) e o grau de esteatose do fígado.

Gráficos de caixa entalhada, que mostram a relação no grupo de treinamento (FIG. 2A); no grupo de validação 1, pacientes de HCV antes do tratamento (FIG. 2B); no grupo de validação 2, pacientes de HCV curados (FIG. 2C); no grupo de validação 3, a doença do fígado alcoólica (FIG. 2D); e nos controles, voluntários saudáveis em jejum e sem jejum e doadores de sangue em jejum (FIG. 2E).

A linha horizontal dentro de cada caixa representa a mediana e a largura de cada caixa, a mediana na faixa interquartil  $\pm 1,57/\sqrt{n}$  para avaliar 95% de nível de significação entre as medianas do grupo. A falha das caixas sombreadas para a sobreposição significa a significância estatística ( $P < 0,05$ ).

As linhas horizontais, acima e abaixo de cada caixa, abrangem a faixa interquartil (de 25 a 75 percentil), e as linhas verticais a partir das extremidades da caixa abrangem os valores adjacentes (superior: 75 percentil mais 1,5 vezes a faixa interquartil, inferior 25 percentil menos 1,5 vezes a faixa interquartil). No grupo de validação 3, todos os pacientes tinham estenose e o grupo S0 e S1 foram combinados.

A figura 3 é uma relação entre o EsteatoTest, GGT (IU/ L) e ALT (IU/ L) e o grau de esteatose do fígado nos controles de combinação de base de dados integrados e em grupos de validação.

A falha das caixas sombreadas para a sobreposição significa a significação estatística entre as medianas ( $P < 0,05$ ). Existe uma diferença significativa entre todos os graus através do teste de comparação múltiplo Tukey- Kramer para todas as diferenças emparelhadas entre os meios ( $P < 0,05$ ).

Para GGT e ALT não houve diferença significativa entre “Sem esteatose” e “< 5%” e entre “5- 33%” e “33-100”. Para ALT, houve também diferença significativa entre “Sem esteatose” e “5-33”, “< 5%” e “5-33%”.

## DESCRIÇÃO DAS MODALIDADES PREFERIDAS

A presente invenção é portanto dirigida a um método para o diagnóstico de esteatose hepática em um paciente ou a partir de uma amostra de plasma ou soro de um paciente, que compreende os estágios de:

5 a) estudar 5 marcadores bioquímicos através da medição dos valores de sua concentração no soro ou plasma do referido paciente, em que os marcadores são:

- aApoA1 (apolipoproteína A1),
- alfa-2- macroglobulina,
- 10 - ALT (alanina aminotransferase),
- GGT (gamaglutamil transpeptidase), e
- triglicerídeos.

b) através do estudo de um marcador clínico, selecionado a partir do grupo constituído pelo índice de massa corpórea ( $\text{Peso/ Altura}^2$ ), a  
15 medição da cintura, e a razão (medição de cintura/ medição do quadril);

c) combinar os referidos valores através de uma função logística, que inclui os referidos marcadores, de modo a obter um valor final, em que a referida função logística é obtida através do método que se segue:

20 i) classificação de uma coorte de pacientes em diferentes grupos de acordo com a extensão de sua doença;

ii) identificação de fatores, que diferem significativamente entre aqueles grupos através de análise unidimensional;

25 iii) análise de regressão logística, de modo a determinar o valor discriminativo independente de marcadores para o diagnóstico de esteatose hepática;

iv) construção da função logística através da combinação deste fatores independentes identificados; e

d) análise do referido valor final da referida função logística, de modo a determinar a presença de esteatose hepática no referido paciente.

A esteatose hepática pode estar associada com vários fatores, tais que o álcool, o diabetes, o excesso de peso, hiperlipidemia, resistência à insulina hepatite C genótipo 3, abetalipoproteinemia e algumas drogas. De modo particular, a presente invenção é dirigida ao diagnósticos, tanto de esteatose alcoólica, como não- alcoólica.

Através da definição do melhor índice (“Grau de Esteatose”) em termos de discriminação foi determinada a função de regressão logística, combinando os fatores independentes.

A função logística é obtida através da combinação do peso relativo de cada parâmetro, tal como individualmente determinado na regressão logística, com um sinal negativo quando os marcadores apresentam uma correlação negativa com o estágio de esteatose hepática. Os logaritmos são usados para os marcadores cujos valores apresentam uma faixa muito ampla.

A qualidade da função logística é analisada com o auxílio da curva Característica de Operação do Receptor (ROC), que é obtida dependendo do limiar desejado para o diagnóstico. O modo de obtenção da curva ROC é descrito nos exemplos. Na presente invenção, a classificação dos pacientes foi efetuada de acordo com diferentes graus de esteatose hepática (nenhuma = 0%, branda = 1-5%, moderada = 6-32%, e (acentuada e severa) = 33 - 100%, em que cada percentual refere-se ao percentual de hepatócitos envolvido na esteatose), mas este poderia ser alterado se fosse intencionado o diagnóstico do paciente apenas com um grau acentuado ou severo. Isto poderia conduzir a outra curva ROC.

O diagnóstico quanto à presença ou ausência de esteatose hepática no paciente pode ser ainda refinado pelos dados que se referem à prevalência esperada de esteatose hepática na população.

A função logística pode ainda compreender outros marcadores clínicos ou bioquímicos. Em uma modalidade preferida, a função logística

também compreende a idade ou o gênero do paciente. Em outra modalidade, a função logística pode também compreender outros marcadores bioquímicos, tais que bilirubina, haptoglobina, AST (aspartato aminotransferase), glicose, e (colesterol ou HDL- colesterol). De modo preferido, a função logística irá

5 compreendem pelo menos 1 ou 2, de modo mais preferido de 3 a 5 destes outros marcadores bioquímicos. De modo mais preferido, a função logística pode também compreender bilirubina total, haptoglobina, glicose e colesterol.

Os marcadores bioquímicos, que são dosados no estágio a) do método de acordo com a presente invenção, são marcadores bioquímicos

10 “simples, o que significa que eles são facilmente dosados com os métodos já conhecidos na técnica (cromatografia, eletroforese, ensaio ELISA...).

Os diferentes coeficientes usados para os valores obtidos para os diferentes marcadores na função logística podem ser calculados através de análise estatística, tal como descrito nos exemplos.

De modo particular, uma função logística adequada, que pode ser usada para a implementação do método da invenção é a que se segue:

15 
$$f = a_1 - a_2 [\text{Idade}(\text{anos})] + a_3 [\text{ApoA1 (g/l)}] - a_4 [\text{Índice de Massa Corpóreo (Peso/ Altura}^2)] + a_5 \cdot \text{Log} [11\text{fa.2 -macroglobulina (g/l)}] - a_6 \cdot \text{Log} [\text{ALT (alanina aminotransferase) (IU/ L)}] - a_7 \cdot \text{Log} [\text{bilirubina total } (\mu\text{mol/ L)}] - a_8 \cdot [\text{colesterol (mmol/L)}] - a_9 \cdot \text{Log} [\text{GGT (gamaglutamil transpeptidase)(IU/L)}] - a_{10} \cdot [\text{glicose (mmol/L)}] - a_{11} \cdot \text{Log} [\text{haptoglobina (g/L)}] - a_{12} \cdot [\text{triglicerídeos (mmol/L)}] + a_{13} \cdot [\text{Gênero (feminino = 0, masculino =1)}],$$
 em que

25  $a_1$  está compreendido no intervalo de  $[6.68805 - x\%; 6.68805 + x\%]$ ,

$a_2$  está compreendido no intervalo de  $[1.5533\text{E}-02 - x\%; 1,55337\text{E} - 02 + x\%]$ ,

$a_3$  está compreendido no intervalo de  $[1,161531 - x\%; 1,161531 + x\%]$ ,

a4 está compreendido no intervalo de  $[0,11889 - x\%; 0,11889 + x\%]$ ,

a5 está compreendido no intervalo de  $[1,74791 - x\%; 1,74791 + x\%]$ ,

5 a6 está compreendido no intervalo de  $[0,96453 - x\%; 0,96453 + x\%]$ ;

a7 está compreendido no intervalo de  $[0,11958 - x\%; 0,11958 + x\%]$ ,

10 a8 está compreendido no intervalo de  $[0,68125 - x\%; 0,68125 + x\%]$

a9 está compreendido no intervalo de  $[1,17922 - x\%; 1,17922 + x\%]$ ,

a10 está compreendido no intervalo de  $[1,46963 - x\%; 1,46963 + x\%]$ ,

15 a11 está compreendido no intervalo de  $[0,34512 - x\%; 0,34512 + x\%]$ ,

a12 está compreendido no intervalo de  $[1,17926 - x\%; 1,17926 + x\%]$ , e

20 a13 está compreendido no intervalo de  $[0,35052 - x\%; 0,35052 + x\%]$ .

Um “intervalo de  $[a - x\%; a + x\%]$ ” significa um intervalo de  $[(100-x) / 100.a; (100 + x) / 100.a]$ . De modo preferido, x é, no máximo, 90, 80 ou 70, de modo mais preferido no máximo 60, 50 ou 40, de modo ainda mais preferido no máximo e 30, 20, 10 ou 5. Todos os coeficientes são truncados em um número de 5 decimais. Por exemplo, para x igual a 90, a13 está compreendido no intervalo de  $[0,03505; 0,66598]$ .

De fato, as definições numéricas para os coeficientes nas diferentes funções pode variar dependendo do número e das características dos pacientes estudados. Portanto, o valor fornecido para os coeficientes do

diferentes marcadores têm que ser interpretados como capazes de serem ligeiramente diferentes, sem que seja reduzido o escopo da invenção.

Uma função específica, que pode ser utilizada, quando  $x$  é igual a zero, é:

$$f = 6,68805 - 1,55337E-02 \{ \text{Idade (anos)} \} + 1,161531 [\text{ApoA1 (f/ L)}] - 0,11889 [\text{Índice de Massa Corpórea (Altura/ Peso}^2)] + 1,74791. \text{Log} [\text{alfa.2-macroglobulina (g/L)}] - 0,96453 \text{Log} [\text{ALT (alanina aminotransferase) (IU/ L)}] - 0,11958. \text{Log} [\text{bilirubina total (}\mu\text{mol/ L)}] - 0,68125. \text{Log} [\text{colesterol (mmol/ L)}] - 1,17922. \text{Log} [\text{GGT (gamaglutamil transpeptidase) (IU/ L)}] - 1,46963. \text{Log} [\text{glicose (mmol/ L)}] - 0,34512. \text{Log} [\text{haptoglobina (g/ L)}] - 1,17926. \text{Log} [\text{triglicerídeos (mmol/ L)}] + 0,35052 [\text{Gênero (feminino =0, masculino =1)}].$$

Dependendo do valor final obtido através da análise de valores de marcadores com a função logística, é possível extrair conclusões sobre a presença ou ausência de esteatose hepática para o paciente. É também possível concluir sobre o grau de esteatose hepática, tomando-se o referido grau como o limite no desenho da curva de ROC.

Em certas modalidades, a invenção refere-se, deste modo, a um método tal como previamente descrito, em que o valor final da função logística é adicionalmente usado para o diagnóstico do grau de esteatose hepática. Os diferentes graus de esteatose hepática são definidos de acordo com as características histológicas de biópsias do fígado. Uma definição mais precisa de graus de esteatose hepática é provida no Exemplo 1.

O método de acordo com a invenção pode ainda compreender um estágio de previsão da evolução da doença, com base no grau de esteatose hepática deduzido a partir do valor final da função logística. Em particular, um grau de esteatose no corte 0,30 possui uma faixa de sensibilidade muito alta, de 85% a 100%, de acordo com diferentes grupos (Tabela 4) e um grau de esteatose no corte 0,70 possui uma faixa especificamente muito alta, de

83% a 100%. Além disso, como já demonstrado para o Fibrotest (Poynard 2004, Clin. Chem. 2004), muitos dos distúrbios entre o grau Esteato e a biópsia são decorrentes de erro da biópsia (tamanho de amostra pequeno). É esperado que o método da invenção possa reduzir a necessidade de biópsia do fígado em mais do que 80%. Pela primeira vez, um clínico pode Ter uma estimativa de características histológicas principais, que conduzem à cirrose, ou que explicam anormalidades de testes de fígado : o grau de Esteatose para a esteatose, o grau de Fibrose (FibroTest, Biopredictive, Paris, France) para a fibrose, o grau de Atividade (ActTeste, Biopredictive, Paris, France) para as características necrótico- inflamatórias da hepatite crônica C e B. A biópsia deve ser indicada apenas em uma segunda linha, no caso de componentes que não possam ser interpretados, tal como descrito para o grau de Fibrose (FibroTest), isto é, inflamação aguda, síndrome de Gilbert ou hemólise (Poynard, Clin. Chem, 2004).

De acordo com a invenção, o grau de esteatose hepática reduzido a partir do valor final da função logística pode ser muito valioso para que o médico possa selecionar um tratamento adequado para o paciente, de acordo com o estágio da doença.

Além disso, o grau de esteatose hepática pode ser usado pelo médico para decidir se deve efetuar uma biópsia de fígado no paciente, ou não.

Dependendo da prevalência da esteatose hepática na população de pacientes que está em consulta, os dados obtidos com o método da invenção podem ser usados para determinar a necessidade de que seja efetuada uma biópsia de fígado no paciente. É esperado que o método da invenção venha a reduzir a necessidade da biópsia de fígado em torno de 80%.

O método de acordo com a intenção é destinado a ser usado para pacientes, que sofrem de qualquer doença que envolva a esteatose

hepática, que poderia ser desenvolvida para cirrose. Por uma “doença que envolve esteatose hepática”, é compreendida qualquer doença, que possa conduzir ao desenvolvimento de esteatose hepática. Em particular, o método da invenção é efetuado, de modo vantajoso, para detectar esteatose hepática em pacientes, que sofram de uma doença incluída no grupo, que consiste de hepatite B e C, alcoolismo, hemocromatose, doença metabólica, diabetes, obesidade, hepatite autoimune, cirrose biliar primária, déficit de alfa 1-antitripsina, mal de Wilson.

O método da invenção destina-se, de modo particular, a ser usado para um paciente, que já tenha sido submetido a um teste de diagnóstico de fibrose do fígado e/ ou presença de lesões necroinflamatórias no fígado.

De modo mais preferido, o método da invenção destina-se a ser usado para um paciente, que já tenha sido submetido a um teste de diagnóstico FibroTest/ Acti-Test, conforme descrito na Patente U. S. 6.631.330, que é incorporada a este a título referencial.

A invenção é também dirigida a um kit de diagnóstico de esteatose hepática em um paciente, que compreende instruções que permitem determinar a presença ou a ausência de esteatose hepática no referido pacientes, após a dosagem de marcadores bioquímicos.

As instruções podem compreender a função logística, que tem que ser usada após a determinação da dosagem dos marcadores bioquímicos. Pode parecer como um suporte impresso, assim como um suporte que possa ser utilizado por computador, tal que um software. As instruções podem também compreender a curva ROC, dependendo do limiar que é buscado, de modo a permitir a análise dos dados finais, obtidos a partir da função logística. Elas podem também compreender diferentes tabelas, que permitem obter os valores previsíveis, dependendo da prevalência esperada de esteatose hepática na população de pacientes.

O kit de diagnóstico de acordo com a presente invenção pode também conter elementos, que permitem a dosagem dos marcadores biológicos de interesse.

5 O referido kit de diagnóstico pode também conter instruções para a quantificação de graus diferentes de esteatose hepática (nenhum = 0%, brando = 1-5%, moderado = 6-32%, acentuado = 33- 66% e severo = 67 - 100%), e outros graus intermediários.

10 O método da invenção pode ser facilmente automatizado, a dosagem dos marcadores sendo executada automaticamente, os dados sendo enviados a um computador ou calculador, que irá calcular o valor da função logística e analisá-los com o auxílio da curva ROC, e eventualmente a prevalência da esteatose hepática na população de pacientes. Os dados obtidos pelo médico são, deste modo, mais facilmente interpretáveis, e irão permitir um aperfeiçoamento no processo para a decisão da necessidade de uma  
15 biópsia ou o tratamento adequado a ser prescrito.

Os exemplos que se seguem tem a intenção de descrever um aspecto da invenção, e fornecer a metodologia, de modo a repetir o método da invenção, mas não devem limitar a invenção.

## **EXEMPLOS**

### 20 **Exemplo 1**

#### **Pacientes e Métodos**

##### **1.1 Pacientes**

Pacientes consecutivos com soro disponível, uma biópsia de fígado consistente e uma duração de tempo entre o soro e a biópsia inferior a  
25 3 meses foram incluídos (Figura 1). Os critérios de não- inclusão incluíram soro não- disponível, e biópsias e pacientes não disponíveis, devido ao fato de que a biópsia e o soro foram coletados com mais do que 3 meses de diferença. A análise foi executada em um primeiro grupo (grupo de treinamento) e validade em 3 grupos diferentes (grupos de validação).

Os pacientes do grupo de treinamento foram respectivamente incluídos para esta análise específica, mas foram analisados em estudos de validação prospectivos prévios de Fibrotest entre setembro de 2000 e agosto de 2004 (Poynard T. et al., *Comp. Hepatol.*, 2004, 3: 8; Myers RP, et al., *J. Hepatol.*, 2003, 39: 222- 30; Ratzin V. et al., *Hepatology* 2003, 38: 510A).  
5 Todos eram pacientes internos, hospitalizados no Departamento de Hepato-Gastroenterology of Groupe Hospitalier Pitié- Salêtrière para NAFLD, hepatite C, B, e doença do fígado alcoólica.

Pacientes do grupo de validação 1 (pacientes de hepatite C)  
10 foram analisados, de modo retrospectivo, a partir de um estudo de esteatose hepática com hepatite C crônica (Poynard T. et al., *Hepatology*, 2003, 38: 75-85). Para este propósito, pacientes previamente não tratados de um ensaio aleatório de multicentro prospectivo de PEG-IFN e Ribavirina foram incluídos. Os biomarcadores e os resultados da biópsia em linha de referência  
15 foram usados.

Pacientes do grupo de validação 2 (pacientes anteriores com HCV não- detectável) eram pacientes do mesmo ensaio aleatório que no grupo de validação 1 (Poynard T., et al., *Hepatology*, 2003, 38: 75- 85), que foram “curados” com resposta virológica sustentada, significando que o RNA  
20 de HCV não é detectável 24 semanas após o final do tratamento. Os biomarcadores e os resultados da biópsia efetuada 24 semanas após o final do tratamento foram usados. Este grupo foi considerado como um grupo de validação de NAFLD, porque a esteatose viral possível havia sido curada pelo tratamento (Poynard T., et al. *Hepatology*, 2003, 38:75 - 85).

25 Pacientes do grupo de validação 3 (pacientes de doença do fígado alcoólica) foram retrospectivamente incluídos para esta análise específica, mas foram incluídos, de modo prospectivo, entre 1998 e 2000, em uma coorte de pacientes alcoólicos, para os quais um ponto terminal primário foi a identificação de marcadores bioquímicos. Os detalhes desta coorte foram

recentemente publicados em um estudo de validação de FibroTest (Naveau S., et al., Clin. Gastroenterol. Hepatol, 2005, em prensa). Todos eram pacientes hospitalizados no Hepato-Gastroenterology Department of Hôpital Antoine Bèelère devido a composições de doença do fígado alcoólica.

5 As características dos pacientes dos diferentes grupos estão relacionadas na Tabela 1.

Características	Grupo de treinamento	Grupo de validação 1 HCV	Grupo de validação 2 HCV curado	Grupo de validação 3 Doença do fígado alcoólica
Número de pacientes	310	171	201	62
Idade na biópsia (anos)	48,9 (12,4)	44,1 (7,2)	43,6 (8,0)	46,6 (9,8)
Masculino	201 (65%)	111 (65%)	122 (61%)	47/62 (76%)
Feminino	109 (35%)	60 (35%)	79 (39%)	15 (24%)
BMI(kg/m <sup>2</sup> )	25,4 (5,1)	27,7 (5,0)	26,5 (4,8)	24,2 (4,1)
<b>Qualidade da Biópsia</b>				
Comprimento	17,0 (6,2)	16,6 (15,5)	17,0 (8,2)	13,5 (6,8)
Comprimento > 15 mm	205 (67%)	82 (48%)	96 (48%)	15 (24%)
Número de fragmentos	2,5 (2,3)	-	-	1,9 (1,6)
Um fragmento	128/278 (46%)	-	-	37 (60%)
Duração da biópsia - soro, média (faixa de dias)	1 (0-30)	40 (0-90)	11 (0-45)	7 (0-14)
<b>Fator de Risco do Fígado</b>				
HCV	211 (68%)	171 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
HBV	18 (6%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
NAFLD	69 (22%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
ALD	12 (4%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Álcool diário > 50 g/ dia	34/236 (14%)	0 (0%)	0 (0%)	62 (100%)
Infecção de HCV curada	0 (0%)	0 (0%)	201 (100%)	0 (0%)
<b>Fator Metabólico</b>				
BMI > = 27,0	92 (30%)	88 (51%)	77 (38%)	14 (23%)
Glicose > = 6,0 mmol/ L	63 (20%)	30 (18%)	27 (13%)	20 (32%)
Triglicerídeos > = 1,7 mmol/ L	67 (22%)	36 (21%)	54 (27%)	20 (32%)
Colesterol > = 6,0 mmol/ L	61 (20%)	12 (7%)	26 (13%)	23 (37%)
<b>Fator metabólico, número por paciente</b>				
Nenhum	132 (43%)	60 (35%)	96 (48%)	17 (27%)
Um	101 (33%)	64 (37%)	72 (36%)	20 (32%)
Dois	52 (17%)	39 (23%)	31 (15%)	19 (31%)
Três	22 (7%)	8 (5%)	0 (0%)	5 (8%)
Quatro	3 (1%)	0 (0%)	2 (1%)	1 (2%)
<b>Gravidade de Esteatose do Fígado</b>				
Nenhum (0%)	130 (42%)	58 (34%)	116 (58%)	2 (3%)
Brando (grau, 1-5%)	40 (13%)	68 (40%)	63 (31%)	2 (3%)
Moderado (Grau 6-33%)	69 (22%)	35 (20%)	17 (8%)	42 (68%)
Acentuado (Grau 34- 66%)	36 (12%)	7 (4%)	4 (3%)	12 (19%)
Severo (Grau 67- 100%)	35 (11%)	3 (2%)	1 (0,5%)	4 (7%)
<b>Estágio de Fibrose do Fígado na Biópsia</b>				
F0 nenhum	62 (20%)	0 (0%)	16 (8%)	8 (13%)
F1 fibrose sem septos	127 (41%)	102 (60%)	136 (68%)	23 (37%)
F2 alguns septos	52 (17%)	39 (23%)	33 (16%)	11 (18%)
F3 muitos septos	36 (11%)	19 (11%)	9 (4%)	7 (11%)
F4 Cirrose	33 (11%)	11 (6%)	7 (3%)	13 (21%)
<b>Marcadores (faixa normal)</b>				
AST IU/L (17-27 fêmeas; 20-32 machos)	83 (159)	82 (57)	23 (9)	89 (83)
ALT IU/L (11-26 fêmeas; 16-35 machos)	109 (114)	118 (94)	19 (10)	72 (88)

Bilirubina total (1-2)	14,8 (26,2)	11,1 (4,8)	8,8 (4,6)	21,5 (19,6)
GGT IU/ L (7-32 fêmeas; 11-49 machos)	112 (183)	84 (96)	21 (18)	323 (443)
2 Macroglobulina g/ L (fêmeas 16 -40, machos 14- 33)	2,4 (1,0)	3,1 (1,2)	2,0 (0,8)	1,8 (0,5)
Apo A1 g/ L (12-17)	1,4 (0,3)	1,3 (0,3)	1,2 (0,3)	1,5 (0,5)
Haptoglobina g/ L (0,35 -2,00)	0,95 (0,57)	0,78 (0,45)	0,86 (0,43)	1,39 (0,63)
Glicose (mmol/ L)	5,5 (3,2)	5,4 (1,2)	5,3 (1,0)	5,8 (1,6)
Colesterol (mmol/ L)	4,9 (1,3)	4,5 (1,0)	5,0 (1,0)	5,4 (1,9)
Triglicerídeos (mmol/ L)	1,5 (1,4)	1,4 (0,8)	1,6 (1,0)	1,9 (3,1)
FibroTeste	0,42 (0,28)	0,47 (0,26)	0,29 (0,20)	0,43 (0,28)
EsteatoTeste	0,49 (0,25)	0,53 (0,22)	0,36 (0,22)	0,58 (0,25)

Os dados estão em média (SD) ou proporção. AST = aspartato aminotransferase. ALT = alanina aminotransferase. GGT = glutamil transpeptidase. ApoA1 = apolipoproteína a1.

### **Tabela 1: Características de pacientes incluídos**

Um grupo de controle foi também analisado. Ele foi constituído por voluntários aparentemente saudáveis em jejum e sem jejum previamente incluídos em uma validação de FibroTest (Muntcanu M. et al. Comp. Hepatol. 2004; 3,3 e doadores de sangue sem jejum adicionais.

#### **1.2. Marcadores de Soro**

Os 10 marcadores bioquímicos que se seguem foram avaliados para os diferentes grupos : ApoA<sub>1</sub>, ALT (alanina aminotransferase), AST (aspartato aminotransferase), alfa-2-macroglobulina, GGT (gama glutamil transpeptidase), bilirubina total, colesterol, glicose, e triglicerídeos.

Os 10 marcadores bioquímicos incluem 6 componentes do Fibro Teste - Acti Test ajustados pela idade e sexo (algoritmo de inteligência artificial patenteado USPTO, 6 631. 330), além de AST, colesterol, glicose, e marcadores de triglicerídeo e BMI.

FibroTest (Biopredictive, Paris, France; FibroSURE LabCorp, Burlington, NC, USA) foi determinado como previamente publicado (Poynard T., et al. Comp. Hepatol. 2004, 3: 8; Myers RP et al. J. Hepatol. 2003, 39: 222- 30; Callewaert N., et al. Nature Med. 2004; 10, 1-6; Naveau S., et al. Clin. Gastroenterol. Hepatol, em prensa; Imbert- Bismut F., et al., Clin. Chem. Lab. Med. 2004; 42: 323-33; Munteanu M. et al. Comp. Hepatol. 2004: 3,3).

Os procedimentos pré- analíticos e analíticos recomendados

publicados foram usados (Poynard T., et al. *Comp. Hepatol.* 2004, 3: 8; Myers RP, et al. *J. Hepatol.* 2003; 39: 222- 30; Callewaert N., et al. *Nature Med.* 2004; 10; 1-6; Naveau S., et al. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* em prensa; Imbert- Bismut F. et al. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2004; 42: 323-33; Munteanu M., et al. *Comp. Hepatol.* 2004; 3: 3).

Nos grupos de controle e treinamento GGT, ALT, glicose do soro, triglicerídeos, colesterol e bilirubina total foram medidos pelo analisador Hitachi 917 ou analisadores Modular DP (ambos da Roche), Diagnostics Mannheim, Alemanha) usando os reagentes do fabricante. Alfa 2-  
 10 macroglobulina, apolipoproteína A1 e haptoglobina foram medidos usando um nefelômetro automático BNII (Dade Behring; Marburg, Alemanha).

Nos grupos de validação 1 e 2, GGT, Alt, glicose do soro, triglicerídeos, colesterol e bilirubina totais foram medidos usando Hitachi 747 ou 911 (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) usando os reagentes do  
 15 fabricante. Apolipoproteína A1, alfa2- macroglobilina, e haptoglobina foram determinados em amostras de soro usando um nefelômetro automático BNII (Dade Behring, Marburg, Alemanha).

Todos os coeficientes dos ensaios de variação foram inferiores a 10%.

## 20 1.2. **Graduação histológica**

A graduação histológica foi executada com base em biópsias de fígado. Regras comuns foram aplicadas em diferentes grupos e um único patologista por grupo, sem conhecimento das características do paciente, analisou as características histológicas. Amostras de biópsia do fígado foram  
 25 processadas usando técnicas convencionais.

A esteatose hepática foi classificada em de 0 a 4 com quatro graus de sistema de graduação: 0 = sem estenose, de 1 a 5% = suave, de 6 a 32 % = moderada, de 33 A 66%= acentuada, de 67 - 100% = severa, todos os percentuais se referindo ao percentual de hepatócitos envolvido na esteatose

(Poynard T. et al. Hepatology, 2003; 38: 75 - 85). O critério histológico principal foi a presença do grau de esteatose 2- 4 (entre 6 a 100%).

## **Exemplo 2**

### **Análise Estatística**

5                   A análise estatística usou o teste exato de Fisher, o teste de qui-quadrado, o teste de Student, o teste de Mann-Whitney e a análise de variância usando os testes de comparação múltipla de Tukey- kramer e de pares de Bonferroni para levar em consideração as comparações múltiplas e a regressão logística para a análise multivariada (Hintze JL. NCSS 2033 User  
10                   Guide, Number Cruncher Statistical Systems 2003, software NCSS, Kaysville, utah). A análise foi efetuada em um primeiro grupo (grupo de treinamento) e validade em 3 grupos diferentes (grupos de validação 1, 2 e 3), em coortes de pacientes, tal como na Tabela 1.

15                   De acordo com o sistema de graduação de esteatose hepática, os pacientes foram divididos em vários grupos.

                    O resultado primário foi a identificação de pacientes com grau de esteatose hepática de 2, 3 ou 4 (moderado, acentuado ou severo).

                    Em uma análise secundária, os pacientes foram classificados de acordo um com um sistema de graduação de escala 4.

20                   O primeiro estágio consistiu de fatores de identificação, que diferiram, de modo significativo, entre aquelas grupos através de análise unidimensional usando o teste de qui -quadrado, o teste de Student ou o teste de Mann- Whitney.

25                   O segundo estágio consistiu de análise de regressão logística, de modo a determinar o valor discriminativo independente de marcadores para o diagnóstico de fibrose.

                    O terceiro estágio foi o de construir um índice, que combina estes fatores independentes identificados. Através da definição do melhor índice (“grau de esteatose”) em termos de discriminação foi a função de

regressão logística que combina os fatores independentes. Em todos os exemplos que se seguem, o grau de esteatose é adicionalmente referido como ao “Grau de Teste Esteato”. O grau de Teste Esteato está na faixa de zero a 1,00, graus mais altos indicando ma maior probabilidade de lesões significativas.

Os valores de diagnóstico dos marcadores foram avaliados usando sensibilidades, especificidades, valores previsíveis positivos (PPV) e negativos NPV), e as áreas sob as curvas de Característica de Operação do Receptor (ROC) (Hintze JL NCSS, 2003, User Guide. Number Cruncher Statistical Systems, 2003, Software NCSS, Kaysville, Utah).

Os valores de diagnóstico total respectivos foram comparados pela área sob as curvas ROC. A curva ROC é traçada pela representação gráfica da sensibilidade contra (1- especificidade), após a classificação dos pacientes, de acordo com o valor obtido para a função logística, para diferentes limiares (de 0 a 1). É usualmente reconhecido que uma curva ROC, que possua uma área sob a mesma com um valor superior a 0,7 seja uma boa curva de previsão para o diagnóstico. A curva ROC tem que ser reconhecida como uma curva, que permite predizer a qualidade de um método de diagnóstico.

As áreas sob as curvas ROC foram calculadas usando um método não- paramétrico empírico. Uma análise de sensibilidade foi também executada, de modo a determinar a acurácia dos marcadores para os resultados primários, de acordo com o tamanho da amostra de biópsia. Para todas as análises, testes estatísticos de dois lados foram usados; um valor P de 0,05 ou menos foi considerado significativo. O software Number Cruncher Statistical Systems (NCSS, Kaysville, Utah) foi usado para todas as análises (Hintze JL, NCSS 2003, User Guide, Number Cruncher Statistical Systems 2003, Software NCSS, Kaysville, Utah).

Estas análises estatísticas foram executadas separadamente

para os diferentes grupos, tal como previamente definido.

### **Exemplo 3**

#### **Determinação da Função Logística**

5 O “grau do SteatoTest” é definido como a função de regressão logística, que combina fatores independentes, que retorna o melhor índice em termos de discriminação entre a presença ou ausência de esteatose hepática.

10 A Tabela 2, são fornecidas características de pacientes de acordo com a presença de esteatose hepática para cada um dos 10 marcadores bioquímicos, a graduação do FibroTest e a graduação do SteatoTest, assim como a sua associação independente com fibrose (valor P).

No grupo de treinamento, os componentes mais significativos, associados com a presença de esteatose de grau 2-4 em análise de variável única foram BMI, idade, ALT, AST, GGT, glicose, e triglicerídeos.

15 Na análise de regressão logística, os componentes mais significativos foram BMI (OR= 0,89, P= 0,0002), GGT (OR= 0,31, P = 0,002), apolipoproteína A1 (OR = 3,20, P = 0,01), alfa 2-macroglobulina (OR = 5,74, P = 0,02, ALT (OR = 0,38, P=0,03) e triglicerídeos (OR = 0,31, P = 0,04).

20 No grupo de validação foram observadas diferenças similares, de modo mais significativo para BMI, GGT, ALT e triglicerídeos (Tabela 2).

Característica	Esteatose Grupo de Treinamento		Esteatose Grupo de Validação 1		Esteatose Grupo de Validação 2		Esteatose Grupo de validação 3					
	>=5% n=140		HCV pos Sim n=45		HCV neg Sim n=22		Doença alcoólica do fígado					
	Valor-P	m (SD)	Valor-P	Não n=126	Valor-P	Não n=179	Valor-P	<5% n=4				
Demografia												
Idade em bioensaio, anos	46,7 (12,4)	51,8 (12,1)	0,0004	43,7 (7,3)	45,2 (7,0)	0,28	43,7 (8,1)	43,1 (7,0)	0,7	38,0 (12,8)	47 (9,4)	0,16
Gênero masculino	110 (55%)	91 (45%)	0,96	81 (64%)	30 (67%)	0,77	110 (62%)	12 (55%)	0,53	2 (50%)	45 (78%)	0,21
BMI	24 (4)	27 (6)	<0,0001	27 (5)	31 (4)	<0,0001	26 (4)	31 (6)	<0,0001	22,9 (2,9)	24,3 (4,2)	0,49
Marcadores bioquímicos												
$\alpha_2$ -macroglobulina, g/l	2,47 (1,00)	2,30 (1,04)	0,07	3,10 (1,23)	3,20 (1,24)	0,50	2,08 (0,79)	1,73 (0,66)	0,06	2,12 (0,53)	1,81 (0,55)	0,26
ALT, IU/L	104 (119)	115 (108)	0,02	46 (45)	61 (48)	0,003	18 (9)	26 (9)	<0,0001	35 (24)	74 (90)	0,10
AST, IU/L	83 (204)	83 (78)	0,01	80 (61)	88 (43)	0,01	23 (9)	25 (7)	0,06	74 (43)	58 (90)	1,00
Apolipoproteína A 1, g/l	1,46 (0,34)	1,42 (0,33)	0,30	1,27 (0,26)	1,20 (0,24)	0,18	1,16 (0,28)	1,07 (0,25)	0,2	1,67 (0,43)	1,48 (0,49)	0,49
Haptoglobina, g/L	0,93 (0,60)	0,96 (0,52)	0,19	0,77 (0,45)	0,78 (0,44)	0,84	0,85 (0,41)	0,94 (0,56)	0,85	1,55 (0,92)	1,38 (0,62)	0,85
GGT, IU/L	83 (132)	147 (226)	<0,0001	72 (85)	118 (116)	0,0007	20 (18)	28 (14)	0,0002	327 (184)	323 (323)	0,41
Bilirubina total, $\mu$ mol/L	14,8 (31,4)	14,7 (17,8)	0,47	11,0 (5,0)	11,3 (4,1)	0,38	8,9 (4,6)	8,1 (4,3)	0,3	28,5 (23,4)	21,1 (19,5)	0,28
glicose mmol/L	5,1 (3,7)	5,9 (2,2)	<0,0001	5,2 (0,9)	6,0 (1,8)	0,0007	5,3 (1,0)	5,5 (0,8)	0,16	6,5 (2,2)	5,7 (1,6)	0,46
Triglicérides mmol/L	1,24 (0,95)	1,88 (1,78)	<0,0001	1,26 (0,72)	1,72 (1,0)	0,0008	1,49 (0,98)	2,05 (1,22)	0,003	1,05 (0,51)	1,96 (3,15)	0,28
Colesterol total, mmol/L	4,8 (1,2)	5,1 (1,4)	0,10	4,5 (1,0)	4,4 (1,0)	0,10	5,0 (1,0)	5,1 (0,9)	0,51	6,0 (1,38)	5,4 (2,0)	0,68
FibroTest	0,40 (0,29)	0,45 (0,28)	0,47	0,45 (0,26)	0,53 (0,24)	0,07	0,29 (0,20)	0,26 (0,19)	0,46	0,43 (0,32)	0,43 (0,28)	0,79
SteatoTest	0,38 (0,21)	0,62 (0,22)	<0,0001	0,47 (0,21)	0,70 (0,16)	<0,0001	0,32 (0,20)	0,62 (0,17)	<0,0001	0,44 (0,03)	0,59 (0,26)	0,21

Todos os dados são médias (sd) e proporções (n[%]). ALT, alanina aminotransferase; AST, aspartato aminotransferase, GGT,  $\gamma$ -glutamil-transpeptidase.

O SteatoTest combina, em uma análise de regressão multivariada, ajustada por gênero, idade e índice de massa corpórea; alanina e aspartame aminotransferases, alfa- macroglobulina, apolipoproteína A- I, haptoglobina, bilirubina total, e  $\gamma$ -glutamil-transpeptidase.

### **Tabela 2: Características dos pacientes de acordo com a presença de esteatose**

A melhor função logística (gradação de Steato Test) combinando 9 marcadores e idade, gênero e BMI foi determinada no grupo de treinamento para que seja como se segue:

$$f = 6,68805 - 1,55337E-02 [\text{Idade (anos)}] + 1,161531 [\text{ApoA1 (g/ L)}] - 0,11889 [\text{Índice de Massa Corpórea (peso/ Altura}^2)] + 1,7479 [\text{Log.alfa. 2-macroglobulina (g/ L)}] - 0,96453 [\text{Log ALT (alanina aminotransferase) (IU/ L)}] - 0,11958 [\text{Log[bilirubina total (}\mu\text{mmol/ L)}] - 0,68125 [\text{Log [colesterol (mmol/ L)}] - 1,17922 [\text{Log [GGT (gamaglutamil transpeptidase) (IU/ L)}] - 1,46963 [\text{Log [glicose (mmol/ L)}] - 0,34512 [\text{Log [Haptoglobina (g/ L)}] - 1,17926 [\text{Log[triglicerídeos (mmol/ L)}] + 0,35052 [\text{gênero feminino} = 0, \text{masculino} = 1)].$$

Esta função foi obtida no grupo de treinamento através da combinação do peso relativo de cada parâmetro, tal como individualmente determinado na regressão logística, com um sinal negativo quando os marcadores apresentam uma correlação negativa com o estágio de esteatose hepática. Os logaritmos foram usados para marcadores, cujos valores apresentam uma faixa muito ampla.

O valor da gradação do SteatoTest, que combina 9 marcadores (alfa 2- macroglobulina, ALT, apo A1, haptoglobina, GGT, e bilirubina total), ajustado por idade, gênero e BMI, possuía uma alta correlação com a presença ou ausência de esteatose hepática, quando do treinamento da amostra, assim como em amostras de validação (Tabela 2).

Um das principais descobertas do presente trabalho é o aperfeiçoamento muito significativo no valor de diagnóstico de esteatose quando da combinação de marcadores, contra o teste de rotina clássico, previamente recomendado, tal que GGT e ALT. Os marcadores simples de resistência a insulina, tais que BMI, glicose, e triglicerídeos aumentaram o valor de diagnóstico de ALT e GGT. Isto não havia sido previamente demonstrado nas diferentes causas de esteatose do fígado. Além disso, foi

demonstrado pela primeira vez que o valor de diagnóstico de ALT foi muito maior do que o de GGT para o diagnóstico de esteatose. De modo interessante, além disso, o valor de GGT não aumentou de acordo com a severidade de esteatose, em comparação com ALT.

## 5 Exemplo 4

### Análise dos Dados

#### 4.1. Confiabilidade da graduação do SteatoTest para o diagnóstico de esteatose hepática

10 Valores de diagnóstico (áreas sob as curvas ROC) da graduação do SteatoTest para os diferentes grupos de pacientes são expostos na Tabela 3. A sensibilidade, a especificidade e os valores previsíveis positivos e negativos da graduação do SteatoTest com um corte de 0,30, 0, 50 e 0,70 são exibidos na Tabela 4.

Grupo de treinamento AUROC (se) N= 310	Grupo de treinamento AUROC (se) N= 310	Grupo de validação 1 HCV detectável N =171	Grupo de validação 2 HCV Não-detectável N = 201	Grupo de validação 3 Doença do fígado alcoólica N = 62
SteatoTest	0,79 (0,03)*	0,80 (0,04) £	0,86 (0,03) \$	0,72 (0,05)**
GGT	0,66 (0,03)	0,67 (0,05)	0,74 (0,05)	0,50 (0,09)
ALT	0,58 (0,03)	0,62 (0,05)	0,79 (0,04)	0,66 (0,07)

\* maior que GGT ( $p < 0,0001$ ) e ALT ( $p < 0,0001$ )

£ maior que GGT ( $p = 0,007$ ) e ALT ( $p < 0,0001$ )

\$ maior que GGT ( $p = 0,02$ )

\*\* maior que GGT ( $p = 0,002$ )

15 **Tabela 3: Valores [Área sob as curvas ROC (AUROCs) de graduação de esteatose, GGT e ALT para o diagnóstico de esteatose, em grupos de treinamento e validação.**

Corte	Sensibilidade	Especificidade	Valor Previsível Positivo	Valor Previsível Negativo
Grupo de Treinamento N=310			Prevalência =45%	
SteatoTest 0.30	0,91 (127/140)	0,45 (77/170)	0,58 (127/220)	0,86 (77/90)
0.50	0,69 (97/140)	0,74 (126/170)	0,69 (97/141)	0,75 (126/169)
0.70	0,45 (63/140)	0,89 (152/170)	0,78 (63/81)	0,66 (152/229)
GGT 50 IU/L	0,66 (92/140)	0,55 (94/170)	0,55 (92/168)	0,66 (94/142)
ALT 50 IU/L	0,77 (108/140)	0,35 (60/170)	0,50 (108/218)	0,65 (60/92)
Grupo de validação 1 N= 171			Prevalência =26%	
SteatoTest 0.30	0,98 (44/45)	0,24 (30/126)	0,31 (44/140)	0,97 (30/31)
0.50	0,89 (40/45)	0,58 (73/126)	0,43 (40/93)	0,94 (73/78)
0.70	0,44 (20/45)	0,83 (105/126)	0,49 (20/41)	0,81 (105/130)
GGT 50 IU/L	0,62 (28/45)	0,61 (72/126)	0,34 (28/82)	0,81 (72/89)
ALT 50 IU/L	1,00 (45/45)	0,06 (8/126)	0,28 (45/163)	1,00 (8/8)
Grupo de validação 2 N = 201			Prevalência =11%	
SteatoTest 0.30	1,00 (22/22)	0,56 (100/179)	0,22 (22/101)	1,00 (100/100)
0.50	0,68 (15/22)	0,79 (142/179)	0,29 (15/52)	0,95 (142/149)
0.70	0,32 (7/22)	0,92 (165/179)	0,33 (7/21)	0,92 (165/180)
GGT 50 IU/L	0,09 (2/22)	0,97 (174/179)	0,29 (2/7)	0,90 (174/194)
ALT 50 IU/L	0,05 (1/22)	0,98 (176/179)	0,25 (1/3)	0,89 (176/197)
Grupo de validação 3 N = 62			Prevalência =94%	
SteatoTest 0.30	0,85 (49/58)	0,00 (0/4)	0,93 (49/53)	0,00 (0/9)
0.50	0,62 (36/58)	1,00 (4/4)	1,00 (36/36)	0,15 (4/26)
0.70	0,40 (23/58)	1,00 (4/4)	1,00 (23/23)	0,10 (4/39)
GGT 50 IU/L	0,90 (52/58)	0,00 (0/4)	0,93 (52/56)	0,00 (0/6)
ALT 50 IU/L	0,53 (31/58)	0,75 (3/4)	0,97 (31/32)	0,10 (3/30)

**Tabela 4: Valor de diagnóstico de graduação de Esteatose para a previsão de esteatose hepática superior a 5%**

Todos os estudos mostram que a graduação do SteatoTest podem alcançar valores de diagnóstico muito altos (área sob a curva ROC, vide Tabela 3), e alta especificidade, sensibilidade e valores previsíveis positivos ou negativos para o diagnóstico de esteatose hepática (vide Tabela 4).

O valor de diagnóstico (área sob a curva ROC) da graduação do SteatoTest foi altamente reprodutível entre o grupo de treinamento e os grupos de validação 1, 2 e 3 (Tabela 3). A sensibilidade foi também bastante reprodutível entre o grupo de treinamento e os grupos de validação 1, 2 e 3 (Tabela 4). Em adição, as sensibilidades e especificidades da graduação do SteatoTest, observadas nas diferentes populações estudadas, irá

provavelmente aumentar em uma população mais geral, devido à excelente especificidade observada em voluntários e doadores de sangue (Figura 2 E), e devido ao fato de que os presentes estudos incluíram um número limitado de pacientes fatores de risco metabólico diversos, tais que a obesidade mórbida.

5                    Para alguns pacientes, os diagnósticos da presença de esteatose hepática pela biópsia e pela graduação do SteatoTest foram discordantes. A causa da discordância entre a presença de > 5% de esteatose hepática prevista pelos marcadores químicos e pela biópsia foi atribuída, de acordo com os respectivos fatores de risco ou falhas, tal como previamente detalhado  
10 (Poynard T, et al., Clin. Chem. 2004; 50; 1344-55). A discordância significativa foi definida como a discordância na previsão de > 5% de esteatose hepática (graus 2- 4) e uma diferença de 30% ou maior em  $p > 5\%$  no percentual de esteatose hepática, tal como previsto pela graduação do SteatoTest, ou como observado na amostra da biópsia. Os fatores de risco da  
15 falha de graduação do SteatoTest foram hemólise, mal de Gilbert, inflamação aguda e colestase hepática extra. Os fatores de risco de falha da biópsia foram o tamanho da biópsia (menos do que 25 mm) e a fragmentação (mais do que um fragmento). A falha atribuível à biópsia (falha negativa) foi suspeitada quando a biópsia foi inferior a 15 mm e fragmentada, além da presença de  
20 pelo menos um fator de risco metabólico.

No grupo de treinamento haviam 56 casos (18%) de discordância significativa entre o percentual de esteatose como previsto por ST e aquele observado nas amostras de biópsia. A falha atribuível ao ST (falha positiva de ST) foi suspeita em um caso, que apresentou hepatite de  
25 droga aguda associada com hepatite crônica B. A falha atribuível à biópsia (negativos falsos da biópsia) foi suspeitada em 16 casos, com amostras de biópsia de qualidade deficiente (comprimento mediano 13 mm, 2 fragmentos) e pelo menos um fator de risco metabólico.

Para os grupos de validação, discordância significativa foi

observada em 17 casos (16%) no grupo 1, 20 casos (10%) no grupo 2 e 13 casos (21%) no grupo 3. A discordância significativa foi observada com mais frequência em pacientes com fibrose extensiva (estágio F3 ou F4). 38 casos de 135 (28%) contra 91 casos de 609 (15 P= 0,001).

5 Comparado com o diagnóstico invasivo e de biópsia de alto custo, é muito importante notar que o método da invenção não conduz a um grande número de tratamentos indevidos de pacientes ou à exclusão de pacientes, que estejam em necessidade de um tratamento. Os dados apresentados neste pedido reforçam a confiabilidade do método de diagnóstico de acordo com a presente invenção.

#### 10 **4.2. Comparação do SteatoTest com outros testes de diagnóstico não invasivos (FibroTest, GGT 50 IU e ALT 50 IU/L)**

Os resultados obtidos com a graduação do Steato Test (usando 9 parâmetros bioquímicos ajustados por idade, gênero e BMI) foram comparados àqueles obtidos com o uso de marcadores isolados, tais que GGT e ALT, que são usualmente considerados como sendo marcadores úteis, de modo a indicar a presença ou a ausência de esteatose hepática. O mesmo padrão de valor de corte é usado para GGT e ALT: 50 IU/L. Abaixo do referido valor de corte, o diagnóstico de esteatose hepática é considerado como sendo negativo, acima, é considerado como sendo positivo.

20 As características dos pacientes de acordo com a presença de esteatose hepática quando a marcadores bioquímicos individuais, o FibroTest, e a graduação do SteatoTest são exibidos na Tabela 2.

Comparada com a do FibroTest, a graduação do SteatoTest possibilita uma discriminação muito melhor entre a presença ou a ausência de esteatose hepática em todos os grupos analisados, em particular para o grupo de treinamento e o grupo de validação 2 (Tabela 2).

Valores de diagnóstico (áreas sob as curvas ROC) de graduação do SteatoTest, GGT 50 IU/L e ALT 50 IU/L para o diagnóstico do

ponto terminal principal (ou seja, esteatose hepática de grau 2-4), são exibidos na Tabela 3. A graduação do SteatoTest possui áreas mais altas sob as curvas ROC do que GGT 50 IU/ L em todos os grupos analisados, e do que ALT 50 IU/ L no grupo de treinamento e no grupo de validação 1 (Tabela 3).

5                   A sensibilidade, a especificidade e os valores previsíveis positivos e negativos da graduação do SteatoTest com um corte de 0,30, 0,50 ou 0,70 e de GGT 50 IU/L e ALT 50 IU/L são exibidas na Tabela 4. Para o diagnóstico de esteatose de grau 2-4, uma graduação de SteatoTest com um corte de 0,50 alcançou uma boa sensibilidade (0,69, 0,89, 0,68 e 0,62) e uma  
10                   boa especificidade (0,74, 0,58, 0,79, 1,00) de acordo com os grupos de treinamento e validação, respectivamente. Além disso, uma tal graduação de SteatoTest com um corte de 0,50 exibe valores positivos e negativos mais altos do que GGT 50 IU/L e ALT 50 IU/L em todos os grupos analisados, exceto quanto ao valor previsível negativo de ALT 50IU/L no grupo de  
15                   validação 1.

                  Em adição, com referência à discriminação entre diferentes graus de esteatose hepática, isto é melhor alcançado através da graduação do SteatoTest, comparado a GGT 50 IU/ L e ALT 50IU/L em todos os grupos analisados (Figura 2).

20                   A discriminação entre diferentes graus de esteatose hepática foi também analisada em uma base integrada, constituída de todos os pacientes incluídos no grupo de treinamento, nos três grupos de validação e no grupo de controle (884 pacientes).

                  Houve uma correlação geral muito significativa entre a  
25                   graduação do SteatoTest e os graus de esteatose a partir dos controles para “33-100%” (graus 3-4, vide Figura 3). Para a graduação do SteatoTest, houve uma diferença significativa entre todos os graus através do teste de comparação múltipla Tukey -Kramer para todas as diferenças emparelhadas entre médias ( $P < 0,05$ ). Em contraste, para GGT e ALT, não houve diferença

significativa entre “Sem esteatose” (grau 0) e “< 5%” (grau 1). Para ALT, não houve até mesmo diferença significativa entre “Sem esteatose” (grau 0) e de “6-32%” (grau 2), “< 5%” (grau 1) e “6-32%” (grau 2), e de “6-32” (grau 2) e de “33-66” (grau 3).

5                    Em conclusão, a presente invenção apresenta uma combinação de pelo menos 5, de modo preferido 9, marcadores bioquímicos, ajustados por idade, gênero e BMI, a serem usados para a detecção da presença ou ausência de esteatose hepática. Os marcadores usados na presente invenção nunca foram combinados de um tal modo, em particular com a idade, gênero, e BMI  
10 dos pacientes, de modo a fornecer um tal bom valor de previsão, tal como ilustrado pela área sob a curva ROC.

                  O método de diagnóstico da invenção pode ser analisado de modo automático, após uma mediação automática dos valores dos marcadores, e pode, de modo vantajoso, ser aplicado para pacientes com uma  
15 esteatose hepática, que envolva doença, de modo a reduzir a indicação de biópsia do fígado.

## REIVINDICAÇÕES

1. Método para o diagnóstico *in vitro* de esteatose hepática ou de um soro ou amostra de soro de um paciente, caracterizado pelo fato de compreender os estágios de

5 a) estudar 5 marcadores bioquímicos através da medição dos valores de sua concentração no soro ou plasma do referido paciente, em que os referidos marcadores são:

- ApoA1 (apolipoproteína A1),
- alfa.2-macroglobulina,
- 10 - ALT (alanina aminotransferase),
- GGT (gamaglutamil transpeptidase), e
- triglicerídeos;

b) estudar um marcador clínico, selecionado a partir do grupo constituído pelo índice de massa corpórea ( $\text{Peso}/\text{altura}^2$ ), mediação da cintura, e a razão de (Medição da cintura/medição do quadril);

15 c) combinar os referidos valores através de uma função logística, que inclui os referidos marcadores, de modo a obter um valor final, em que a referida função logística é obtida através do método que se segue:

20 i) classificação de um coorte de pacientes em diferentes grupos de acordo com a extensão de sua doença;

ii) identificação de fatores, que diferem significativamente entre estes grupos através de análise unidimensional;

25 iii) análise de regressão logística, de modo a determinar o valor discriminativo independente dos marcadores para o diagnóstico de esteatose hepática;

iv) construção da função logística através da combinação destes fatores independentes identificados.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a referida função logística leva ainda em consideração a idade e o

gênero do paciente.

3. Método de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que a referida função logística compreende ainda pelo menos um marcador bioquímico, selecionado a partir do grupo constituído por bilirubina total, haptoglobina, AST (aspartato aminotransferase), glicose, e (colesterol ou HDL- colesterol).

4. Método de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a referida função logística compreende bilirubina total, haptoglobina, glicose, e colesterol.

5. Método de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que a referida função logística é:

$$f = a_1 - a_2 [\text{Idade}(\text{anos})] + a_3 [\text{ApoA1} (\text{g/l})] - a_4 [\text{Índice de Massa Corpóreo} (\text{Peso} / \text{Altura}^2)] + a_5 \cdot \text{Log} [\text{alfa.2 -macroglobulina} (\text{g/l})] - a_6 \cdot \text{Log} [\text{ALT} (\text{alanina aminotransferase}) (\text{IU} / \text{L})] - a_7 \cdot \text{Log} [\text{bilirubina total} (\mu\text{mol} / \text{L})] - a_8 \cdot [\text{colesterol} (\text{mmol/L})] - a_9 \cdot \text{Log} [\text{GGT} (\text{gamaglutamil transpeptidase}) (\text{IU/L})] - a_{10} \cdot [\text{glicose} (\text{mmol/L})] - a_{11} \cdot \text{Log} [\text{haptoglobina} (\text{g/L})] - a_{12} \cdot [\text{triglicerídeos} (\text{mmol/L})] + a_{13} \cdot [\text{Gênero} (\text{feminino} = 0, \text{masculino} = 1)], \text{ em que}$$

a<sub>1</sub> está compreendido no intervalo de [6,68805 - 90%; 6,68805 + 90%],

a<sub>2</sub> está compreendido no intervalo de [1,5533E-02 - 90%; 1,55337E - 02 + 90%],

a<sub>3</sub> está compreendido no intervalo de [1,161531 - 90%; 1,161531 + 90%],

a<sub>4</sub> está compreendido no intervalo de [0,11889 - 90%; 0,11889 + 90%],

a<sub>5</sub> está compreendido no intervalo de [1,74791 - 90%; 1, 74791 + 90%],

a<sub>6</sub> está compreendido no intervalo de [0, 96453 - 90%; 0,

96453 + 90%];

a7 está compreendido no intervalo de [0,11958 -90%; 0,11958 + 90%],

5 a8 está compreendido no intervalo de [0,68125 - 90%; 0,68125 + 90%]

a9 está compreendido no intervalo de [1,17922 - 90%; 1, 17922 + 90%],

a10 está compreendido no intervalo de [1,46963 -90%; 1, 46963 + 90%],

10 a11 está compreendido no intervalo de [0,34512-90%; 0, 34512 + 90%],

a12 está compreendido no intervalo de [1,17926-90%; 1,17926 + 90%], e

15 a13 está compreendido no intervalo de [0,35052-90%; 0,35052 + 90%].

6. Método de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que a referida função logística é :

20  $f = 6,68805 - 1,55337E-02 \{ \text{Idade (anos)} \} + 1,161531 [\text{ApoA1 (f/ L)}] - 0,11889 [\text{Índice de Massa Corpórea (Altura/ Peso}^2) + 1, 74791. \text{Log [alfa.2-macroglobulina (g/L)}] - 0, 96453 \text{Log [ALT (alanina aminotransferase) (IU/ L)}] - 0,11958. \text{Log [bilirubina total (}\mu\text{mol/ L)}] - 0,68125. \text{Log [colesterol (mmol/ L)}] - 1, 17922. \text{Log [GGT (gamaglutamil transpeptidase) (IU/ L)}] - 1, 46963. \text{Log/ glicose (mmol/ L)}] - 0,34512. \text{Log[haptoglobina (g/ L)}] - 1, 17926. \text{Log [triglicerídeos (mmol/ L)}] + 0,35052 [\text{Gênero (feminino =0, masculino =1)}].$

25

7. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o referido paciente sofre de uma doença que envolve esteatose.

8. Método de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que a referida doença está incluída no grupo, que consiste de hepatite

B e C, alcoolismo, hemocromatose, doença metabólica, diabetes, obesidade, doença do fígado autoimune, cirrose biliar primária, déficit de alfa.1-antitripsina e mal de Wilson.

5 9. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o referido paciente já foi submetido a um teste diagnóstico de fibrose do fígado e /ou presença de lesões necroinflamatórias no fígado.

10. Método de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que o referido teste diagnóstico foi o FibroTest / Acti-Test.

10 11. Kit para o diagnóstico de esteatose hepática em um paciente, caracterizado pelo fato de que compreende:

a) instruções para determinar a presença de esteatose hepática no referido paciente;

15 b) reagentes para a medição dos valores de soro das concentrações de 5 marcadores bioquímicos, em que os referidos marcadores são:

- ApoA1 (apolipoproteína A1),
- alfa.2-macroglobulina,
- ALT (alanina aminotransferase),
- GGT (gamaglutamil transpeptidase), e
- 20 - triglicerídeos.

c) opcionalmente, pelo menos um reagente para a medição dos valores de soros das concentrações de bilirubina total haptoglobina, AST (aspartato aminotransferase), glicose, ou (colesterol ou HDL- colesterol)

25 d) instruções para o uso de uma função logística, que é usada para combinar os referidos valores com um marcador clínico, selecionado a partir do grupo constituído pelo índice de massa corpórea ( $\text{Peso} / \text{Altura}^2$ ), medição da cintura, e a razão de (medição da cintura/ medição do quadril, de modo a obter um valor final.

12. Kit de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo

fato de compreender ainda uma curva ROC.

5 13. Kit de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de compreender ainda tabelas, que mostram como obter os valores de previsão, dependendo da prevalência esperada de esteatose hepática na população de pacientes.

14. Kit de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de compreender ainda instruções para a quantificação de diferentes graus de esteatose hepática (nenhuma = 0%, branda = 1-5%, moderada = 6-32%, acentuada = 33- 66%, e severa = 67- 100%, e outros graus intermediários.

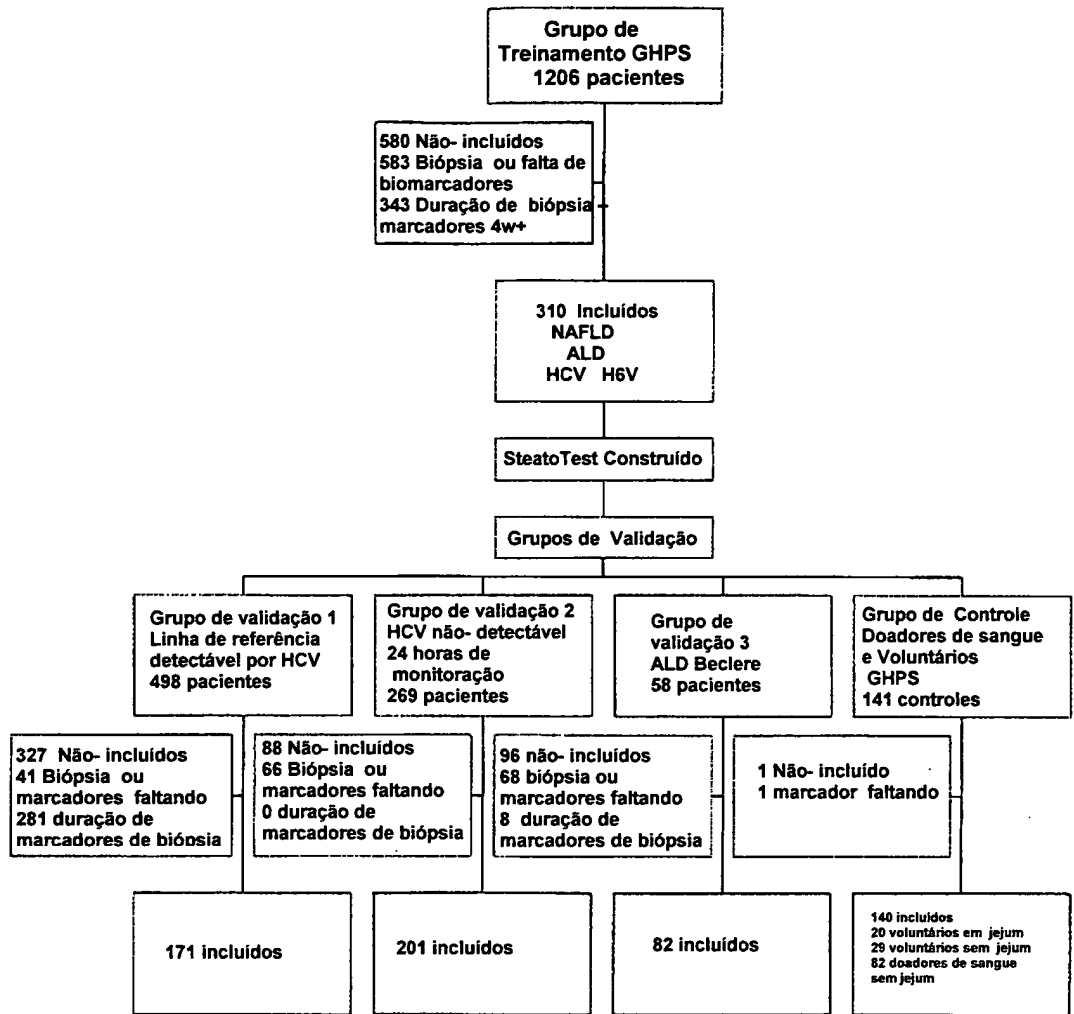
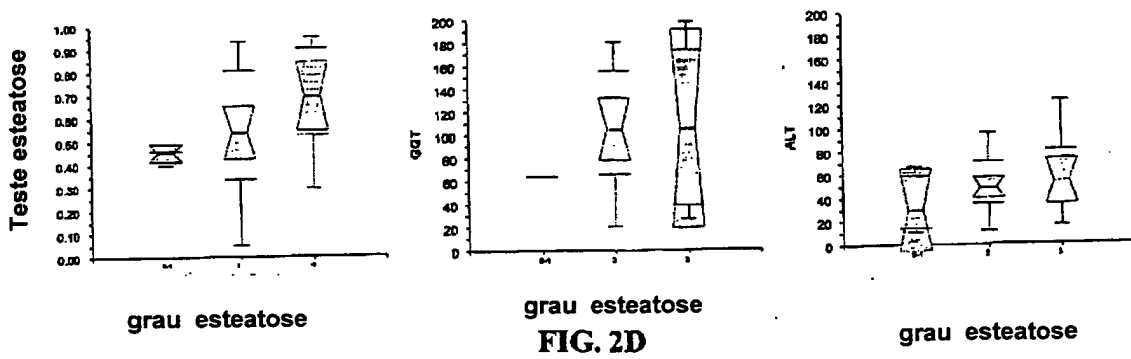
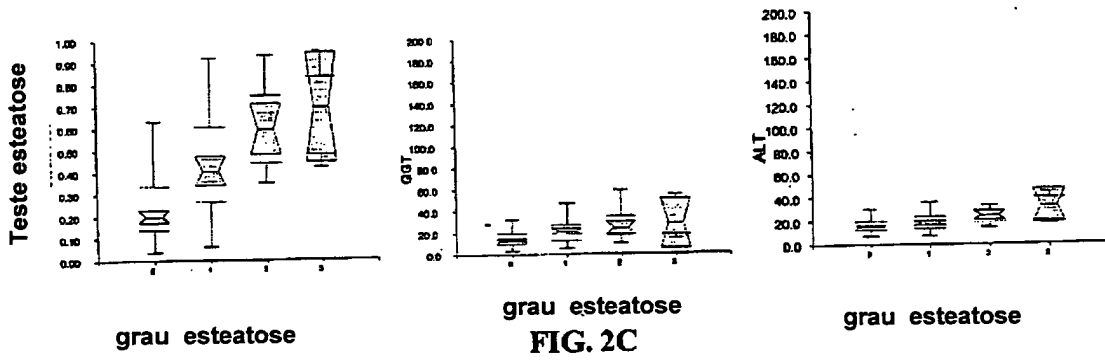
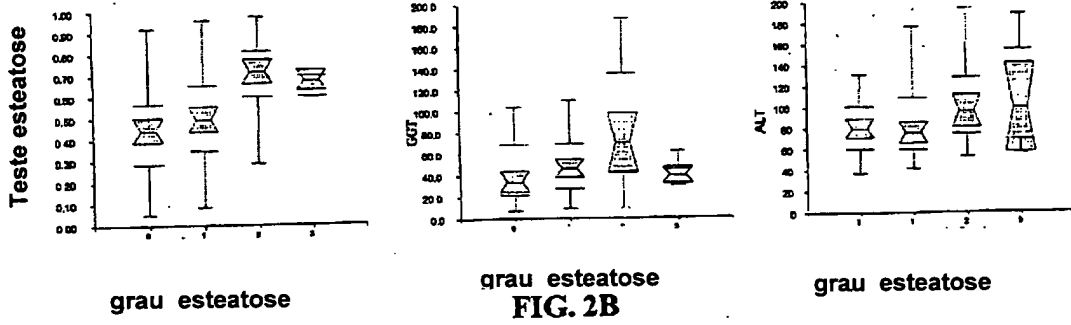
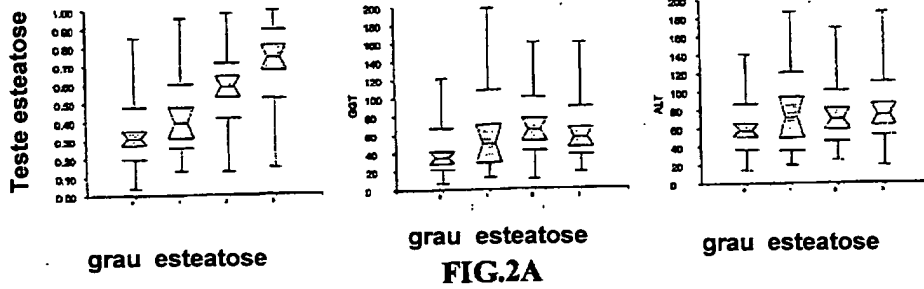
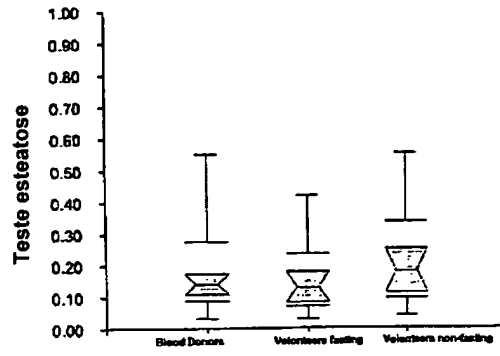


FIG. 1





Grupo de controle

**FIG. 2E**

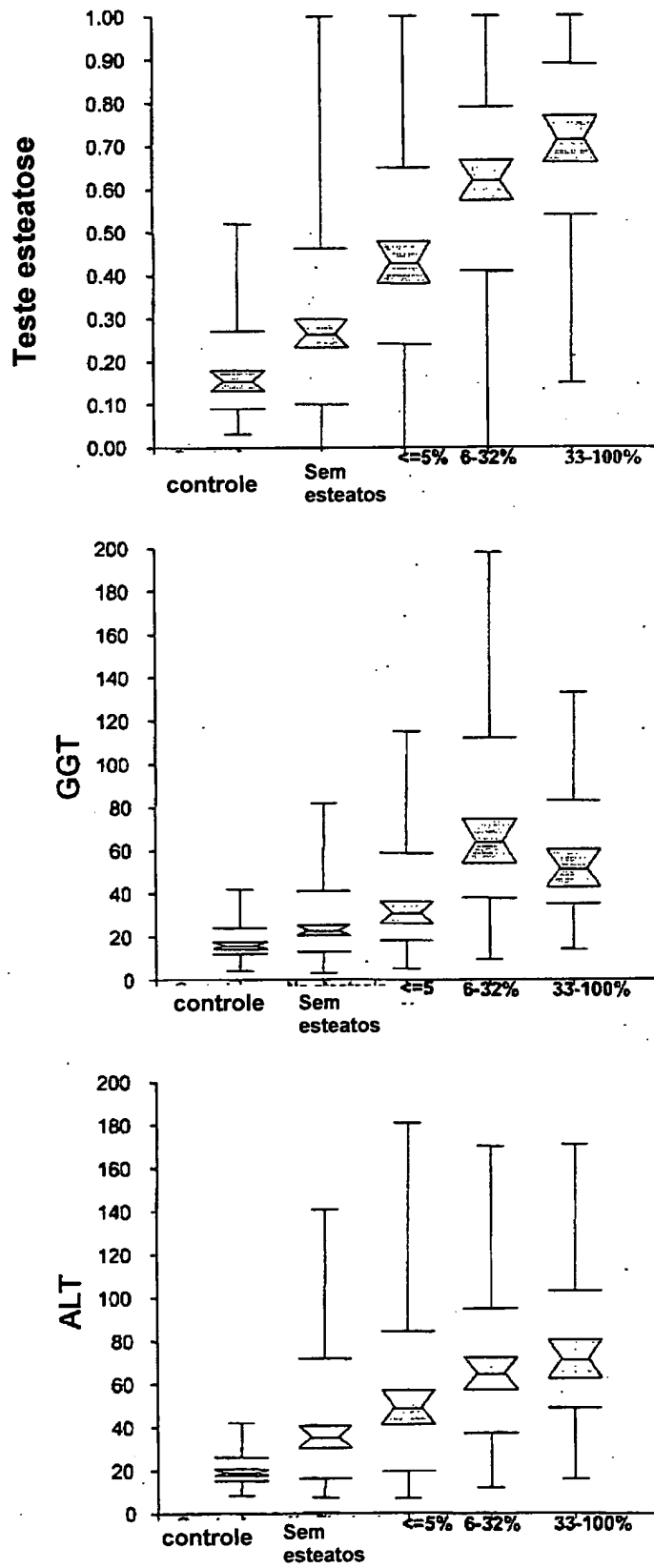


FIG. 3

RESUMO

“MÉTODO PARA O DIAGNÓSTICO *IN VITRO* DE ESTEATOSE HEPÁTICA OU DE UM SORO OU AMOSTRA DE SORO DE UM PACIENTE, E, KIT PARA O DIAGNÓSTICO DE ESTEATOSE HEPÁTICA EM UM PACIENTE”

A presente invenção é dirigida a um novo método de diagnóstico para detectar a extensão de esteatose hepática em um paciente, que sofre de uma doença que envolve esteatose hepática, ou que já possui um teste de diagnóstico positivo de fibrose do fígado e/ ou presença de lesões necroinflamatórias no fígado, através do uso de uma concentração no soro de marcadores biológicos facilmente detectáveis. A invenção é também dirigida a kits de diagnóstico para a implementação do método.